LUIS NATIVIDAD NUÑEZ APAZA

AVALIAÇÃO FENOTIPICA, FUNCIONAL E DOS REQUERIMENTOS PARA A GERAÇÃO DOS LINFOCITOS TCD8^{LOW}CD45RC^{LOW} NO CAMUNDONGO CRÔNICAMENTE INFETADO COM *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomedicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

SÃO PAULO

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

LUIS NATIVIDAD NUÑEZ APAZA

AVALIAÇÃO FENOTIPICA, FUNCIONAL E DOS REQUERIMENTOS PARA A GERAÇÃO DOS LINFOCITOS TCD8^{LOW}CD45RC^{LOW} NO CAMUNDONGO CRÔNICAMENTE INFETADO COM *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomedicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Orientador: Prof. Dr. José Maria A. Mosig

SÃO PAULO

2008

Candidato(a): Luis Natividad Nuñez Apaza

título da tese: Avaliação fenotipica, funcional e dos requerimentos para a geração dos linfocitos $TCD8^{low}CD45RC^{low}$ no camundongo cronicamente infetado com *Trypanosoma cruzi*

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) **Aprovado(a)** ( ) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) _____

2) Examinador(a) _____

3) Examinador(a) _____

4) Examinador(a) _____

5) Presidente _____

A Margarita .(Avo)

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo José Maria A. Mosig, pela orientação e incentivo durante todos estes anos de trabalho y muito mais pela paciencia.

A Maria Regina D'Império Lima, pelo acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

As professoras Isses de Almeida Abrahamson, Karina Bastos e Nancy Starobynas, pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

A Rogério e Meiri pelo apoyo técnico de laboratório.

À amiga Jovelina, Claudia e Joan pelo cuidadoso trabalho de revisão deste manuscrito.

Aos amigos do laboratório. Rogério, Luis Sardinha, Dani, Cristiam, Cláudio, Fernando, Sandra, Sheila e os que já foram Tainá, Ricardo, Valois, Ana Paula.

Aos amigos do Departamento de imunologia, Jean Píer. Aos colegas do H. INCOR pela sua compressão.

E a todos aqueles que foram importantes nesta fase e que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

NUÑEZ-APAZA, L. N. **Avaliação fenotipica, funcional e dos requerimentos para a geração dos linfócitos TCD8LOW CD45RCLOW no camundongo cronicamente infetado com Tripanosoma cruzi**. 157 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O controle do parasita na fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi* se dá principalmente por uma resposta mediada por anticorpos, uma resposta celular TH1 e uma resposta mediada por linfócitos T CD8. Na fase crônica, co-existem linfócitos T CD8 com fenótipo $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$ (CD8LL que apresentam marcadores de células sensibilizadas pelo antígeno) junto com células $CD8^{High}$ $CD45RC^{High}$ (CD8HH, que em grande parte apresentam fenótipo de célula naive). Células $CD8^{High}$ $CD45RC^{Low}$ (CD8HL) podem ser também observadas. As células CD8LL se apresentam no camundongo independente da cepa de *T. cruzi* infectante. Verificou-se que na sua grande maioria as células CD8LL tem fenótipo de células em repouso, baixa expressão de CD62L baixa expressão de CD127 ($CD62L^{LOW}CD127^{LOW}$), sendo estas as características de células efetoras de memória (EM). Este tipo celular ainda pode chegar a expressar marcadores de células NK de significado incerto. Observa-se, na análise funcional, que na estimulação *in vitro* das células CD8 com anticorpos anti-CD3/CD28 há uma recuperação baixa de CD8 por provável morte por AICD. Este fato é reforçado pelo aumento da ligação à anexina nas células sobreviventes, bem como através da expressão de CD69. Estudos anteriores relataram que o número de células CD8 diminuía após desafio *in vivo* com o parasita; porém o observado foi uma diminuição das células CD8LL na estimulação inespecífica *in vivo* com Poli-IC, um ligante de TLR-3. O desafio *in vivo* com antígeno de tripanossoma na cavidade pleural ocasiona uma migração preferencial de células CD8 e entre estas migram células de fenótipos CD8LL e CD8HL. No entanto, ao contrário do esperado, este estímulo resulta em uma diminuição da expressão de CD69 nas células CD8 infiltrantes. Visando determinar *in vivo* o papel protetor das células CD8, em um primeiro momento

células de baço total foram tranferidas para camundongos sadios e, após a infecção com *T. cruzi*, observou-se um controle parcial da infecção, caracterizado por um retardo no pico de parasitemia e diminuição na intensidade de infecção, evidenciando um papel protetor parcial *in vivo*. Na determinação de fatores envolvidos na geração e manutenção das células CD8LL, observou-se que os camundongos deficientes em CD28, INOS ou CD4 têm geração normal de células CD8LL. Os camundongos IL-12p40-KO têm uma deficiência parcial na geração de células CD8LL. Já os camundongos deficientes em INF-gama, por sua vez, possuem uma deficiência acentuada destas células, apesar de que a diminuição poderia se dever a um aumento da necessidade periférica. Por outro lado, os camundongos IL-12p40-KO e INF-gama-KO desenvolvem um quadro neurológico sub-agudo progressivo, onde as células CD8 infiltrantes na medula espinhal apresentam um fenótipo misto CD8LL e CD8HL, e não são anérgicas, por sinal.

Palavras-chave: Trypanosoma cruzi; Chagas; Linfócito TCD8.

ABSTRACT

NUÑEZ-APAZA, L. N. **Phenotipic, functional evaluation and of the request for the generation of the limphocyties TCD8^{LOW} CD45RC^{LOW} in the mice chronic infected with *Trypanosoma cruzi*.** 124 f. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The parasite control in chronic stage of infection for *Trypanoma Cruzi* is meanly for the respond middle for antibodies, a cellular response TH1 and an response middle for lymphocyties T CD8. In the chonic stage , co-exist limphocyties T CD8 with phenotype CD8^{Low} CD45RC^{Low} (CD8LL that show cellular marker for antigens experienced) together with cellular CD8^{High}CD45RC^{High} (CD8HH, largely shows naive cellular's phenotype). CD8^{High}CD45RC^{low} (CD8HL) cells can be detected as well. The CD8LL is developed in the mouse, independent from the T. Cruzi infective strain. It has checked that largely the CD8LL has phenotype of cells on rest, low expression of CD62L, low expression of CD127 (CD62L^{Low} CD127^{Low}), those characteristics are the memory effectors (EM). This cells still able to achieve to express NK cells marker significantly uncertain. In the functional analyze shows the stimulation in vitro of CD8 cells with antibody anti-CD3/CD28 there is a low recovery of CD8 due to the probably died for ACIDS. This fact is re-strength of the link increasing to the Anexina-V on the surviving cells, in the same way thought of CD69 expression. Studies before refer the CD8 cellular numbers decrease after the life challenge with a parasite; but it has showed a reduction of CD8LL cells in the inespecific stimulation in the mice with Poli-IC, a TLR-3 link. The challenger in life with antigen of Tripanosoma on the Pleural Cavity produce a preferential migration of CD8 cells and among this migrate CD8LL E CD8HL phenotype cells. However, instead of expecting it, this

stimulation results a reduction of CD69 expression on the CD8 infiltrating cells. Aiming to determine in life the protector role of he CD8 cellular, at the first moment the total spleen cells has transferred to healthy mice and, after the infection with T.cruzi, it has observed a partial control of the infection, characterized for a peak of parasitemia and a reduction of infection intensity, showing a partial protector role in life. In determining of involving factor of generating and maintenance of CD8LL cells, it has showed that the mice with deficent in CD28, INOS or CD4 have a normal generation of CD8LL cells. In the deficent of the IL-12p40 has a partial deficient of CD8LL cells. In mice deficient in INF-gama, on the other hand, having a marked deficient if this cells, in spite of the reduction could be by increasing of the pereferic requeriment. In another hand the IL-12p40-KO and INF-gama-KO development a neurologic picture sub-acute progressive, where the CD8 infiltrating cells on the spinal cord show a mixed phenotype CD8LL e CD8HL, and they are not anergy thought signal.

Key words: *Trypanosoma cruzi;* Chagas; limphocyties;TCD8

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO.....7

1.1 A doença de chagas: aspectos gerais.....14

1.1.1 Invasão do *Trypanosoma cruzi*.....14

1.1.2 Evolução clínica.....16

1.2 O hospedeiro: o modelo murino e o *Trypanosoma cruzi*.....17

1.3 Patogênese.....20

1.4 A resposta imune na infecção pelo *Trypanossoma cruzi*.....25

1.4.1 Resposta imune inata.....26

1.4.2 Resposta imune especifica.....31

1.4.2.1 A resposta imune humoral.....31

1.4.2.2 A resposta imune celular.....33

1.5 Linfócitos $CD8^+$ na fase aguda.....34

1.6 Linfócitos $CD8^+$ na fase crônica 35

1.7 Disfunção de celulas $TCD8^+$ 37

1.8 Regulação negativa de receptores e co-receptores.....39

2 OBJETIVOS.....43

3 MATERIAIS E METODOS.....44

3.1 Animais.....44

3.2 Parasitas.....44

3.3 Antígeno 44

3.4 Infecção Experimental 45

3.5 Parasitemias.....45

3.6 Tratamento quimioterápico específico (benzonidazol).....45

3.7 Meios de cultura.....46

3.8 Anticorpos, conjugados fluorescentes e reagentes **46**

3.9 Obtenção de células esplênicas.....**47**

3.10 Citometria de Fluxo.....**47**

3.11 Detecção intracelular de citocinas por citofluorimetria de fluxo.....**48**

3.12 Geração de células macrofagos infectados pelo *T. cruzi* a partir de células de medula óssea pela adição de M-CSF.....**49**

3.13 Análise Histopatólogica.....**50**

3.14 Isolamento de leucócitos sangüíneos.....**50**

3.15 Isolamento de leucócitos da medula espinhal.....**51**

3.16 Isolamento de células da cavidade pleural.....**52**

3.17 Analise estatística.....**52**

4 RESULTADOS.....**53**

4.1 Os camundongos cronicamente infetados com *Trypanosoma cruzi* das cepas Y ou SilvioX10/4 apresentam aumento das células $CD8^+$ **53**

4.2 Os linfócitos T $CD8^+$ dos camundongos cronicamente infetados com *Trypanosoma cruzi* das cepas Y ou Silvio X10/4 regulam negativamente a expressão das moléculas de superfície CD45RC ($CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$) **54**

4.3 As células $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ apresentam fenótipo de células experimentadas e correspondem na sua maioria a células de memoria efetora (EM) **56**

4.4 As células $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$: expressão de PD-L1.....**59**

4.5 As células $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$ incluem células com marcadores fenotípicos de células NK.....**61**

4.6 Avaliação funcional das celulas $cd8^{low}$ $CD45RC^{low}$ de camundongos na fase crônica da doença de chagas.....**64**

4.7 A estimulação inespecífica com Poly-IC provoca uma queda significativa das células $CD8^+$ com fenótipo $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$.....**66**

4.8 A recuperação de células $CD8^+$ após estimulo *in vitro* por 6 horas com anti-CD3, com ou sem anti-CD28, muda de acordo à concentração do anti-CD3.....**68**

4.9 A freqüência de células que expressam o marcador de ativação CD69 após estimulação *in vitro* com anti-CD3 é alta na sub-população CD8HH, baixa na sub-população CD8LL e intermediária na sub-população CD8HL, a pesar desta última sub-população ter um nível de expressão basal elevado.....**73**

4.10 Na estimulação *in vitro* com anti-CD3 as células $CD8^+$ expressam moléculas relacionadas à morte: ligação a Anexina **76**

4.11 No desafio intra-pleural do animal crônico, as células $CD8^+$ migram de forma preferencial para a cavidade pleural chegando a inverter a relação CD4/CD8.....**78**

4.12 As células $CD8^+$ apresentam diferentes graus de ativação dependendo do compartimento estudado.....**82**

4.13 As células CD8HH predominam no baço, as células CD8LL predominam no sangue e as células CD8HL predominam no infiltrado pleural do animal crônico.....**84**

4.14 Desafio com macrófagos (dcs) infetadas com *Trypanosoma cruzi* causa recrutamento seletivo de células $CD8^+$, porém em menor intensidade que o desafio com antígeno de *T. cruzi*.....**87**

4.15 A transferência de esplenócitos de camundongo crônico protege parcialmente da infecção pelo *T. Cruzi*.....**89**

4.16 geração e mantenimento das celulas $cd8^{low}$ $cd45rc^{low}$ de camundongos na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.....**91**

4.17 Parasitemia em diferentes camundongos imuno-deficientes.....**92**

4.18 Camundongos deficientes na recepção do sinal co-estimulador por CD28, na enzima iNOS, ou na população T $CD4^+$, geram células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$.....**95**

4.19 Camundongos deficientes em IL-12/IL-23 têm deficiência parcial na geração de células CD8LL e camundongos deficientes em INFg têm um severo compromisso na geração de células CD8LL **99**

4.20 Camundongo IRF1-KO (que apresenta uma redução marcada no número de células $CD8^+$) consegue gerar células $CD8^+$ efetoras após o controle da fase aguda com tratamento com Benzonidazol.....**102**

4.21 Camundongo IRF1-KO (que apresenta uma redução marcada no número de células $CD8^+$) consegue gerar células $CD8^+$ efetoras após o controle da fase aguda com tratamento com Benzonidazol.....**104**

4.22 camundongos deficientes em INFg ou em il-12p40 quando infetados com *t cruzi* da cepa sylvio x10/4 desenvolvem um quadro neurológico.....**107**

4.23 A população celular predominante no infiltrado celular na medula espinhal dos camundongos com o quadro neurológico são a predomínio de macrófagos e PMN, alem de linfócitos TCD8.....**109**

4.24 Os linfócitos $TCD8^+$ que infiltram a medula espinhal de camundongos IL-12p40-KO ou IFNg-KO que desenvolvem o quadro neurológico sub-agudo, apresentam um fenótipo predominantemente misto de $CD8^{High}$ $CD45RC^{Low}$ e $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$ **110**

4.25 Os linfócitos $TCD8^+$ que infiltram a medula espinhal de camundongos IL-12p40-KO ou IFNg-KO que desenvolvem o quadro neurológico sub-agudo, expressam elevados níveis de CD69 de forma espontânea.....**113**

4.26 Os linfócitos T $CD8^+$ que infiltram a medula espinhal de camundongos IL-12p40-KO produzem INF-g de forma espontânea e quando estimulado com anti-CD3 .....**114**

5 DISCUSSÃO.....**116**

.

6 CONCLUSÕES.....**141**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....**145**

8 ANEXOS.....**159**

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS: ASPECTOS GERAIS

A doença de chagas ou tripanosomíase americana é uma doença endêmica do continente americano, que é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta foi inicialmente descrita pelo médico pesquisador Carlos Chagas há quase um século (CHAGAS, 1909). Atualmente essa doença continua a constituir um problema de saúde publica na América e, segundo a Organização Mundial de Saúde, atualmente estão infectadas cerca de 9 milhões de pessoas, sendo que 120.000 são infectados a cada ano, e mais de 90 milhões estão sob o risco de infecção, o que representa 25% da população do continente latino americano.(SCHOFIELD, 2005).

O principal meio de transmissão da doença de Chagas é a disseminação do vetor através de fezes/urina as quais contenham a forma infectante. Outras formas de transmissão da doença podem ocorrer por transfusão de sangue, transmissão congênita (WENDEL, 1992), via oral e acidentes de laboratório.

1.1.1 INVASÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI

O *Trypanosoma cruzi* tem uma grande capacidade de invadir qualquer célula nucleada, além de acessar *in vivo* a sítios privilegiados para sobrevida e replicação (BRENER, 1973). A transmissão do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado se dá através de insetos hematófagos do gênero *Triatoma*. O inseto reduvídeo é infectado após se alimentar do sangue do hospedeiro infectado (animal ou humano) que contenha as formas circulantes infectivas, os tripomastigotas sanguícolas. Após ingeridos, estas se transformam, no trato digestivo do inseto, em epimastigotas, que se multiplicam e, após vários ciclos, ganham a parte posterior

do tubo digestivo. Lá elas se convertem em tripomastigotas metacíclicos. O inseto contaminado no momento da sua alimentação excreta nas fezes a forma infectante - o tripomastigota metacíclico que penetra o ser humano, então sadio, por escoriações causadas na pele por ocasião da picada ou através de mucosas íntegras. Após a entrada no hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos invadem células adjacentes e iniciam o ciclo celular que dura em média quatro dias. Depois disso liberam a forma trypomastigota sanguícola, que perpetua estes ciclos replicativos até ser controlado pelo sistema imune do hospedeiro (WENDEL, 1992; BRENER, 1973).

A entrada de tripomastigotas na célula inicialmente acontece através da formação de um vacúolo de membrana obrigatório, que é subseqüentemente quebrado e libera o parasita no citosol. Uma série de estudos relata a mobilização, o recrutamento e a fusão de lisossomos da célula hospedeira no sitio de entrada. (TARDIEUX, 1992; ANDREWS, 1995; SIBLEY, 2000). O processo é lentamente iniciado com um acúmulo gradual de lisossomos abaixo da membrana, em um local específico diretamente oposto à área de ancoragem do tripanossoma. Os lisossomos gradualmente se fundem à membrana plasmática ao redor do parasita (RODRIGUEZ, 1996).Aparentemente, o mecanismo central através do qual as células reparam a sua membrana plasmática é utilizado pelo *Trypanosoma cruzi* como veículo para a invasão celular (HENRY, 2002; REDDY, 2001). O tripanossoma requer o meio ácido que os lisossomos oferecem para sair do vacúolo para o citoplasma (TARDIEUX, 1992). Durante esta transição, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, a forma replicante intracelular. Após nove ciclos de replicação binária, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, que continuam multiplicando-se, e terminam por estourar a célula parasitada. Isto libera um grande número de formas infectantes circulantes, que tomam a corrente sanguínea, e podem infectar células adicionais, e, quando ingeridos por

um inseto reduvídeo, o ciclo é completado (BRENER, 1973; BURLEIGH, 1995; HENRY, 2002).

1.1.2 EVOLUÇÃO CLíNICA

Aproximadamente uma semana após a contaminação com o parasita, aparece um local enrigecido com eritema e inchaço, o chamado chagoma de inoculação, acompanhado de linfadenopatia local seguido de mal-estar, febre, anorexia, edema facial e nos membros. Às vezes pode ocorrer adenopatia generalizada e leve hepato-esplenomegalia. Raras vezes há miocardite grave e, neste caso, a maior parte das mortes deve-se à insuficiência cardíaca. Mais raros ainda são os sintomas neurológicos; entretanto, meningoencefalite já foi descrita. Em quase todos os doentes as manifestações agudas desaparecem de forma espontânea, seguindo a fase assintomática ou indeterminada da doença (HARRISON, 2003).

A forma crônica da doença aparece anos ou até décadas após a infecção inicial, com quadros clínicos típicos de megaesôfago e megacólon em 5-10% dos infectados. Esta forma é desenvolvida pela denervação da musculatura lisa parietal (MACEDO, 1982). A cardiopatia chagásica é, no entanto, a forma mais séria desta doença e é a principal causa de mortalidade. A cardiopatia afeta de 20-30% dos pacientes. Trata-se de uma cardiopatia dilatada, progressiva e de natureza inflamatória, que pode levar a arritmias complexas, aneurisma ventricular, falha cardíaca, tromboembolismo e morte súbita (MACEDO, 1982; HIGUCHI, 1993).

Parasitologicamente, na fase aguda observa-se uma reação inflamatória local associada a células parasitadas, e muitas vezes parasitas nos tecidos e no sangue. No tecido cardíaco observa-se um infiltrado de células mono e polimorfonucleares circundando as fibras cardíacas (TORRES, 1942; ANDRADE,

1982). Com o desenvolvimento da resposta imune especifica celular e humoral contra o *T. cruzi*, o número de parasitas cai ate níveis muitos baixos - níveis indetectáveis por exame direto - mas a eliminação não chega a ser estéril (MARTIN, 1987). O controle da parasitemia determina a passagem para a fase indeterminada, onde a detecção do parasita é somente possível através de técnicas de amplificação como xenodignóstico, subinoculação, hemocultura ou PCR. E, finalmente, uma fração evolui para a fase crônica com as manifestações digestivas, cardíacas ou mistas (RASSI, 2000). No entanto, nesta fase o parasitismo pode aumentar após tratamentos imunosupressores ou diminuir com tratamentos quimioterápicos específicos (KOHL, 1982; BOCCHI, 1998).

1.2 O HOSPEDEIRO: O MODELO MURINO E O *TRYPANOSOMA CRUZI*

O HOSPEDEIRO: O MODELO MURINO

O *Trypanosoma cruzi* infecta naturalmente uma variedade de mamíferos pequenos que perpetuam seu ciclo; dentre eles estão o camundongo e o cachorro, entre outros. Nos camundongos, de forma semelhante à infecção em humanos, dependendo do background genético e da cepa infectante, desenvolve-se uma variedade de quadros que, na sua grande maioria, são acompanhados de uma fase aguda sintomática que evolui para a fase crônica. A primeira se caracteriza por uma parasitemia que pode ser intensa e levar até a morte do hospedeiro, ou leve, que permite a sobrevivência após uma fase de convalescença. A fase assintomática, por sua vez, passa para uma fase indeterminada e posteriormente para a fase crônica. Neste modelo, o *T. cruzi* infecta também quase todos os tipos celulares, sendo de maior importância os da musculatura cardíaca, musculatura esquelética e adipócitos(BRENER, 1973; BURLEIGH, 1995).

Os parâmetros de resistência e susceptibilidade foram amplamente estudados e, no que se refere ao hospedeiro roedor, verificou-se que as linhagens de camundongos C3H, AKR e A/J são altamente sensíveis. Isto de manifesta de tal forma que, como na grande maioria de cepas de *Trypanosoma cruzi*, desenvolvem um elevado índice de parasitemia e, na sua grande maioria, sucumbem precocemente à infecção aguda. No outro extremo encontram-se os camundongos considerados de alta resistência, que majoritariamente e, dependendo do inóculo, desenvolvem baixos índices de parasitemia e mortalidade. Entre estes, temos a linhagem C57BL/6 e, em grau intermediário, encontram-se o BALB/c e o CBA. Além disso, nos camundongos que sucumbem à fase aguda, o tratamento quimioterápico específico com benzonidazole (dose descrita) permite que haja tempo suficiente para montar uma resposta imune efetora adequada, de tal forma que o animal passa a controlar a fase aguda, sobrevivendo e passando para as fases indeterminada ou crônica (GRISSOTO, 1998). O presente grupo mostrou que o grau de controle do parasitismo na fase aguda determina a sobrevivência do hospedeiro e influencia a intensidade da patologia que se desenvolve na fase crônica (MARINHO, 1997).

O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* mostra grande heterogeneidade genética. Esta diversidade tem sido mostrada por diferentes metodologias, tais como marcadores enzimáticos ou polimorfismos genéticos detectados por técnicas de biologia molecular. A análise dos genes constitutivos mostrou que o tripanossoma pode ser dividido em dois grandes grupos: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (DEVERA, 2003). Entre as características mais relevantes dos tripanossomas do grupo I é o fato de serem mais encontrados em mamíferos silvestres, e o seu maior tropismo

por células do tecido muscular cardíaco e esquelético. Entre as cepas deste tipo, temos o *T. cruzi* Sylvio, isolado a partir de um paciente do Pará. Os tripanossomas do grupo II, na sua maioria, infectam mamíferos domésticos e o homem, e têm freqüentemente preferência por células fagocíticas mononucleares, sendo um exemplo destes o *T. cruzi* da cepa Y. Dentro de cada grupo existe uma grande variabilidade genética que pode determinar suas características infecciosas, como tropismo e virulência. Para esta pesquisa, *T. cruzi* das cepas Y e o clone Sylvio X10/4 estavam disponíveis, representantes de ambos os grupos do parasita. O camundongo C57BL/6, quando infectado por *T. cruzi* da cepa Y, apresenta parasitemias evidentes, que, dependendo do inóculo, pode ser alta e até levar à morte. No entanto, quando animais desta linhagem isogênica são infectados pelo *T. cruzi* da cepa Silvio X10/4, eles não mostram evidente parasitemia, passando diretamente à fase indeterminada (MARINHO, 2002).

Outro fator importante a se considerar é que as infecções naturais são, em geral, policlonais, tal como demonstrado por Vago e colaboradores, que observaram que, no mesmo hospedeiro humano, o *Trypanosoma cruzi* isolado do tecido cardíaco é diferente do *Trypanosoma* isolado do tecido digestivo. No entanto, ainda não é clara a relação em seres humanos entre morbilidade e as diferentes cepas do parasita (DI NOIA, 2003). Neste grupo de pesquisa, foi observado que a resposta imune frente ao *T. cruzi,* além de depender do background do hospedeiro, depende também do tipo de parasita que o infecta. Assim, a partir da inter-relação entre estes dois backgrounds genéticos, é que é montada uma resposta imune que evidencia uma variedade diversa de apresentações.

1.3 PATOGÊNESE

A doença de Chagas, apesar de ter sido descrito quase 100 anos atrás, ainda intriga os pesquisadores desta área, por não ter sido ainda possível montar e descrever o mecanismo patogênico exato da doença nos órgãos comprometidos, principalmente coração. Até o momento, em modelos animais e humanos, quatro mecanismos patogênicos têm-se desenvolvido para explicar a doença de Chagas cardíaca: disautonomia, distúrbio microvascular, injúria autoimune e dano dependente do parasita.

DISAUTONOMIA

Esta foi uma das primeiras teorias para tentar explicar as síndromes clínicas de megaesôfago, megacólon e falha cardíaca. Modelos experimentais demonstraram parasitismo neuronal, com periganglionite e anormalidades degenerativas nas células de Schwann e fibras nervosas. Estudos posteriores demonstraram diminuição parassimpática, mas também foi demonstrado que estas alterações eram inespecificas para a doença de Chagas. Patologicamente, se evidencia e se postula que a diminuição neuronal acontece predominantemente durante a fase aguda da infecção por principalmente três mecanismos: parasitismo direto de neurônios, degeneração causada por inflamação periganglionar e reação autoimune antineuronal. De forma consistente também se evidenciam anormalidades funcionais na regulação autônoma no coração e sistema digestivo. Invariavelmente acontece a diminuição de neurônios nas formas com megaesôfago e megacólon acompanhados de aperistaltismo, sendo esta considerada a principal causa do mecanismo patogênico da doença chagásica com envolvimento de órgãos digestivos. A disfunção autônoma em pacientes com

doença de Chagas pode ser detectada durante todas as fases da doença, incluindo a forma indeterminada e formas digestivas. Isto acontece porque os gânglios intramurais comprometidos são majoritariamente parassimpáticos, de acordo com a postulada teoria neurogênica parassimpático-priva. Em essência, esta teoria postula que um desequilíbrio autônomo prolongado pode eventualmente levar a uma cardiomiopatia induzida por catecolaminas. Como definitivamente a doença de Chagas é mais complexa, esta teoria não é aceita. No entanto, pelo fato de se encontrar em quase todos os comprometidos com a doença de Chagas, mesmo em fases muito precoces, é concebível que os distúrbios neurogênicos possam ser fatores contribuintes às complicações da fase crônica.

DISTÚRBIOS MICROVASCULARES

Estudos clínicos e experimentais sugerem anormalidades microvasculares que levam à isquemia miocárdica, e podem contribuir na patogênese da cardiopatia chagásica. Estudos necrópsicos de pacientes chagásicos mostram colapso difuso de arteríolas intramiocárdicas com lúmen constrito atribuído à proliferação intimal. As anormalidades microvasculares podem ser responsáveis por miocitólise difusa focal. Em biópsias também se demonstra intenso comprometimento da espessura da membrana basal capilar. Muitas investigações reforçam as anormalidades na vasodilatação e vasoconstrição a nível microcirculatório que poderiam explicar a distribuição focal de células necróticas e subseqüente fibrose reparativa intersticial encontrada em corações chagásicos. Tais anormalidades são similares às encontradas nos modelos experimentais de isquemia e reperfussão (distúrbios isquêmicos microvasculares transitórios de baixa intensidade e curta duração). Estudos experimentais e estudos clínicos apóiam fortemente o fato de que anormalidades estruturais e funcionais acontecem na cardiopatia chagásica. É

possível que a isquemia seja um fator independente , bem como um mecanismo patogênico auto-sustentado, que pode contribuir de forma importante para potencializar e amplificar a agressão inflamatória crônica ao coração.

MECANISMO AUTOIMUNE

Diversos investigadores independentes têm mostrado miocardite difusa com miocitólise e fibrose reparativa como lesões características da doença de Chagas, e com características de hipersensibilidade retardada no infiltrado inflamatório; este é composto principalmente de células mononucleares. Junto com a demonstração de deposição de imunoglobulinas e complemento no tecido miocárdio, estes achados constituem uma evidência de primeira linha para o envolvimento de fatores imunológicos.

Experimentalmente os camundongos infectados com *T. cruzi* mostram anticorpos específicos próprios para vários antígenos intrínsecos do tecido cardíaco, nervoso e outros, tais como proteínas estruturais de miosina cardíaca, desmina e actina. Camundongos infectados também desenvolvem anticorpos contra seus próprios receptores β1-adrenérgicos, m2-muscarínicos e receptores colinérgicos. Estudos recentes demonstraram autoimunidade celular direta, observada pela transferência passiva de células CD4 de camundongos crônicos infectados a camundongos singênicos não infectados, causando inflamação do tecido cardíaco (RIBEIRO DOS SANTOS, 2001). Células CD4+ de camundongos infectados reconhecem miosina cardíaca, mas não actina (RIZZO, 1989; LEON, 2001), e a imunização com cruzipaína induz autoanticorpos contra miosina cardíaca e esquelética, e contra receptores muscarínicos colinérgicos cardíacos que lavam a dano estrutural e anormalidades da condução (GIORDANENGO, 2000). Outro achado notável foi o desenvolvimento de autoanticorpos anticoração e alterações

funcionais do coração após imunização de BALB/c com peptídeos sintéticos protéicos P1 e P2 do ribossomo do *T. cruzi*. Em pacientes, o soro de 80% deles contem autoanticorpos contra neurônios e anticorpos funcionais contra receptores muscarínicos e adrenérgicos. O soro de pacientes com arritmia a produz em corações de coelho. Como são anticorpos funcionalmente ativos, também têm participação na incapacidade autônoma (GOIN, 1997). Em humanos também têm sido detectados anticorpos com reatividade cruzada entre as proteínas ribossomais P e o receptor β-adrenérgico. O anticorpo com reatividade cruzada contra a cadeia pesada da miosina cardíaca e a proteína B13 do *T. cruzi* é o mais freqüentemente encontrado no soro de pacientes com doença cardíaca definida, mais que os pacientes com a forma indeterminada (FERRARI, 1995; CUNHA-NETO, 1995). Além disso, os clones derivados de biópsia de pacientes com cardiomiopatia chagásica reconhecem com reatividade cruzada a miosina cardíaca e proteína B13 do *T. cruzi* (CUNHA-NETO, 1996). Vários mecanismos têm sido postulados como precursores de autoimunidade após a infecção do *T. cruzi*: exposição secundária de antígenos do tecido inflamado, sensibilização num ambiente inflamatório (bystander ativation), mímica molecular, ativação policlonal. Ainda assim a teoria da autoimunidade não consegue ser a melhor explicação para a patogênese da doença de Chagas, pois nem todos os que apresentam estas características desenvolvem a doença.

DANO MIOCÁRDIO DIRETAMENTE RELACIONADO À PERSISTÊNCIA DO PARASITA

Estudos patológicos iniciais mostram que os danos no coração e trato gastrointestinal da fase aguda se correlacionem com a intensidade da parasitemia e parasitismo do órgão alvo. Mas estudos histopatólogicos na fase crônica da doença mostram um grau muito baixo de parasitismo e uma difícil correlação topográfica entre foco inflamatório, ninho e amastigota de *T. cruzi* . Assim, o papel do parasita na gênesis do dano cardíaco durante a fase crônica foi questionado, principalmente com a evidência de uma típica miocardite linfocítica focal difusa com necrose miocitolítica com áreas onde não se encontram elementos parasitários. Entretanto, estes estudos utilizaram técnicas histológicas tradicionais agora consideradas altamente defasadas para identificar o parasita no hospedeiro infectado. Primeiro em modelos de Chagas animais e posteriormente em humanos, vários investigadores independentes, utilizando técnicas mais sensíveis na detecção do parasita como imunohistoquímica, reação em cadeia de polimerase e métodos de hibridação *in situ*, têm renovado o conceito de uma agressão miocárdica direta dependente da persistência do parasita no hospedeiro. Ainda que uma correlação clara entre carga parasitária tissular tenha sido demonstrada em experimentos animais, estes resultados não foram replicados em amostras de coração de pacientes (HIGUCHI, 1998). A persistência do parasita como fator patogênico também é apoiada por modelos experimentais que mostram a redução da carga parasitária local por tratamento com drogas tripanocidas com eventual diminuição da cardiomiopatia (TARLETON, 2008).

Outro conceito que suporta o parasitismo tissular na patogênese da doença cardíaca é a persuasiva evidência de especificidade por órgão na infecção parasitária que se reflete na expressão clínica da doença. O material genético do

parasita foi consistentemente encontrado no coração de pacientes que morreram de patologia cardíaca, da mesma forma que o DNA do *T. cruzi* foi encontrado no esôfago em pacientes que faleceram de causa esofágica, mas não foi encontrado neste órgão DNA de parasita em pacientes que morreram de doença cardíaca isolada. Finalmente, há evidências inquestionáveis de que indivíduos em etapa indeterminada após tratamento quimioterápico com drogas citostáticas, ou indivíduos com imunossupressão adquirida (AIDS), e após transplante de órgãos podem reativar a infecção por T. cruzi.

O mecanismo exato como o parasita causa dano tissular na fase crônica permanece desconhecido, ainda que a agressão miocitolítica direta seja uma possibilidade e a apoptose possa ser vista em estados avançados de falha cardíaca. A agressão autoimune não é excluída, sendo necessária a elaboração de uma teoria que integre todos os possíveis mecanismos patogênicos das teorias até agora apresentadas.

1.4 A RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSSOMA CRUZI*

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em seres humanos ou outros mamíferos produz alterações de grande magnitude no sistema imunológico. Os principais mecanismos imunológicos responsáveis pelo controle do *T. cruzi* são os anticorpos, uma potente resposta TH1 e uma resposta citolítica efetora mediada por células $CD8^+$. Os anticorpos têm um papel importante na remoção das formas extracelulares no sangue e tecidos. No camundongo, a resposta humoral protetora é mediada por anticorpos do isotipo IgG2a, preponderantes na proteção contra o parasita (FRANCHIN *et. al.,* 1997). O papel protetor das células $TCD4^+$ na infecção pelo *T. cruzi* depende da adoção de um padrão funcional TH1, padrão que é favorecido pela produção de citocinas como INF-gama e IL-12 durante a

resposta imune inata (KUMAR e TARLETON 2001). Finalmente, o controle do parasita intracelular depende em grande parte da atividade citolítica das células TCD8+ .

No entanto, o fato do *T. cruzi* ser um organismo geneticamente complexo, com capacidade de produzir milhares de proteínas antigenicamente distintas e possuir estágios do ciclo de vida diferentes com mudança do perfil antigênico, sugere que, apesar da resposta imune potente e diversificada, este parasita possui mecanismos para evadir a sua detecção e/ou destruição.

1.4.1 RESPOSTA IMUNE INATA

RECONHECIMENTO DO *Trypanosoma cruzi*

O reconhecimento do parasita causador da doença de Chagas pode operar em três níveis para detecção e controle da infecção.

1- Detecção e destruição direta do parasita por células do sistema imune inato, em particular macrófagos e células dentríticas;

2- Ativação de células dentríticas e macrófagos como potentes apresentadoras de antígenos e ativadoras de uma resposta imune adaptativa apropriada;

3- Detecção da infecção por células não hematopoiéticas, que são alvos primários da invasão do *T. cruzi* (TARLETON, 2007).

As células dendríticas e macrófagos, em repouso são células capazes de ser infectadas e ser lugar de replicação do *T. cruzi*. O reconhecimento e ativação destas células pelo parasita é realizado por TLR, sendo este o primeiro registro de reconhecimento por um PAMP de um patógeno eucariótico. As moléculas reconhecidas são as âncoras de GPI, que são membros de uma larga família de mucinas de superfície do trypomastigota. Estas podem se unir ao TLR-2, iniciando

a produção de IL-12, oxido nitrico, e TNFa pelos macrófagos (CAMPOS, 2001). A proteína Tc52 ativa também as células dendríticas pelo mesmo mecanismo (QUAISSI, 2002). Recentemente foi mostrado que o *Trypanosoma cruzi* também pode ser reconhecido pelo TLR-9, que reconhece DNA rico em CpG, este tendo os mesmos efeitos do reconhecimento pelo TLR-2 no macrófago DC, além de células B não primadas (BAFICA, 2006). *In vitro* foram identificados outros ligantes dos TLRs, cuja função *in vivo* não foi demonstrada, como o glicoinositolfosfolipido (GILP) de ceramida isolado de epimastigotas o qual pode interagir com o TLR4. Também foi proposta que a elevada presença de cruzipaína de *T. cruzi* poderia ativar diretamente as células dendríticas através da geração de quininas endógenas. Experimentalmente se observa que camundongos deficientes em receptores de bradicinina podem exibir um aumento da sensibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (MONTEIRO, 2006). O reconhecimento por outros tipos de sensores de patógenos intracelulares, como o receptor NOD-like (NLR) e o receptor RIG-like, que reconhecem PAMPs de baterias e vírus, tem ainda de ser investigado em organismos eucariontes intracelulares.

As APCs profissionais, quando expostas a *T. cruzi in vitro* mostram uma exposição de moléculas efetoras e pró-inflamatórias, dentre estas o IL-12 e interferons, sugerindo que a interação TLR-*T. cruzi* é importante para geração e direção da qualidade da resposta imune adaptativa e ativação de outros tipos celulares da resposta imune inata, como as NK. Experimentalmente se evidencia nos modelos com camundongos KO para MyD88 ou TLR9 uma deficiência para primar *in vivo* as TCD4 e uma diminuição na produção de citocinas inflamatórias (IL-12, TNF-alfa, INF-gama), além de aumento da parasitemia e mortalidade. (BAFICA, 2006; CAMPOS, 2004).

As células miocíticas e adipócitos são os alvos mais importantes para a replicação do *T. cruzi in vivo*, particularmente após a fase aguda da infecção. Vários estudos recentes mostram que células dos tecidos podem reconhecer a invasão do *T. cruzi* via TLR-PAMP. Assim, a exposição de cardiomiócitos a sobrenadante de cultura de *T. cruzi* resulta na ativação do NF-kB e produção de IL-1b aparentemente dependente do TLR2 (PETERSEN, 2005). Fenômeno semelhante foi descrito com fibroblastos, podendo as células hospedeiras participar ativamente do reconhecimento e a resposta imune contra este parasita.

MACRÓFAGOS

Os mecanismos efetores do macrófago contra o T. cruzi dependem da sua capacidade de produzir produtos intermediários de oxigênio e NO e do seu estado de ativação alem do tipo de *T. cruzi* (cepas mais ou menos virulentas). Inicialmente foram relacionados com sua capacidade de produzir produtos intermediários reativos de oxigênio (NATHAM *et. al.*, 1979). Estudos em macrófagos deficientes na produção de radicais de oxigênio quando ativados in vitro por IFN-gama e LPS mantiveram a capacidade de destruir parasitas que foram bloqueados por inibidores competitivos da L-arginina, o que impede o acúmulo de nitritos nestas culturas (GAZINELLI et. al., 1992). O oxido nítrico produzido por macrófagos ativados tem sido associado diretamente à atividade tripanocida nestas células, bem como a resistência à infecção (VESPA et. al., 1994). As citocinas modulam a atividade parasiticida dos macrófagos. Entre estes, o INFg tem um papel muito importante na resistência à infecção pelo *T. cruzi* (SILVIA, 1992). Na fase inicial da infecção, esta citocina pró-inflamatória limita a replicação do parasita por estimular a produção de oxido nítrico (NO) e direcionar uma resposta a Th1 (BRENER e GAZINELLI, 1997).

NK

A participação das NK contra o *T. cruzi* se evidencia em experimentos de depleção onde a ausência deste tipo celular leva a um aumento da parasitemia e mortalidade durante a fase aguda, apesar de a carga parasitária não variar entre os órgãos, acompanhados de diminuição da produção do INF-gama .

A principal contribuição das células NK se dá no inicio da infecção, já que este tipo celular é a principal fonte de produção inicial de INF-gama que ativaria as células macrofágicas antes que exista uma ativação das células T específicas, sendo esta a principal fonte de INF-gama nas fases mais tardias (CARDILLO, 1996). A ativação das NK é favorecida pelo IL-12, citocina produzida pelos macrófagos infectados. Junto com outras citocinas pró-inflamatórias, como TNFa e IL-1b, que criam um meio inflamatório que num primeiro momento favorece a ativação precoce das células TCD8 (GAZINNELLI et. al., 1993; HUNTER, 1996, GALVÃO DA SILVA, 2001). Além disso, a grande produção de INF-gama pelas NK participa da diferenciação das células Th0 em celullas Th1.

A ativação destas células pode acontecer por mecanismos dependentes e independentes de contato (LIEKE, 2006; THORSTEN, 2004). Em nível de órgão, evidencia-se uma participação diferenciada das células NK, sendo observada uma maior participação destas células e células NK não convencionais em nível de fígado na fase aguda da doença e durante a progressão da mesma (SARDINHA, 2006).

COMPLEMENTO

Os diferentes estágios do parasita têm diferentes sensibilidades a este mecanismo de defesa. As formas epimastigotas que são do hospedeiro invertebrado são muito sensíveis à lise pelo complemento, enquanto as formas do

hospedeiro vertebrado, como a tripomastigota e amastigotas, são resistentes à lise pelo complemento (KIERSZEMBAUM, 1976; KIPNIS 1985). Em modelos animais deficientes em C5 ou C4 não há alterações da parasitemia, patologia ou capacidade de retirar parasitas da circulação (UMEKITA, 2000). Apesar disso, camundongos sem C3 por tratamento com CVF (fator do veneno de cobra) têm um agravamento da infecção, mostrando que a opsonização pode desempenhar um papel importante no controle parasitário favorecendo a fagocitose dos parasitas. Mas também é importante fazer notar que o complemento pode favorecer a invasão de células do sistema fogocítico mononuclear, já que o *Trypanosoma cruzi* também pode invadir e infectar este tipo de célula (ALCÂNTARA e BRENER, 1978; BUDZKO, 1975).

ATIVAÇÃO POLICLONAL

Na fase aguda da doença de Chagas, assim como em outros tipos de doenças parasitárias e virais, tem se observado a ativação policlonal que leva a uma expansão inespecífica das células linfocitárias T e B, fenômeno que também foi descrito para a doença de Chagas (D'IMPERIO-LIMA, 1986; MINOPRIO, 1986). Os mecanismos imunológicos específicos que levariam a este fenômeno de expansão policlonal não são totalmente conhecidos. Alguns pesquisadores identificaram uma enzima do *Trypanosoma cruzi* com atividade mitogênica em linfócitos T e B chamada prolina racemase (REINA-SAN-MARTIN, 2000), Apesar de que a expansão policlonal num primeiro momento poderia fornecer células que reconheceriam especificamente alguns antígenos do parasita, a ativação policlonal poderia ser um mecanismo de escape do parasita em relação ao sistema imune. Inclusive, em alguns modelos animais, a redução da ativação policlonal diminui a

parasitemia e cardiopatia (MINOPRIO, 2001; CHAMOND, 2002; REINA SAN MARTIN, 2000).

1.4.2 RESPOSTA IMUNE ESPECIFICA

1.4.2.1 A RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Os anticorpos têm um papel importante, mas, após o estabelecimento da imunidade específica a manutenção da proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* é exercida em grande parte por anticorpos específicos através de vários mecanismos efetores. Entre eles destacam-se o bloqueio especifico evitando a invasão de novas células pelo parasita, opsonização facilitadora da fagositose e promotora de ativação de células fagocíticas, bem como mecanismos mediados de citotoxicidade mediada por anticorpo. Desta forma, os anticorpos, principalmente em camundongos dos isotipos IgG2a e IgG2b, são preponderantes na proteção contra o parasita (FRANCHIN et. al., 1997).

Paradoxalmente, a infecção pelo *T. cruzi* nos camundongos infectados ocasiona uma depleção de células B na medula óssea e uma marcada hiperplasia celular no baço (MINOPRIO, 2007). Em conseqüência de uma intensa ativação policlonal de linfócitos periféricos B e T, a ativação policlonal de células B pode ser particularmente importante na defesa inicial do hospedeiro contra uma rápida multiplicação do microorganismo. Isto acontece por que esta ativação contribui com anticorpos específicos de um amplo espectro de estruturas conservadas presentes nos patógenos, e também vice-versa: a ativação policlonal pode ser um mecanismo de escape por parte do microorganismo da resposta imune específica, pela diluição dos anticorpos patógeno-específicos, pelo irrelevante incremento dos

anticorpos. Outro potencial efeito deletério da ativação policlonal é a relevante produção de auto-anticorpos que levam a manifestações autoimunes durante a doença ou infecção crônica (ACOSTA-RODRIGUEZ, 2007). No caso da ativação linfocítica policlonal na infecção pelo *T. cruzi*, este tem sido proposto como um marcador de desregulação imunológica durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* e como um fator promotor do estabelecimento parasitário crônico (MINOPRIO, 1989). Em todos os casos, a conseqüência da ativação policlonal de células B é a hipergamaglobulinemia, com anticorpos específicos no soro para o parasita, auto-anticorpos e anticorpos não relacionados. Os anticorpos são também responsáveis pela sobrevida de animais susceptíveis na fase inicial da infecção e pela manutenção de baixos níveis de parasitemia, quase indetectáveis (MINOPRIO, 1988; KIERSZENBAUM, 1976; BRENER, 1986). Anticorpos auto-reativos contra endocárdio e nervos são detectados em humanos e camundongos (KIERSZENBAUM, 2003; TARLETON, 2003) e eles podem ser responsáveis por muitos dos eventos patológicos na doença de Chagas. A origem destes auto-anticorpos é controversa. Alguns pesquisadores sugerem que são conseqüência direta da ativação policlonal (REINA-SAN-MARTIN, 2003), valendo-se do número de células B auto-reativas que são observadas durante a infeção (CD5+B1cells). Por outro lado, alguns pesquisadores postulam que os auto-anticorpos reativos se originam por um mecanismo de mímica molecular, no qual células B reconhecem e respondem contra epítopos parasitários altamente similares com epítopos próprios. Isto leva à produção de anticorpos reativos contra o parasita e auto-antígenos (MOTRAN, 1998; GUIRDANENGO, 2000; GIRONES, 2005).

1.4.2.2 A RESPOSTA IMUNE CELULAR

AS TCD4 NA INFECÇÃO PELO T. cruzi

A participação das células TCD4 no controle da infecção parasitaria evidencia-se num primeiro momento com modelos experimentais de depleção com anticorpo anti-TCD4, onde durante a fase aguda tem aumento da parasitemia e mortalidade devido a uma menor ativação macrofágica, diminuição da produção de anticorpos, elevação da carga parasitária sanguínea e tecidual com redução do infiltrado inflamatório. Um fenômeno parecido é observado com o camundongo deficiente geneticamente de células TCD4 (RUSSO, 1988; ROTTEMBERG 1995). O papel protetor das células TCD4 na infecção pelo *T. cruzi* e dependente da adoção de um padrão Th1, que é favorecido pela produção de citocinas como INF-γ e IL-12. Durante a resposta imune inata (KUNAR e TARLETON, 2001). Quando a ativação das APCs se dá por sinais não específicos ou antígenos/patógenos que não proporcionam sinais de perigo, eles precisariam de uma "permissão" pelos linfócitos TCD4. No entanto, quando o antígeno ou patógeno por si mesmo oferece um forte sinal inflamatório, este poderia diretamente ativar e primar às células TCD8, desenvolvendo uma resposta independente de TCD4 (SHEDLOCK, 2003). Na infecção por *Trypanosoma cruzi*, devido a grande variedade genética deste parasita, que apresenta muitas cepas e clones com comportamento variados, nos variados modelos experimentais não sabemos se poderiam permitir comportamentos imunológicos na ausência de células TCD4.

1.5 LINFÓCITOS CD8$^+$ NA FASE AGUDA

Os linfócitos TCD8$^+$ participam no controle do parasita na fase aguda da doença de Chagas, o que se evidencia em experimentos de depleção com anticorpos anti-CD8 ou em experimentos com camundongos CD8-KO, onde a ausência de células TCD8$^+$ permite um aumento da parasitemia e mortalidade (RUSSO, 1996; TARLETON, 1990; ROTTENBER, 1993). Estes experimentos foram realizados com camundongos resistentes e susceptíveis e com parasitas das cepas Brazil (TARLETON, 1990) ou Tulahuen (ROTTENBERG, 1993). O efeito protetor das células TCD8$^+$ aconteceria por reconhecimento direto de peptídeos do parasita apresentados por MHC-I nas células infectadas. Assim, camundongos deficientes em TAP-1, ou B2-microglobulina, quando infectados pelo *T. cruzi*, apresentam aumento de parasitemia e mortalidade (TARLETON 1992; KUMAR 1998). O mecanismo citolítico das células TCD8$^+$ seria mediado por perforina, apesar de que outros mecanismos efetores, tais como a interação Fas/Fas-L, ou o TNF, também poderiam participar. A participação da perforina foi mostrada em experiências de infecção em camundongos perforina-KO, onde se observa um aumento da mortalidade e necrose de cardiomiócitos. No entanto, não existe unanimidade entre os pesquisadores a respeito da necessidade absoluta desta molécula. Outro mecanismo citolítico é a expressão de Fas-L. O aumento desta molécula nas células TCD8$^+$ foi detectado durante as fases aguda e crônica (BUCKNER, 1997; HENRIQUES-PONS, 2002; NAGATA, 1995; GISLAINE MARTINS, 2002). As células TCD8$^+$ também poderiam reconhecer diretamente o *T. cruzi* através do TLR-2, mas este tipo de interação não foi ainda pesquisado.

Quando ativadas, as células TCD8$^+$ também produzem citocinas pró-inflamatórias, como INF-gama e TNF-alfa, que potencializam a ação das células

macrofágicas, NK e outras, sendo mais evidente esta função em fases posteriores da doença (JACOBS, 1996).

O papel protetor das células $CD8^+$ poderia ser diferente, dependendo do lugar de atuação. Assim, enquanto que as células $TCD8^+$ circulantes e do baço do animal com infecção aguda são totalmente funcionais, existem indícios de que a ativação das $TCD8^+$ infiltrantes pode estar comprometida, principalmente no músculo esqueletico, com menor produção de INFg (ANTUNEZ, 2001; ZHANG, 1996). No entanto, na ausência de células $TCD8^+$ já foi observado maior lesão hepática (RUSSO, 1996), e resultados deste grupo mostram que a ausência de células $TCD8^+$ aumenta o número de ninhos de amastigotas no fígado na fase aguda, analisando a intensidade das lesões hepáticas comparada às do animal com sistema imune íntegro (SSERA *et. al.,* 2006).

1.6 LINFÓCITOS $CD8^+$ NA FASE CRÔNICA

A fase crônica da Doença de Chagas humana é caracterizada por baixo parasitismo e evolução lenta, e compreende as formas clínica indeterminada e crônica. Nos camundongos que conseguem passar à fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* é evidente o incremento da celularidade no baço com acúmulo de células $TCD8^+$, provável conseqüência da persistência antigênica em baixo nível (parasitismo residual). No entanto, apesar deste aumento, o papel das células $CD8^+$ na fase crônica da infecção ainda é controverso. Experimentos de depleção de células $TCD8^+$ na fase crônica por tratamento com anticorpos anti-CD8 não resulta em mortalidade ou recrudescimento da parasitemia, sugerindo que nesta fase as células $TCD8^+$ não são essenciais para o controle do parasitismo (TARLETON, 1990). No entanto, estes resultados não implicam que as células

TCD8$^+$ não tenham um papel protetor na fase crônica, mas sugerem que a resposta imune mediada por anticorpos e células TCD4$^+$ pode ser suficiente para controlar o parasita. Além disso, em alguns modelos experimentais, o papel das células TCD8$^+$ parece mais importante, até mesmo fundamental. Assim, a depleção de células TCD8$^+$ reverte a imunidade induzida pela vacinação com a cepa avirulenta de *T. cruzi* cepa Corpus Christi.

Na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, as células esplênicas TCD8$^+$ apresentam um fenótipo efetor/memória, uma vez que mostram um aumento da expressão de CD44 e CD11a, e cerca de 90% regulam negativamente a expressão de CD62L, fenótipo compatível com o de células experimentadas. Nesta fase da infecção, as células TCD8$^+$ esplênicas produzem INF-gama em resposta ao antígeno de *T. cruzi* e, na sua grande maioria, mantém conservadas as suas capacidades proliferativa e citolítica (MARTIN, 2005). Apoiando a possibilidade das células TCD8$^+$ exercerem um papel protetor, tanto em pacientes chagásicos crônicos (WIZEL *et. al.*, 1998) como em camundongos crônicos (NICKELL *et. al.,* 1993; WIZEL *et. al.*, 1997) são detectadas células TCD8$^+$ específicas contra células infectadas ou pulsadas com peptídeos de *T. cruzi*, evidenciando o seu potencial citotóxico. No entanto, nestes casos a citotoxicidade só pode ser revelada após re-estimulação *in vitro*, sugerindo que a freqüência *in vivo* de células efetoras CTL anti- *T. cruzi* é baixa.

Em pacientes com doença de Chagas, 40% das células infiltrantes no coração são linfócitos T com predominância das células T CD8$^+$ em relação às células TCD4$^+$ (razão 2:1). A prevalência de células TCD8$^+$ parece estar relacionada à existência de antígeno de *T. cruzi* em cardiomiócitos (HIGUCHI *et. al.,* 1993; HIGUCHI *et. al.,* 1997). Também foi observado a presença de TNF-a e granzima-A no coração de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, o que sugere que os

linfócitos T $CD8^+$ infiltrantes poderiam ser ativados para exercer seu potencial citolítico através destas moléculas (REIS *et. al.,* 1993). Em coração de pacientes chagásicos foi encontrado um aumento na expressão dos receptores CCR2 e CXCR3, além de expressão gênica de quimiocinas indutíveis por IFNg como MCP-1, IP-10 e MIG (CUNHA-NETO, 2005), o que poderia contribuir para a migração de células do sistema imune, e entre estas os linfócitos $TCD8^+$ no coração. Também se detectou a expressão de IL-15R e IL-7 no tecido cardíaco, sugerindo que a produção local de IL-15 e IL-7 poderia estar envolvida na manutenção e predominância das células $CD8^+$ (FONSECA, 2007).

As células $TCD8^+$ infiltrantes do coração chagásico que apresentam um fenótipo $CD62L^{LOW}$ $LFA1^{HIGH}$ $VLA4^{HIGH}$, um fenótipo compatível com células efetoras/memória também foi descrito nas células T $CD8^+$ isoladas de tecido muscular esquelético de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi,* mas que possuem uma capacidade limitada de citotoxicidade e de produção de IFN-gama quando comparadas com células $TCD8^+$ do baço dos mesmos animais (LEAVEY e TARLETON, 2003). Em relação à eventual deficiência de produção de IFN-gama no infiltrado cardíaco, existe a possibilidade de que outra citocina pró-inflamatória, o TNF-alfa, possa estar exercendo um efeito protetor, visto o alto número de células produtoras desta citocina no infiltrado cardíaco (ZHANG, 1996).

1.7 DISFUNÇÃO DE CELULAS $TCD8^+$

Na fase aguda, já existem indícios de alteração do estado de ativação das células $TCD8^+$. Na fase crônica, as células $TCD8^+$ isoladas de músculo esquelético de camundongos B6 infectados com parasitas da cepa Brazil de *T. cruzi*, apesar de

terem um fenótipo de memória/efetor ($CD44^{HIGH}CD11^{HIGH}Ly6C^{HIGH}$ e $CD62^{LOW}$), mostram uma significativa diminuição da sua função efetora, quando comparada à das células esplênicas dos mesmos camundongos. Assim, a estimulação *ex vivo* com anti-CD3 aderido na placa resulta na produção de INF-gama por 55% das células $CD8^+$ do baço de camundongos cronicamente infectados, enquanto isto acontece somente em 2% das células $TCD8^+$ derivadas do músculo. As células $CD8^+$ isoladas do coração de camundongos C3H/HeSnJ infectados cronicamente também têm reduzida produção de INFgama quando comparada à das células do baço. Logo, esta disfunção não é limitada apenas ao músculo esquelético. Mais ainda, a atividade citolítica destas células também está comprometida se comparada a atividades celulares TCD8 no baço. A causa da reduzida atividade funcional das células $TCD8^+$ derivadas de músculo não é clara, uma vez que elas não mostram características comuns a células em anergia, ou a células apoptóticas. E elas não expressam o receptor CD94/NKG2A, que é expresso em níveis elevados em células $TCD8^+$ não funcionais (TARLETON, 2002). As células $TCD8^+$ do infiltrado do músculo esquelético de camundongos infectados com *T. cruzi* praticamente não produzem INF-gama apos estimulação policlonal *in vitro* por anti-CD3, sugerindo uma disfunção inerente aos linfócitos derivados do músculo (DWELLING, 2003).

A co-estimulação *in vitro* por curto tempo das células T $CD8^+$ derivadas de músculo com anti-CD28 ou APCs acessórias, com ou sem IL-2 ou IL-12, não restaura sua atividade funcional, sugerindo que a disfunção é irreversível.

Os linfócitos $TCD4^+CD25^+$ não participam na supressão da função das células $TCD8^+$ no tecido muscular (KOTNER, 2006). Na infecção pelo *T. cruzi* de camundongos DNRII, que carecem de receptor para TGF-beta exclusivamente nos linfócitos T, as células infiltrantes do músculo exibem a mesma disfunção nas

células TCD8$^+$ do animal WT, indicando que esta citocina não está envolvida na deficiência na produção de INF-gama. Mais ainda, como o TGF-beta participa do desenvolvimento da sub-população de células T CD4$^+$ descrita como TH17, e como no camundongo DNRII não há geração de TH17, estes resultados mostram indiretamente que este subtipo funcional de células TCD4$^+$ não contribui à inflamação, nem à disfunção das células CD8$^+$ na infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 2007).

1.8 REGULAÇÃO NEGATIVA DE RECEPTORES E CO-RECEPTORES NA DOENÇA DE CHAGAS E OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS

Na fase crônica da doença de Chagas evidencia-se um aumento absoluto das células TCD8$^+$. Resultados do grupo de pesquisa em questão mostraram que as células TCD8$^+$ do camundongo crônico regulam negativamente os seus receptores e co-receptores, adquirindo um fenótipo CD8^{LOW}TCR^{LOW}CD3^{LOW}CD45RABC^{LOW} (GRISOTTO, 1998). Esta modulação negativa acontece em aproximadamente 40-60% das células TCD8$^+$ esplênicas no inicio da fase crônica, permanecendo o resto com o fenótipo inicial CD8^{HIGH}TCR^{HIGH}CD3^{HIGH} CD45RC^{HIGH}, salvo uma pequena fração com fenótipo CD8^{HIGH}TCR^{HIGH}CD3^{HIGH} CD45RC^{LOW}. Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, a regulação negativa de receptores e co-receptores não acontece na fase aguda e já tinha sido anteriormente descrita por Lopes e colaboladores para a molécula TCD8$^+$ (LOPES, 1995).

No modelo murino de infecção crônica pelo *T. cruzi* as células CD8^{LOW} CD45R^{LOW} apresentam um fenótipo de células sensibilizadas (CD44^{HIGH}CD62L^{HIGH}), enquanto que as células CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH} mostram um

fenótipo heterogêneo. A regulação negativa das células $CD8^+$ acontece também do sangue, cavidade peritoneal e fígado, mas não no linfonodo. A maioria das células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ não tem expressão aumentada de CD69 e CD25, nem CD11b, sugerindo que se encontram num estado de repouso. *In vitro* elas não secretam citocinas espontaneamente, e quando estimuladas com macrófagos infectados, as células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ respondem com produção de INF-gama. Na estimulação com antiCD3/CD28, as células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ produzem INF-gama e TNF-alfa mas não produzem IL-10 ou IL-4 (GRISOTO, 1999). Além disto, as células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ têm uma maior expressão de mRNA de INF-gama e granzima B quando comparados às células $CD8^{HIGH}$ $CD45R^{HIGH}$. Mais ainda, as células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ expressam níveis maiores de mRNA dos receptores de quimiocinas CCR2 CCR5 e CX3CR1, e menor expressão de mRNA de CCR7 e CCR9, junto a um aumento significativamente maior das quimiocinas RANTES, MIP1-alfa e MIP1-beta (GRISOTTO, 2003).

O acúmulo de linfócitos $CD8^{LOW}TCRab^{LOW}$ foi anteriormente observado em situações de tolerância a antígenos próprios. Assim, em camundongos machos transgênicos ao antígeno H-Y, as células $CD8^+$ que escapam da deleção tímica apresentam baixa expressão de CD8 e TCR (ROCHA e VON BOEHMER, 1991). Fenômeno semelhante foi também observado em um modelo transgênico de expressão do antígeno K^b em hepatócitos (FERBER *et. al.,* 1994). Em outro estudo, camundongos que sobrevivem a transplantes renais alogêneicos também regulam negativamente a expressão do TCR (MANNON *et. al.,* 1998). Nestes modelos, a diminuição da expressão do TCR na superfície celular está associada ao bloqueio do reconhecimento antigênico ou das funções imunes associadas, uma vez que o limiar de ativação de células T está severamente comprometido pela redução do número de moléculas TCR/célula (VIOLA e LANZAVECCHIA, 1996). No entanto,

sabe-se que nem todas as funções celulares perdem-se simultaneamente após a regulação negativa destas moléculas, e em alguns modelos experimentais, células $CD8^+$ com expressão diminuída de TCR deixam de produzir IFN-gama mas preservam a sua atividade citotóxica (BRAWAND *et. al.*, 1998; VALITUTTI *et. al.*, 1996).

Além das descrições no contexto de tolerância, foi verificado o aparecimento de células $CD8^{LOW}TCRab^{LOW}$ em camundongos imunizados com células tumorais singênicas infectadas com o vírus Moloney da leucemia murina (MMLV), onde as células reguladas negativamente apresentam potencial citolítico contra células alvo carregadas com um peptídeo imunodominante do vírus (BRAWAND *et. al.,* 1998). Em outro trabalho, nos animais DBA/2 imunizados com células tumorais singênicas transfectadas com o antígeno de histocompatibilidade humano HLA-CW3 (WALKER *et. al.*, 1995). Parte das células $CD8^+$ destes animais possuem fenótipo $CD8^{LOW}TCRab^{LOW}CD45RB^{LOW}$, $CD44^{HIGH}$, $CD49d(VLA\text{-}4)^+$ e $CD62L^-$ e apresentam atividade citotóxica direta contra as células transfectadas não sendo portanto anérgicas ou tolerantes. Neste último caso, as células negativamente reguladas estão presentes principalmente no baço e sangue periférico, mas encontram-se em números reduzidos nos linfonodos.

Na infecção crônica pelo *T. cruzi*, assim como em outros modelos de doença crônica, a regulação negativa de receptores, co-receptores e outras moléculas poderia ser um mecanismos de controle, que poderia estar envolvido na patologia desta doença. No entanto, o fenômeno da regulação negativa de receptores e co-receptores é controverso, já que em alguns modelos experimentais ele é associado a um estado anérgico, e em outros observa-se preservação de algumas funções efetoras. Assim, torna-se necessário no modelo murino de doença crônica de Chagas um estudo fenotípico das células $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$. Além disso, o

significado funcional desta hetereogenidade nas células $CD8^+$ precisa ser estudado, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de ser necessário o estudo dos fatores requeridos para a indução do fenótipo $CD8^{LOW}$ $CD45R^{LOW}$ nas células $CD8^+$. Estes estudos nos permitirão conhecer melhor a resposta imune especifica mediada por células $CD8^+$ que não se mostra suficiente para o controle completo (estéril) do parasita.

2 OBJETIVOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E ATIVIDADE FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS T CD8+ DO CAMUNDONGO CRÔNICO INFETADO COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Complementar a análise fenotípica das células com o fenótipo $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$; mais especificamente, determinar se as células $CD8^{low}$ são células T de memória efetoras e ver a expressão de novas moléculas.

Funcionalmente determinar a resposta *in vivo* das $CD8^{low}$ ao desafio específico ou inespecífico (parasita ou Poli-IC). Determinar *in vitro* os mecanismos que poderiam estar se processando (estimulação com anti-CD3/anti-CD28).

2.2 ANALISE DOS REQUERIMENTOS PARA A INDUÇÃO DOS LINFÓCITOS COM FENÓTIPO T $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$

Determinar se a geração das células com o fenótipo $CD8^{Low}$ $CD45RC^{Low}$ depende da participação de algumas determinadas populações/mediadores da resposta imune, como citocinas (IL-12, INFg), a presença de certas populações celulares (CD4, IRF-1), ou moléculas relacionadas na resposta imune (iNOS, CD28).

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos fêmeas das linhagens isogênicas A/J, C57BL/6 e animais deficientes (knock out, KO) para IL-12p40, INFg, iNOS, CD28 e CD4 (todos no background de C57BL/6) e IRF-1 background SV-129 com 8 a 12 semanas de vida, mantidos em condições livre de patógenos (SPF), foram obtidos do Biotério de animais isogênicos do Depto de Imunologia, ICB, USP. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética.

3.2 PARASITAS

Trypanosoma cruzi da cepa Y foi originalmente obtido no Centro de Imunologia do Instituto Butantã (SP). A manutenção *in vivo* dos parasitas foi feita por meio de passagens semanais do sangue infectado com 1 X 10^5 parasitas para camundongos A/J (repique).

Trypanosoma cruzi da cepa Sylvio (clone X10/4) foi originalmente obtido na Escola Paulista de medicina (UNIFESP).Os parasitas foram mantidos por meio de passagens semanais em monocamadas de células epiteliais de rim de macaco LLC-MK_2 (American Type Culture Collection- ATCC-CCL7.1).

3.3 ANTÍGENO

Para obtenção de antígeno de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y e da cepa Sylvio clone X10/4, os parasitos foram mantidos em cultura por passagens semanais em culturas de células LLC-MK_2. O sobrenadante dessas células contendo os parasitas foi coletado diariamente do 5ª ao 9ª dia de infecção, lavado em PBS estéril e foi

submetido a 10 ciclos de congelamentos e descongelamentos rápidos (em nitrogênio líquido e banho-maria a 37 ^{o}C) para rompimento da membrana plasmática do parasita e a liberação de antígeno.

3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A infecção dos camundongos com o *Trypanosoma cruzi* da cepa Y foi feita por via intra-peritoneal com $1x10^3$ tripomastigotas sanguícolas obtidos do sangue dos camundongos de repique.

A infecção dos camundongos com o *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio clone X10/4 , foi feita por via intra-peritoneal com $1x10^6$ tripomastigotas obtidas da cultura em monocamadas de células LLC-MK_2.

3.5 PARASITEMIAS

O número de parasitas foi determinado pela observação microscópica em hemocitômetro (câmara de Neubauer) de 5 ml de amostra de sangue obtidas pela micro-secção da cauda dos animais, segundo método descrito por Brener (1962).

3.6 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO ESPECÍFICO (BENZONIDAZOL)

Com o objetivo de permitir a progressão da fase aguda até a fase crônica nos animais que são sabidamente susceptíveis a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* da cepa Y, foi realizado um tratamento em dose única de 1g/kg de peso corporal do antiparasitário N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, (benzonidazol - Rochagan - Roche), diluído em água, via intragástrica, no oitavo dia de infecção.

Camundongos não infectados também foram tratados de forma similar (grupo controle + benzonidazol).

3.7 MEIOS DE CULTURA

Para o processamento de células foram utilizados os meios de cultura DMEM ou RPMI 1640 contendo 25 mM de HEPES e 3% de soro fetal bovino – SBF (Cultilab). Para os experimentos de cultura de células foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 suplementado contendo 25 mM de HEPES, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 g/mL), 2-mercaptoetanol L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1mM) e 5% de SBF (soro bovino fetal). Todos os reagentes foram adquiridos da companhia Life Technologies (Rockville, MD, EUA). Para o processamento de células nos ensaios de citometria de fluxo foi usado tampão PBS suplementado com 1% de SBF e 0,05% de azida sódica (Sigma, MO, EUA).

3.8 ANTICORPOS, CONJUGADOS FLUORESCENTES E REAGENTES

Foram utilizados nos experimentos os seguintes anticorpos dos respectivos clones: Anti-CD4 (H129.19), anti-CD8a (53-6.7), e anti-CD45R – B220 (RA3-6B2), anti-CD45RB (clones 16A e 23G2), anti-CD45RC (DNL-1.9,), anti-IFN- (XMG 1.2), anti-IL10 (JES5-16E3), anti-IL4 (11B11), anti-TNF- (MP6XT22), anti-CD16/CD32 (anti-receptor Fc III/II– Fc Block) (2.4G2), anti-MHC classe I (H-2K^k (AF3-12.1), anti-CD5 (53-7.3), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD25 (7D4), anti-CD3 (145-2C11), anti-CD28 (37.51), anti-CD11b Mac-1;(M1/70), anti-NKG2, CD127, PD1, PDL1, anti-anexina V conjugados a FITC, PE, CyChrome ou Fitc obtidos da companhia Pharmingem. Em alguns experimentos foram utilizados os conjugados fluorescentes estreptoavidina-ficoeritrina (SA-PE) ou estreptoavidina-cychrome (SA-Cy). Anticorpos anti-CD62L (MEL-14) e anti-CD44 (KM-201), para os

experimentos de detecção intracelular, foram incluídos no kit de permeabilização celular Cytofix/Cytoperm (Pharmingen), contendo Stop Golgi (monensina). Os reagentes: Iodeto de propídeo (P.I. - Sigma) e 7-aminoactinomicina D (7AAD - Sigma) foram usados para verificar a viabilidade celular através de citofluorimetria de fluxo (FACS).

3.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

As células esplênicas foram obtidas após ruptura mecânica do baço dos camundongos. As células foram lavadas e ressuspendidas em meio RPMI 3%SBF, posteriormente submetido por dos minutos a tampão de lise. Novamente lavadas, as células foram quantificadas numa concentração de $1x10^7$/ml para marcações de citometria de fluxo; elas foram ressuspendidas em tampão de FACS e para os ensaios de estimulação foram ressuspendidas em meio RPMI completo.

3.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Células do baço foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em U (Corning) na concentração de 0,5 x 10^6 células/100 μL/poço. Após a centrifugação (5 minutos, 4 °C, 250 g), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados os anticorpos anti-CD16/CD32 (Fc Block) (0,5 μg/0,5 x 10^6 células). As placas de cultura foram mantidas a 4 °C por 20 minutos. Posteriormente, após duas lavagens foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos FITC, PE, CyChrome ou APC, em concentrações ótimas, previamente estabelecidas. Novamente, as placas de cultura foram mantidas a 4 °C por mais 30 minutos em local com pouca luminosidade (geladeira). A seguir, as células foram lavadas com uma solução de PBS suplementada com 1% de SBF e 0,05% de azida

sódica por 3 vezes e ressuspendidas em 0,5 ml de uma solução de PBS em tubos de poliestireno de fundo em U (Falcon - Becton Dicikinson). As suspensões de células marcadas foram analisadas em um citofluorímetro de fluxo (FACScan - Becton Dicikinson), de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4) e a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso. A distribuição de FSC e SSC das células foi analisada a fim de determinar células pelo tamanho, bem como sua granulosidade e posteriormente a marcação especifica de cada anticorpo.

3.11 DETECÇÃO INTRACELULAR DE CITOCINAS POR CITOFLUORIMETRIA DE FLUXO

Os ensaios de detecção intracelular de citocinas em células $TCD8^+$ foram realizados conforme protocolo sugerido no kit de permeabilização Cytofix/Cytoperm (Pharmingen). Em suma, após o isolamento dos esplenócitos, estes foram lavados por duas vezes com meio de cultura RPMI suplementado. Então, 1 X 10^6 células foram diluídas em 0,2 ml de meio de cultura RPMI suplementado contendo Stop Golgi em concentração sugerida pelo fabricante (monensina) para bloquear a secreção das citocinas ou produtos presentes no complexo de Golgi. As células foram incubadas em placas de 96 orifícios de fundo chato (Becton Dicikinson), por 4 a 6 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após a incubação, as células foram lavadas por 2 vezes e, posteriormente, foi feita a marcação extracelular como descrito nos itens anteriores. Após esta etapa, as células foram fixadas com Cytofix como indicado pelo fabricante (Pharmingen) por 20 minutos, antes da permeabilização celular. Após esta etapa, as células foram permeabilizadas através de 2 lavagens com Cytoperm (Pharmingen) para completar o processo. A seguir, as células foram incubadas com concentrações ideais de anticorpos específicos para cada citocina. Então, as

células foram lavadas com Cytoperm (por 2 vezes) e ressuspendidas em uma solução de PBS suplementada com 1% de SBF e 0,05% de azida sódica. A captação do número de eventos foi de 50000 na janela (gate) de células com tamanho de linfócitos (R1).

3.12 GERAÇÃO DE MACROFAGOS INFECTADOS PELO *T. CRUZI* A PARTIR DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA PELA ADIÇÃO DE M-CSF

Células extraídas de medula óssea do fêmur de camundongos A/J normais foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (Sigma-Aldrich) durante 7 dias, em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado contendo 30% (v/v) do sobrenadante de células L929 (fonte de M-CSF) (GERMANN *et. al.*, 1992). A cada 3 dias as células eram lavadas e as células não aderentes eram retiradas, e o meio renovado. Após 9 dias, as culturas continham predominantemente macrófagos aderentes. A seguir, os macrófagos foram retirados das placas de 6 poços pela adição de PBS estéril gelado com raspagem do fundo dos poços (utilizando um raspador"cell scraper" - Costar) sendo então transferidas para placas de 96 poços (Costar, NY, EUA) na concentração de 2 X 10^5 células/poço. A seguir os macrófagos foram infectados por 6 horas com 8 X 10^5 *T. cruzi* cepa Y, formas tripomastigotas de cultura na proporção de quatro parasitos por cada célula (4:1). Após este período, os macrófagos foram lavados e incubados por 18 horas antes dos experimentos de co-cultura com esplenócitos de baço de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi.*

3.13 ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA

Os animais foram anestesiados, sangrados por punção cardíaca até a morte e seus órgãos foram imediatamente coletados e fixados por 24horas em solução de formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente processados para inclusão em blocos de parafina. O coração foi cortado sagitalmente em duas partes, cada uma contendo as quatro cavidades. Foram obtidos cortes consecutivos de coração, fígado e do músculo esquelético (quadríceps), corados por hematoxilina-eosina posteriormente analisados em sua totalidade por microscopia óptica.

3.14 ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS SANGÜÍNEOS

Cada camundongo foi anestesiado com éter e em seguida foi sangrado por punção intracardíaca com uma seringa contendo 50 ul de citrato. Um volume de 0,5 ml de sangue foi misturado com 1,5 ml de meio de cultura e transferido para um tubo cínico de 15ml contendo 3ml de Percoll a 67,5%. O tubo foi centrifugado a temperatura ambiente por 30minutos a 1000 g. Em seguida as células que estavam na interface formada entre o sangue diluído e o Percoll foram retiradas com ajuda de uma pipeta de 1ml. Foi adicionado posteriormente 10 ml de meio, e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 4 °C, 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 0,5 ml de meio de cultura, e as células foram posteriormente contadas e plaqueadas.

3.15 ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS DA MEDULA ESPINHAL

O isolamento de células do sistema nervoso central (medula espinhal) foi realizado segundo o método descrito : Cada camundongo foi anestesiado com éter e após sangramento para isolamento de leucócitos sangüíneos, os órgãos foram preparados para dissecção e posterior obtenção de amostras para histologia. Foi feita dissecção da medula espinhal desde o segmento cervical ate o segmento sacro. Esta foi cuidadosamente cortada em pedaços pequenos que foram transferidos a um tubo cônico de 15 ml contendo 3 ml de meio RPMI com colagenase (Sigma Chemical Co, MO, EUA), na concentração de 1 mg/ml. O tubo cônico foi mantido sob agitação manual durante 20 minutos a 37 °C em banho Maria e posteriormente foram adicionados mais 2 ml de colagenase, por 20 minutosutos. Após esse tempo, o restante do tecido foi dissolvido com um pipetador automático ate obter uma suspensão homogênea. Após lavado com meio RPMI completando ate 45 ml do tubo cônico de 50 ml, e centrifugado como uma amostra normal a 1200 rpm por 5 minutos, e descartado o sobrenadante a suspensão que ficou no tubo cônico é ressuspensa em 6ml de RPMI 1% SBF, para posteriormente ser colocada cuidadosamente em um dois tubos cônicos de 15ml com 3ml de percoll 65% na camada inferior, 3ml de Percoll 35% na camada intermédia, o tubo e centrifugado a temperatura ambiente por 30 minutos a 1000 g. Em seguida as células que estavam na interface formada entre as duas camadas de Percoll foram retiradas com ajuda de uma pipeta de 1ml. Adicionou-se, posteriormente, 10 ml de meio, centrifugadas por 10 minutos, 4 °C 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspenso em 0,5 ml de meio de cultura, as células foram posteriormente contadas e plaqueadas.

3.16 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DA CAVIDADE PLEURAL

A cavidade pleural foi injetada com diferentes agentes (antígeno de trypanosoma ou células dendríticas infectadas com *Trypanosoma cruzi* de cultura) num volume de 200 µl pela parede torácica na linha axilar do camundongo na altura da 8ª costela no hemitórax direito, tendo todo o cuidado para não perfurar o pulmão e não furar os vasos sangüíneos da sub-costela. Após o tempo do desafio estipulado, dependendo do protocolo experimental (24h, 48h ou 72h), os camundongos foram anestesiados com éter e seguem a necessidade do experimento sangrados para isolamento de linfócitos sangüíneos. Posteriormente eles foram sacrificados e tiveram seus órgãos retirados os órgãos para estudos histológicos. Especificamente é feita a dissecção superficial da cavidade torácica e abdominal, retirando-se toda a pele e tecido adiposo. A cavidade abdominal é aberta totalmente, expondo o músculo diafragmático onde injeta-se e aspira-se realizando um lavado pleural com um volume de 2ml por três vezes. O líquido obtido (lavado pleural) é ressuspenso em meio com RPMI e posteriormente centrifugado a 1200 rpm por 5 min. Desprezado o sobrenadante, o pellet é então ressuspenso em 1ml de RPMI. As células são então contadas e distribuídas segundo o número necessitado para cada experimento.

3.17 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como media aritmética +/- desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 OS CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFETADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI* DAS CEPAS Y OU SILVIOX10/4 APRESENTAM AUMENTO DAS CÉLULAS CD8$^+$

Os camundongos C57BL/6 na infecção com 1000 parasitas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y desenvolvem uma fase aguda com parasitemia patente ao redor do nono dia após infecção, que posteriormente é controlada com o desenvolvimento da resposta imune específica passando a fase crônica sem nenhum tratamento parasiticida especifico. Os camundongos na fase aguda têm um aumento de linfócitos T CD8 , T CD4 e células B (expansão policlonal) no baço, mas na fase crônica os linfócitos T CD4 e células B220 tendem a retornar a valores semelhantes da pre-infecção, mais os linfócitos T CD8 continuam em números elevados (Figura 1). Na infecção por *Tripanosoma cruzi* da cepa Silvio X10/4 não se observa uma fase aguda propriamente dita, uma vez que não há parasitemia patente e todos os camundongos imune-competentes sobrevivem a infecção passando a fase crônica sem necessidade de tratamento, o comportamento das distintas populações celulares no baço na infecção com *T. cruzi* da cepa Silvio X10/4 e semelhante a da infecção com *T. cruzi* cepa Y, mantendo um aumento de linfócitos T CD8 na fase crônica.

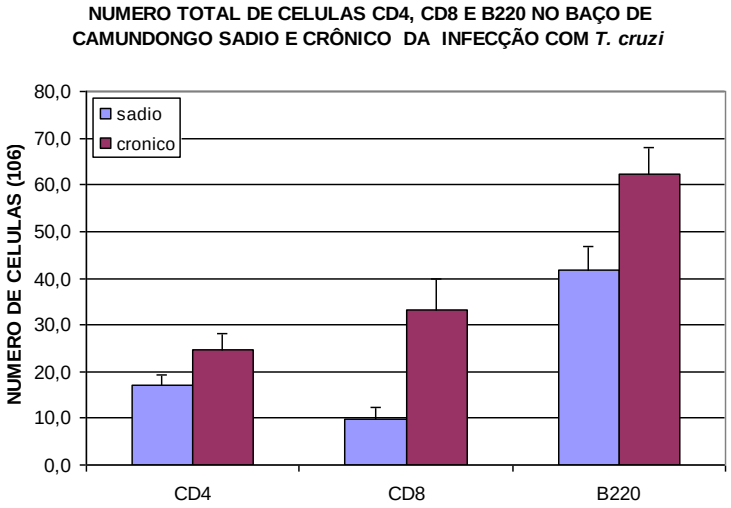

Figura 1- Numero total de células CD4, CD8 e B220 no baço de camundongo sadio e infectado crônico. Camundongos C57BL/6 foram infetados com 1000 *T. cruzi* da cepa Y por via intraperitoneal e avaliados 60 dias após a infecção.

4.2 OS LINFÓCITOS T CD8^{+} DOS CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFETADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI* DAS CEPAS Y OU SILVIO X10/4 REGULAM NEGATIVAMENTE A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CD45RC (CD8^{LOW} CD45RC^{LOW})

Na fase crônica da infecção murina pelo *T cruzi*, observa-se como característica importante o aumento dos linfócitos T CD8, na analise mais detalhada desta população celular observa-se que uma porcentagem de células tem uma baixa expressão da molécula correceptora CD8. A baixa expressão já que acontece] nas moléculas CD8 não e um fenômeno restrito a esta molécula já que acontece similarmente com CD45RC, alem de ter sido descrito que poderia acontecer com outras moléculas relacionadas tais como CD3, TCRab (GRISSOTO, 1999) alem de isso essa baixa expressão acontece na mesma sub-população de linfócitos T CD8 como mostrado junto à expressão de CD8 e CD45RC (Fig. 2). Este fenômeno acontece na infecção por as duas cepas de *Tripanosoma cruzi* .

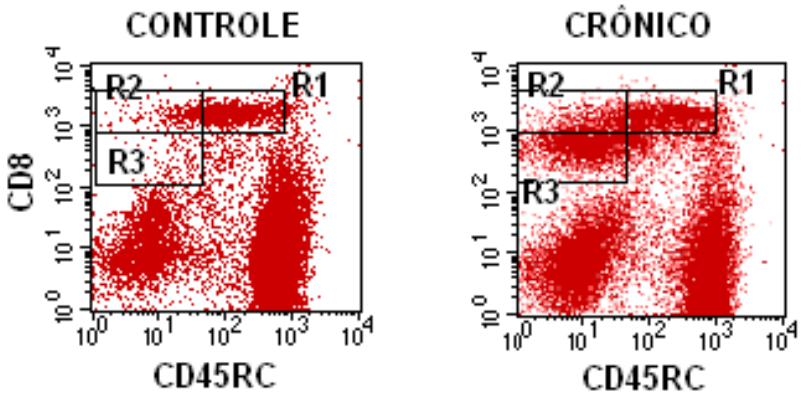

Figura 2- Expressão dos marcadores CD8 e CD45RC pelas células do baço de camundongos controle e crônico. Os retângulos são Janelas representativas que permite diferenciar sub-populações CD8HIGHCD45RCHIGH (R1), CD8HIGHCD45RCLOW (R2) e CD8LOWCD45RCLOW (R3). Camundongos C57BL/6 foram infetados com 1000 T. cruzi da cepa Y por via intraperitoneal e avaliados 60 dias após a infecção.

Para fines deste estudo identificamos três sub-populações de linfócitos T CD8 pela expressão simultânea da molécula correceptora do CD8 e do CD45RC, onde nos foi possível diferenciar nitidamente uma subpopulação que manten níveis normalmente elevados de CD8 e CD45RC ($CD8^{HIGH}$, $CD45RC^{HIGH}$, $CD3^{HIGH}$, TCR^{HIGH}) aqui denominadas CD8HH e outra subpopulaçõ que mantem uma baixa expressão de CD8 e CD45RC ($CD8^{LOW}$, $CD45RC^{LOW}$, $CD3^{LOW}$, TCR^{LOW}) ao qual chamaremos de células CD8LL. Alem destas duas subpopulações e possível diferenciar uma terceira sub-população que expressam CD45RC em níveis baixos e níveis normais de CD8 ($CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$) que llamaremos de CD8HL. (Figura 2). Na analise fenotipica pela expressão de CD8 se tomo o cuidado de excluir por tamanho e granulosidade células que não tivessem características linfocitarias entre estas as células dentriticas, alem de isso as subpopulações de linfócitos T CD8 expressam na sua totalidade TCRab excluindo definitivamente células dentriticas CD8+.

As células CD8LL se acumulam progressivamente no animal após a fase aguda podendo chegar a constituir ate um 50% das células $CD8^+$ esplenicas no dia 60 após infecção. No caso do camundongo C57BL/6, a infecção por *Trypanosoma cruzi* da cepa Y ou da cepa Sylvio X10/4, a pesar do diferente grau de virulência destes, geram um número semelhante de células CD8LL, tanto do ponto de vista porcentual como em números absolutos (dados não mostrados).

4.3 AS CÉLULAS $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ APRESENTAM FENÓTIPO DE CÉLULAS EXPERIMENTADAS E CORRESPONDEM NA SUA MAIORIA A CÉLULAS DE MEMORIA EFETORA (EM)

Os linfócitos T CD8 com baixa expressão de CD8 e CD45RC (CD8LL) tem características de células antígeno experimentadas já que tem uma elevada expressão de CD44 alem de ter uma baixa expressão de CD62L indicandonos que não tem potencial de ingressar aos linfonodos por HEVs. Os linfócitos com alta expressão de CD8 e CD45RC (CD8 HH) têm uma expressão baixa de CD44 mais algumas células o expressam em quantidades consideravelmente elevadas, e tem uma expressão elevada de CD62L, todas as características predominantemente de linfócitos T naive (GRISSOTO, 1999). Mais atualmente tem se descritas sub-populações de linfócitos TCD8 de memória (antígeno experimentadas), com características fenotipicas e funcionais propias sendo a diferenciação feita pela ausência ou presencia de função efetora imediata e pela presencia de receptores de "homing" para órgãos linfóides secundários (SALLUSTO, 1999) que permitem diferenciar em linfócitos T de memória central e de memória efetora, esta diferenciação esta muito bem definida em humanos mas também tem sido descrito no modelo de camundongos (MASSUPUST, 2001), a caracterização destes

subtipos celulares não e bem definida na doença de Chagas, assim nos avaliamos nas sub-populações de linfócitos T CD8 (HH, LL, HL) pela expressão simultânea de CD62L ou de CD127 se tem características de células ce memória central ou de memória efetora.

Analisando a expressão de CD62L nas sub-populações estudadas nos podemos observar que a expressão de CD45RC na sub-população de linfócitos T $CD8^{HIGH}$ $CD62L^{HIGH}$ é alta, ou seja, mostram fenótipo CD8HH, devendo corresponder na sua maioria (87-92%) a linfócitos naive. Os linfócitos $CD8^{LOW}$ $CD62L^{LOW}$, na sua grande maioria (80%) têm uma expressão de CD45RC diminuída, ou seja, mostram fenótipo CD8HL, sendo este fenótipo compatível com os linfócitos de memoria efetora, mais tem uma pequena porcentagem que ainda mantém ou reexpressa níveis mais elevados de CD45RC. Nos linfócitos T $CD8^{HIGH}$ $CD62L^{LOW}$ pela sua baixa freqüência não e possível determinar um padrão de expressão CD45RC, mas evidencia-se uma tendência a ter uma baixa expressão de CD45RC (Figura 3) sendo provável que este subtipo de linfócito corresponda a um estagio terminalmente mais diferenciado (efetor).

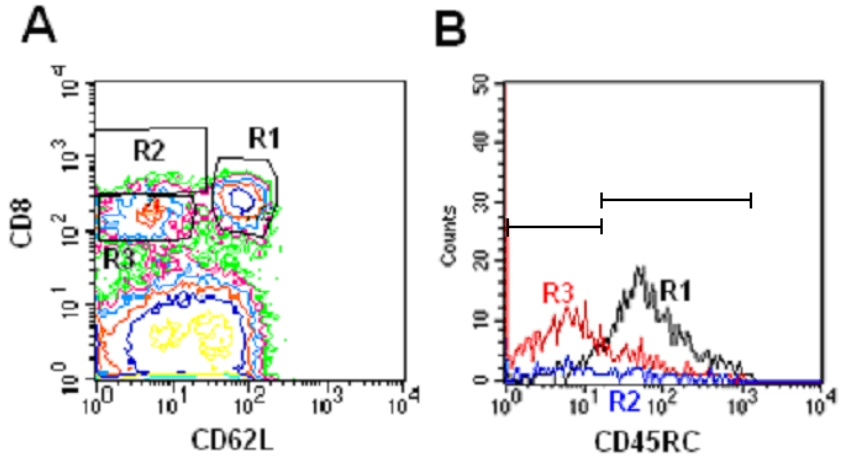

Figura 3– (A) Expressão dos marcadores CD8 e CD62L no baço de camundongo crônico. Os retângulos são Janelas representativas para delimitar as sub-populações $CD8^{HIGH}CD62L^{HIGH}$ (R1), $CD8^{HIGH}CD62L^{LOW}$ (R2) e $CD8^{LOW}CD62L^{LOW}$ (R3). (B) Histograma da expressão de CD45RC nas sub-populações $CD8^{HIGH}CD62L^{HIGH}$ (preto), $CD8^{HIGH}CD62L^{LOW}$ (azul) e $CD8^{LOW}CD62L^{LOW}$ (vermelho).

Outra manera de caracterizar as células de memória central e efetora e pela expressão do CD127. O CD127 constitui a cadeia alfa do receptor de IL-7 (IL-7R), um receptor de citocinas que se encontra preferencialmente expresso em células naive e também nas células de memória mais não nas células efetoras. A correspondência fenotípica esperada para as células naive seria $CD8^{HIGH}CD62L^{HIGH}CD45RC^{HIGH}CD127^{HIGH}$. Nas nossas experiências 92% das células CD8HH expressam níveis elevados de CD127, a porcentagem restante pode corresponder a um tipo celular mais diferenciado (provavelmente pré-CM). Por outro lado, os linfócitos CD8 LL têm uma expressão predominantemente menor de CD127, sendo este fenótipo compatível com memória efetora, mais uma parte das células tem elevada expressão de CD127 sendo este fenótipo compatível com o de memória central, mas não foi possível delimitar um punto de corte especifico (Figura 4).

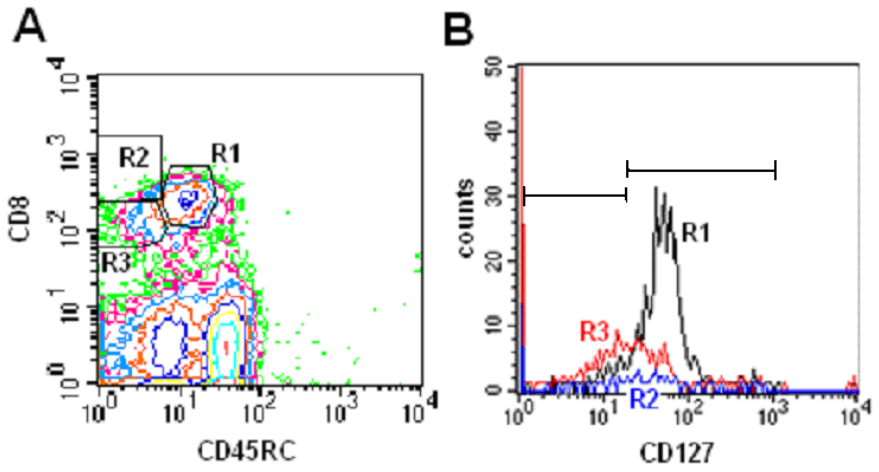

Figura 4– (A) Expressão dos marcadores CD8 e CD45RC no baço do camundongo crônico. Janelas representativas para definir as sub-populações $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$ (R1), $CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$ (R2) e $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ (R3). (B) Histograma da expressão de CD127 nas sub-populações $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$ (preto), $CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$ (azul) e $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ (vermelho).

4.4 As células $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$: expressão de PD-L1

A molécula PD-L1 é uma molécula que pode ser expressa nos linfócitos T e que sinaliza em forma inibitória quando interage com a molécula PD-1 eventualmente expressa nos tecidos. Pesquisas recentes têm mostrado um aumento da expressão desta molécula em doenças crônicas, o que estaria relacionado a certo tipo de disfunção funcional (células exauridas). O seu estudo na doença de Chagas não tem sido ainda abordado.

A molécula PD-L1 é expressa em todas as sub-populações de células $CD8^+$ do baço do animal crônico (Figuras 5 e 6). Os seus níveis de expressão não são entretanto muito intensos, sendo que a mediana de fluorescência é maior na subpopulação CD8HL (MFI 16), Contudo os níveis expressos pelas células $CD8^+$ são superiores aos mostrados por linfócitos B ($B220^+$) (MFI 4) que sabemos expressam em baixa intensidade PD-L1.

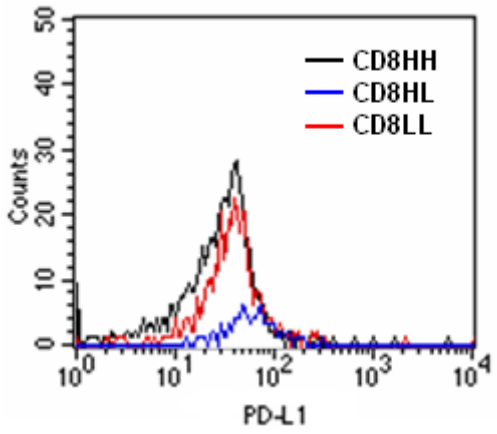

Figura 5– Histograma da expressão de PD-L1 nas sub-populações $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$ (preto), $CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$ (azul) e $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ (vermelho) no baço do camundongo crônico.

Ao observamos que os linfócitos T CD8 tem expressão basal de PD-L1 baixa nos tentamos determinar se após estimulação inespecífica por seis horas com anti-CD3/CD28 aumentaria a sua expressão. Utilizando doses crescentes de anti-CD3 verificamos que com doses baixas não altera a expressão de PD-L1, e somente com as doses mais elevadas se observa um pequeno aumento da expressão do PD-L1 nas três sub-populações $CD8^+$, mas não nas células B (controle). O significado da expressão desta molécula é por enquanto discutível e precisa de maior estudo, mais evidencia que poderia sua resposta ser modulada pela interacção com esta molecula.

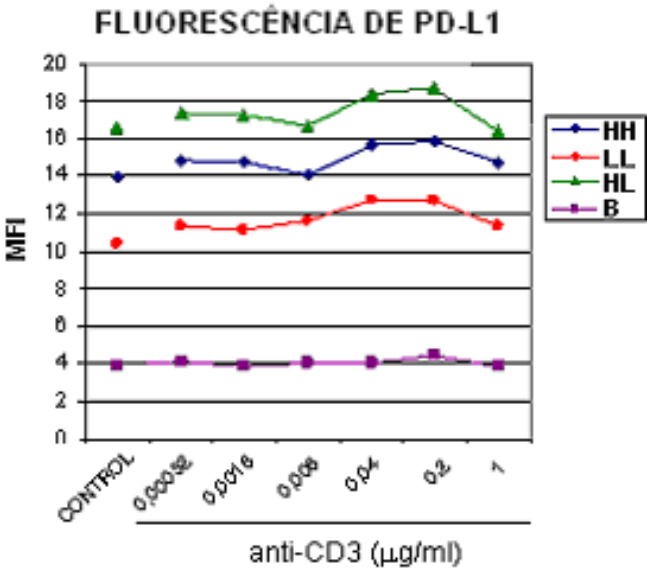

Figura 6- Mediana de fluorescência (MFI) da expressão de PD-L1 pelas células $CD8^+$ do baço do animal crônico, após estimulação com doses crescentes de anti-CD3 aderido à placa.

4.5 As células $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ incluem células com marcadores fenotípicos de células NK

Trabalhos recentes têm descrito uma nova sub-população de linfócitos $CD8^+$ que é gerada ou expandida em doenças virais crônicas com baixa carga antigênica. Este tipo de célula esta sendo considerado como uma célula $CD8^+$ reguladora, o seu fenótipo e capacidade efetora vem sendo objeto de intensa pesquisa. Alguns autores têm confirmado nestas células a presença de perforina, granzima, INF-gama, TNF-alfa, IL-10 e, em alguns modelos, de capacidade citotóxica, mas também tem sido descrito, de forma parecida a nosso modelo, a regulação negativa de moléculas de superfície como CD8 e TCR. De qualquer forma, a sua característica mais singular é que estas células expressam na sua superfície receptores ativadores ou inibitórios presentes na células NK, e entre estes, os da família NKG2. Com o objetivo de verificar se na doença de Chagas experimental

há células que apresentam este fenótipo, avaliamos a expressão de NK1.1, NKG2D e NKG2ACE nas células do baço de camundongos sadios e crônicos.

A expressão de marcadores relacionados a células NK nas células $CD8^+$ do baço do camundongo controle é baixa. Já no camundongo crônico observa-se que uma fração das células $CD8^+$ expressa níveis aumentados das moléculas NKG2D e NKG2ACE e de forma menos intensa de NK1.1. Num analise mais detalhado nos podemos observar que na expressão de NK1,1 os linfócitos T CD8 HH mantem uma baixa expressão do marcador , mais as outras sub-populações T CD8 LLe HL apesar de ter uma expressão baixa, elas aumentam a dobro sua expressão (exibem MFIs discretamente superiores). A expressão aumentada de NKG2D é evidente numa fração importante dos linfócitos TCD8 LL, que perfaz 10% das células CD8LL do animal controle e 50% das células CD8LL do animal crônico, nas outras subpopulações $CD8^+$ tem também um aumento na freqüência de células $NKG2D^+$, intenso na subpopulação T CD8HL e muito discreto na sub-população de linfócitos T CD8HH. A expressão de NKG2ACE aumenta nas três sub-populações de linfócitos T $CD8^+$ do baço do camundongo crônico, mais de manera mais expressiva na sub-população de linfócitos T CD8LL onde um 30% a expressam. O significado da expressão destas moléculas nas células CD8LL e CD8HL do camundongo crônico é incerto, mas sugere que estas células respondam a antígenos apresentados em complexos de histocompatibilidade menores. Além disto, e em relação ao NKG2D, a literatura descreve que esta molécula tem função ativadora, enquanto que no caso de NKG2A (a molécula detectada com maior facilidade pelo nosso anticorpo anti-NKG2ACE) considera-se tem atividade inibitória.

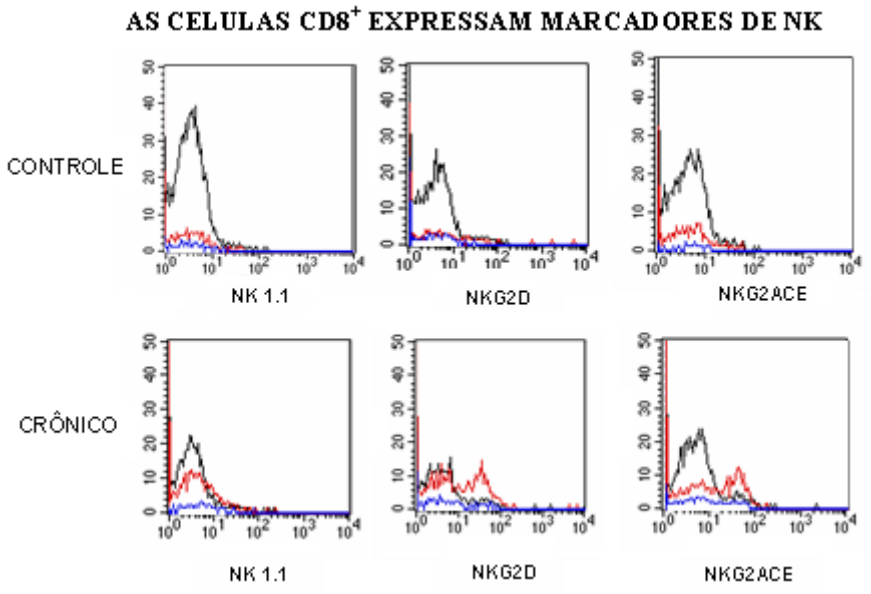

Figura 7- Expressão de marcadores presentes em células NK (NK1,1, NKG2D, NKG2ACE) nas células CD8HH (preto), CD8HL (azul) e CD8LL (vermelho) do baço de animais cronicamente infetados com *T. cruzi* e controle sadio.

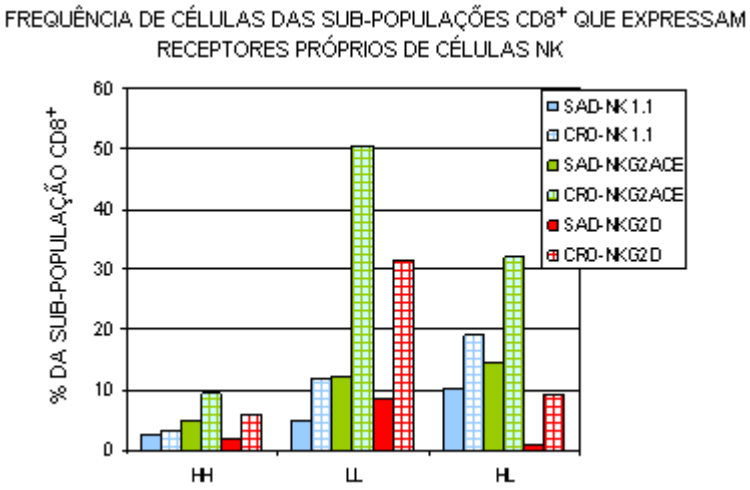

Figura 8- Freqüência de células que expressam marcadores relacionados a NK (NK1,1, NKG2D, NKG2ACE) nas sub-populações CD8HH, CD8LL e CD8HL do baço de animais cronicamente infetados com *T. cruzi* e controle sadio.

Nos nossos experimentos observamos que a expressão destes marcadores se apresenta de uma forma heterogênea dentro da mesma sub-população. Assim, na sub-população CD8LL, apesar de que quase 50% das células expressam ambos o

NKG2ACE e o NKG2D, há células que apresentam um único marcador (Figura 9). Estudos mais detalhados são necessários para entender o significado da expressão destas moléculas nas células do animal crônico

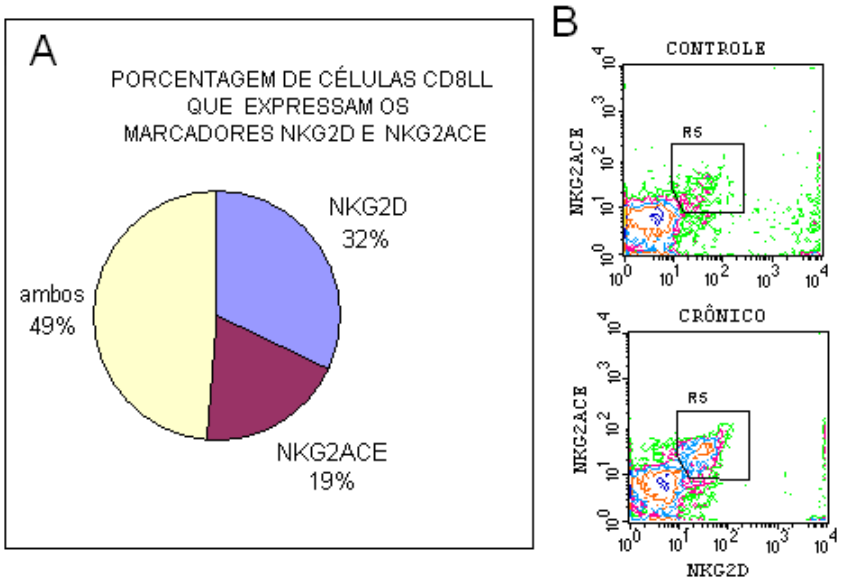

Figura 9 - (A) Freqüência de expressão das moléculas NKG2D e NKG2ACE pelas células CD8LL do baço de camundongos cronicamente infetados com *T. cruzi*. (B) Dot-blots representativos da expressão de NKG2D e NKG2ACE pelas células CD8LL esplénicas de camundongos infetados cronicamente com *T. cruzi* e controle sadio.

4.6 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CELULAS $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ DE CAMUNDONGOS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

Como podemos observar ate o momento, na infecção com trypanosoma cruzi na fase crônica tem o aparecimento de uma subpopulação de linfócitos T $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ que tem características compatíveis de células de memória efetora, este tipo celular foi já caracterizado em outros modelos de doença crônica com baixo ou intermediaria persistência de carga de antigênica, nos

modelos de CMV e hepatite murina, nosso trabalho caracteriza a geração de células T EM por uma infecção parasitaria, sendo este um dado importante neste modelo de doença por que ela nos indica que na fase crônica da infecção murina por *Trypanosoma cruzi* não tem um controle parasitário adequado, o estado funcional destas células e controverso, já que alguns pesquisadores tem encontrado um estado disfuncional, onde as células EM são pouco responsivas ate incluso anergicas, mais em outros modelos não evidencia-se uma disfunção tam grandeno caso da doença de chagas o estado funcional dos linfócitos T CD8 LL (EM) não foi bem caracterizado , tem trabalhos que conseguiram avaliar linfócitos T CD8 infiltrantes no músculo esquelético e no coração onde evidencia-se uma disfunção ou incapacidade de gerar INF-gama (provavelmente células CD8 efetoras), o estado funcional e controverso, aparentemente depende muito do modelo y do local de obtenção das células para o estudo, mais ainda assim a dinâmica desta subpopulação não esta bem caracterizada na doença de Chagas. Nosotros após a caracterização das células CD8LL vamos a continuar com o segundo objetivo que es tentar avaliar o estado funcional, *in vivo* e *in vitro*, e finalmente uma avaliação de linfócitos infiltrantes mas este ultimo será abordado ao final deste manuscrito.

Resultados anteriores do laboratório mostraram que o desafio in vivo de camundongo crônico com *T. cruzi* de cultura (ou antígeno de *T. cruzi*) determina, às 24-48 horas após o desafio, uma diminuição do número de linfócitos T CD8+ sendo maior nas células CD8LL no baço e em maior intensidade no sangue, alem de isso o estimulo *in vitro* com anti CD3 e macrófago infetado faz que os linfócitosT CD8LL produzam INF-g.

O estímulo com *T. cruzi in vivo* poderia sinalizar às células T $CD8^+$ em forma específica, ou seja, através do seu TCR (as APCs captariam o *T. cruzi* ou complexos *T. cruzi*-anticorpo pela via endossómica e apresentariam os peptídeos

deste, por "cross-priming", em moléculas MHC classe I), ou em forma inespecífica (o *T. cruzi* ou complexos *T. cruzi*-anticorpo sinalizariam as APCs, ou outra população celular, a produzir um mediador que estimularia não especificamente os linfócitosT CD8LL). Para indagar em relação a esta última possibilidade, analisamos se a estimulação inespecífica *in vivo* com Poly-IC seria capaz de resultar em fenômeno parecido. O Poly-IC e o ligante de TLR3, receptor expresso em muitos tipos celulares e cuja estimulação gera um ambiente inflamatório com aumento da produção de IL-15 e varias outras citocinas, tais como IFN-gama e TNF-alfa.

4.7 A ESTIMULAÇÃO INESPECÍFICA COM POLY-IC PROVOCA UMA QUEDA SIGNIFICATIVA DAS CÉLULAS $CD8^+$ COM FENÓTIPO $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$

Para esta etapa nos estimulamos de manera inespecifica grupos de camundongos crônicos e seu respectivo grupo controle com 250ug de Poli-IC por via intraperitoneal, foram avaliados em diferentes tempos os linfócitos T CD8 do baço e do sangue. Assim determinamos que a estimulação *in vivo* do camundongo crônico com Poly-IC determina às 6h uma leve queda (de aproximadamente 20%) no número de linfocitos T $CD8^+$ esplênicas, que volta a números normais às 24h. Fenômeno semelhante acontece nas células $TCD4^+$, mas não acontece nas células $B220^+$. Assim, as mudanças que acontecem nas células $CD8^+$ do baço após desafio com Poly-IC são muito mais discretas que aquelas no baço após desafio com *T. cruzi* vivo. No entanto, no sangue, os efeitos do Poly-IC são intensos, com evidente diminuição das três populações estudadas ($CD4^+$, $CD8^+$ e $B220^+$) nas primeiras 6 horas . Às 24 horas, e em forma similar ao acontecido no baço, os números de células se recuperam, retomando, no caso das células $CD4^+$ e $B220^+$, a valores um

poço abaixo dos iniciais, e, no caso das células CD8$^+$, valores levemente superiores(Figura 10).

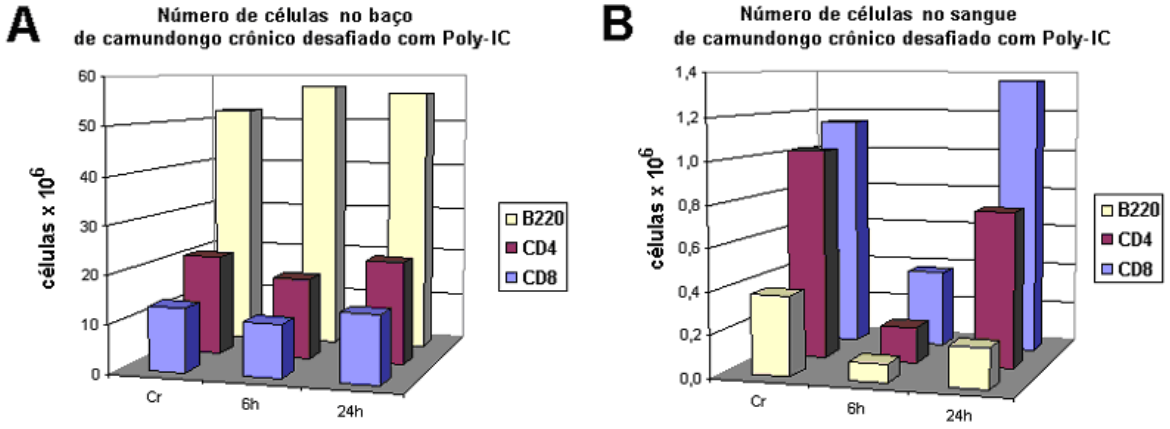

Figura 10- Número total de células CD4$^+$, CD8$^+$ e B220$^+$ no baço (A) e no sangue (B). Camundongos cronicamente infetados pelo *T. cruzi* cepa Y, foram desafiados via intraperitoneal com 250ug de Poly-IC às 6h e 24h, as células recuperadas do baço e sangue foram posteriormente avaliadas por FACS.

Em relação às sub-populações de linfócitos T CD8+, observamos que as células T CD8 esplenicas a pesar de que às 6h após o desafio o numero total não se altera muito a subpopulação TCD8LL esplénicas tem uma diminuição perto do 50% nas primeiras 6 horas após o desafio, mas retoma numeros ainda maiores nas 24h após o desafio, o numero total de linfócitos T CD8 tem um aumento progressivo de linfócitos T CD8HH, os linfócitos T CD8HL sofrem pouca alteração. Nas sub-populações de linfócitos T CD8 a estimulação inespecifica com o Poly-IC determina um comportamento similar ao desafio com *T. cruzi* por via endovenosa, porém com menor intensidade. No sangue, evidencia-se às 6h após o desafio com Poly-IC uma dimimuição de todas as sub-populações de linfócitos T CD8$^+$, principalmente da sub-população CD8HL e CD8HH. A sub-população menos

afetada é a dos linfócitos T CD8LL, que a pesar de ter uma diminuição expressiva se recupera rapidamente às 24h após o desafio, as outras subpopulações se recuperam mais não atingem valores iniciais (Figura 11).

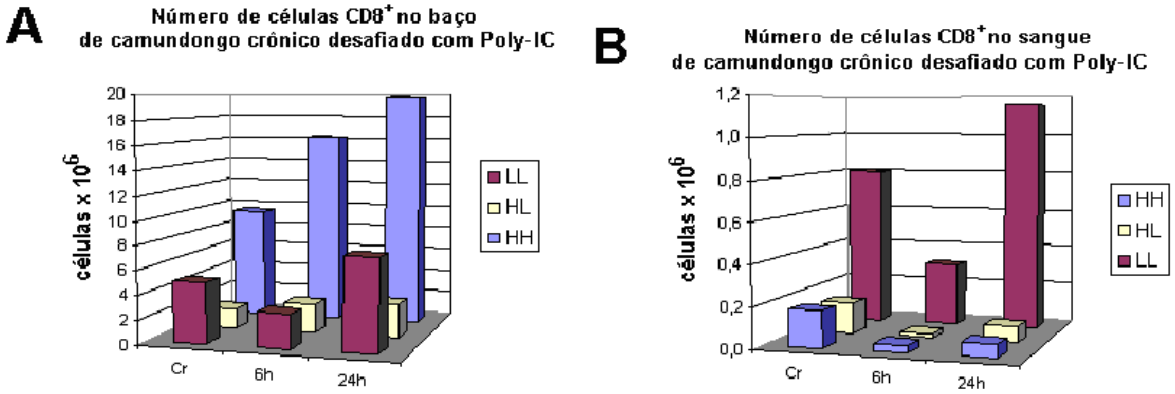

Figura 11- Número total de linfócitos T CD8LL, CD8HH e CD8HL no baço (A) e no sangue após estimulação inespecífica *in vivo*. Camundongos cronicamente infetados pelo *T. cruzi*, foram desafiados via intraperitoneal com 250ug de Poly-IC às 6h e 24h, as células recuperadas do baço e sangue foram posteriormente avaliadas por FACS.

4.8 A RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS CD8$^+$ APÓS ESTIMULO *IN VITRO* POR 6 HORAS COM ANTI-CD3, COM OU SEM ANTI-CD28, MUDA DE ACORDO À CONCENTRAÇÃO DO ANTI-CD3

A queda no número de linfócitos T CD8LL no camundongo crônico desafiado com *T. cruzi* ou estimulado de forma inespecífica com Poli-IC poderia ser devida a: i) mudança de fenótipo dos linfócitos T CD8LL, ii) migração destas células para outros locais; e/ou iii) morte por AICD.

Assim, a diminuição de células CD8LL após desafio do camundongo crônico com *T. cruzi* ou estimulação com Poli-IC poderia ser explicada pela maior susceptibilidade a morte por AICD das células CD8LL mais sem descartar as

outras possibilidades. E também importante determinar se essa diminuição de moléculas CD8 e CD45 RC no camundongo cronicamente infetado diminuem a sua capacidade de resposta frente ao estimulo. Para avaliar estas possibilidades realizamos experimentos nos quais esplenócitos de camundongo crônico foram estimulados com anti-CD3, com ou sem anti–CD28,

Assim num primeiro momento vamos a determinar a recuperação de células após estimulação com anti-CD3 como uma manera de avaliar indiretamente morte celular, os esplenócitos de camundongo crônico foram estimulados por 6 horas com anti-CD3 grudado na placa, com ou sem anti–CD28, e após este período estimamos a recuperação celular após marcação com os anticorpos específicos, no momento da leitura no FACS acrescentamos um numero fixo de células eGFP (verde) em cada pozinho de estimulação, determinamos a relação linfócitos/células $eGFP^+$ para poder ter um numero semiquantitativo das células que quedaram. Esta abordagem permite estimar o número relativo de células nas diferentes condições experimentais, complemento fundamental à análise percentual de sub-populações $TCD8^+$.

Em forma análoga ao observado com os linfócitos T $CD8^+$ do baço de animal controle, os linfócitos T $CD8^+$ de baço de animal crônico diminuem em número após cultura por 6 horas na presença de 0,5 ug/ml de anticorpos anti-CD3 (recuperação celular estimada em relação às culturas não estimuladas). Ao estudarmos quais as sub-populações $CD8^+$ mais afetadas neste processo, observamos que acontece tanto para os linfócitos T CD8HH como para CD8LL, apesar de ser geralmente mais intensa para as células CD8LL. Curiosamente, a pequena sub-população CD8HL não se mostra geralmente diminuída após o estímulo via CD3 (Figuras 12 e 13).

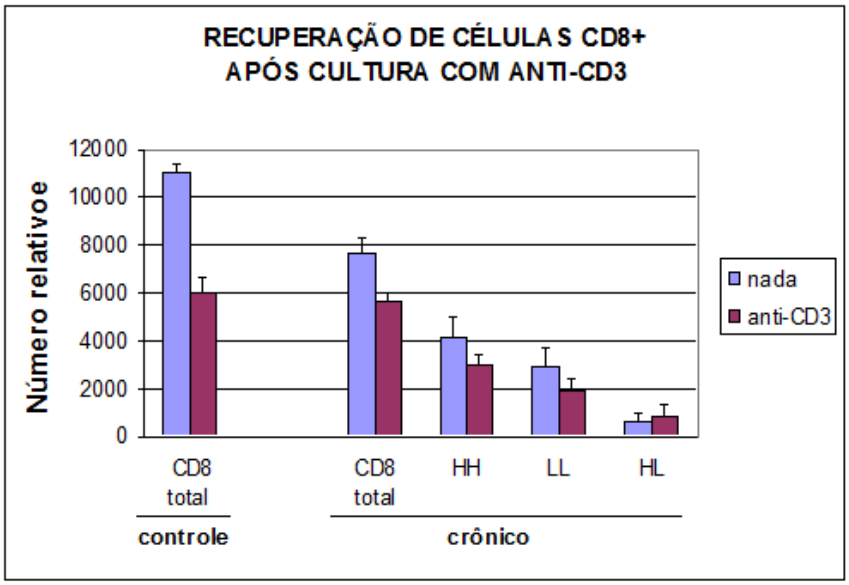

Figura 12– Recuperação em números relativos das células CD8$^+$ do baço de camundongos sadio e crônico após estimulação *in vitro* com anticorpos anti-CD3 (0,5 ug/ml). O gráfico acima indica o número de células recuperadas em relação a um número fixo de células eGFP$^+$ adicionadas no momento da leitura por citometria de fluxo realizada após 6 horas de cultura *in vitro* com os anticorpos.

Alem de isso avaliamos se as diferentes subpopulações de linfócitos TCD8 tem a mesma sobrevida com doses crescentes de anti-CD3 (com ou sem anti-CD28), nos observamos que com doses baixas tem um aparente resgate da morte dos linfócitos T CD8, fato mas evidente na sub-população de linfócitos T CD8 HH, mas com o aumento da dose de antiCD3 temos uma diminuição progressiva no numero de células recuperadas, sendo esta diminuição maior nos linfócitos TCD8LL, seguido dos linfócitos TCD8 HH, os linfócitos T CD8 HL mantiveram um numero constante durante o experimento com as diferentes doses de estimulação (Figura 13, esquerda). Alem de isso podemos notar que com as doses intermediarias altas a curva de recuperação platona.

Tem sido descrito na literatura que na estimulação por anti-CD3 das células CD8$^+$ de memória a inclusão de anti-CD28 tem efeito protetor sobre a morte por

AICD. Nas nossas experiências, entretanto, este efeito protetor do anti-CD28 não foi claramente evidenciado (dados não mostrados).

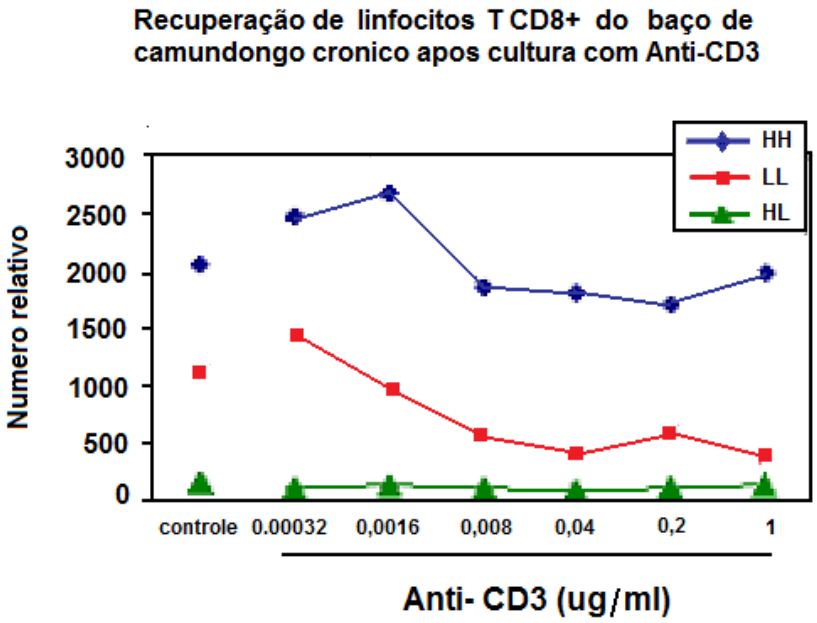

Figura 13– Recuperação em números relativos dos linfócitos T CD8$^+$ do baço de camundongo crônico após estimulação *in vitro* com diferentes doses de anticorpos anti-CD3. O gráfico indica o numero de células recuperadas em relação a um número fixo de células eGFP$^+$ adicionadas no momento da leitura por citometria de fluxo realizada após 6 horas de cultura *in vitro* com os anticorpos específicos.

Uma vez que o impacto negativo da estimulação sobre a recuperação de células CD8$^+$ é geralmente maior nas células CD8LL do que nas células CD8HH, esta última sub-população em números porcentuais aparece freqüentemente como tendo sofrido um ganho percentual. Assim, nas representações da freqüência de sub-populações das culturas estimuladas com anti-CD3 observa-se freqüentemente junto à queda da população CD8LL, um aumento porcentual da população CD8HH (Figura 13, direita). Porém, trata-se de um ganho irreal que no

denota aumento de células, mas simplesmente indica que a população CD8HH diminui menos do que a população CD8LL. O conjunto destes resultados é compatível com a hipótese das células CD8LL sofreriam mais facilmente AICD quando estimuladas através do seu TCR . No entanto, a hipótese da mudança de fenótipo não pode ser descartada por estas experiências.

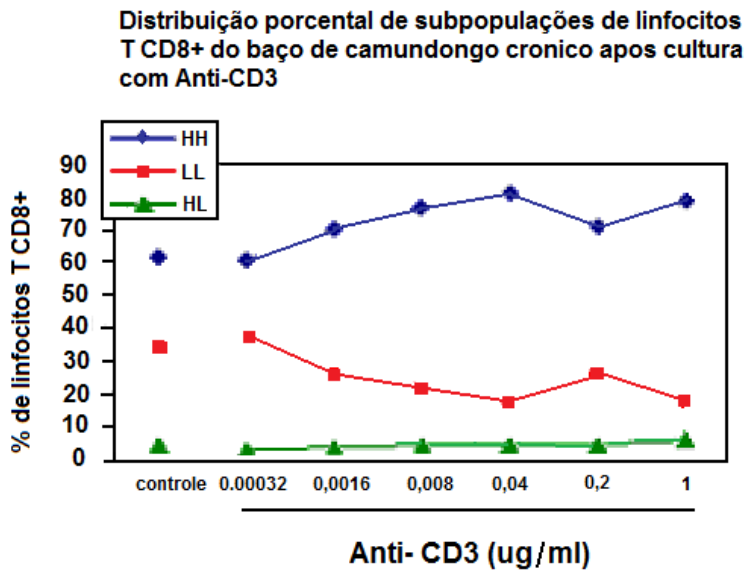

Figura 14– Distribuição porcentual dos linfócitos T CD8$^+$ do baço de camundongo crônico após estimulação *in vitro* com diferentes doses de anticorpos anti-CD3. O gráfico indica o porcentual das diferentes subpopulações de linfócitos T CD8 recuperadas em relação a um número fixo de células eGFP$^+$ adicionadas no momento da leitura por citometria de fluxo realizada após 6 horas de cultura *in vitro* com os anticorpos específicos.

4.9 A FREQÜÊNCIA DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM O MARCADOR DE ATIVAÇÃO CD69 APÓS ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* COM ANTI-CD3 É ALTA NA SUB-POPULAÇÃO CD8HH, BAIXA NA SUB-POPULAÇÃO CD8LL E INTERMEDIÁRIA NA SUB-POPULAÇÃO CD8HL, A PESAR DESTA ÚLTIMA SUB-POPULAÇÃO TER UM NÍVEL DE EXPRESSÃO BASAL ELEVADO

Continuando com a avaliação funcional, nos estudamos o grau de ativação celular mediante a expressão da molécula de ativação precoce CD69 na superfície dos linfócitos TCD8, num primeiro momento avaliamos a expressão basal desta molécula e posteriormente com doses crescentes de antiCD3- antiCD28. Assim nos observamos que no camundongo controle sadio como era de ser esperado tem uma expressão muito baixa de CD69 nas três subpopulações de linfócitos T CD8, mas nos camundongos crônicos observamos que a população de linfócitos TCD8 HL apresenta uma expressão basal elevada de CD69 perto de 38%, e os linfócitos TCD8HH muito menos 7% mas as células CD8LL tem uma expressão comparável aos controles sadios (baixa expressão) (Figura 15).

Ao avaliarmos como varia a expressão de CD69 nas subpopulações de linfócitos TCD8 do camundongo sadio com as doses diferentes de antiCD3 , encontramos que após estimulação, a expressão de CD69 nos linfócitos T CD8 aumenta em forma progressiva conforme aumenta a concentração do anti-CD3, mas os picos percentuais de expressão atingem diferentes intensidades finais nas três sub-populações. Assim, enquanto que quase a totalidade das células CD8HH consegue ser ativada pelo estimulo com doses progressivas com anti-CD3, a população CD8LL só consegue ter 30% das células ativadas e a população CD8HL mostra uma freqüência de ativação intermediária, mas que chega ate 75%, também notamos que a maior intensidade de expressão acontece com uma dose

intermediaria alta onde observamos que depois a curva de estimulação platona e incluso com as doses maiores se evidencia uma diminuição.

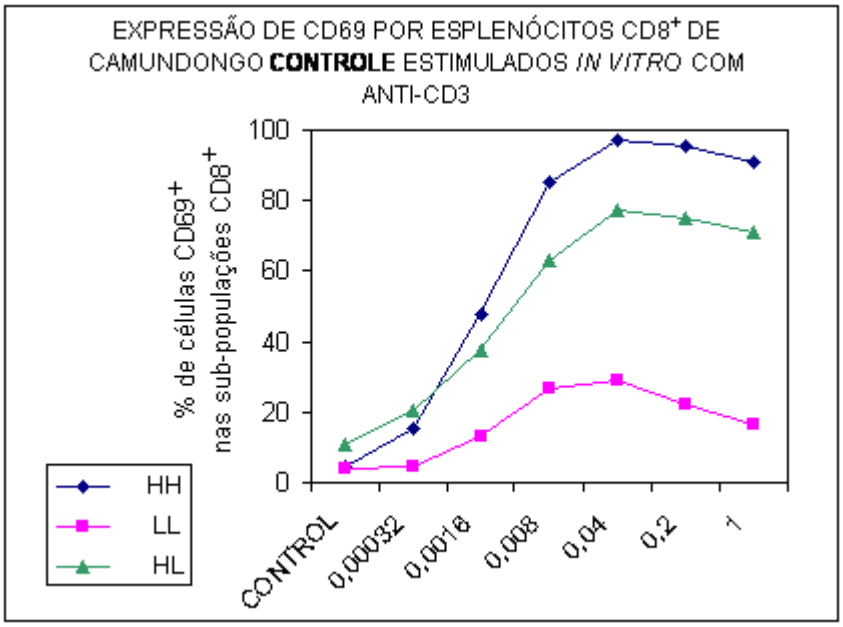

Figura 15– Expressão de CD69 pelas sub-populações celulares CD8$^+$ do baço de camundongo sadio após estimulação *in vitro* com diferentes doses de anticorpo anti-CD3. O gráfico mostra a variação porcentual de células CD69$^+$ de cada sub-população após 5 horas de cultura.

De forma semelhante ao observamos no camundongo sadio, no camundongo crônico a expressão de CD69 aumenta de forma progressiva conforme aumenta a concentração do anti-CD3 nas três subpopulações de linfócitos T CD8, na subpopulação de linfócitos T CD8HH que inicia com valores baixos atinge ate um 90% de expressão de CD69, na subpopulação de linfócitos TCD8 LL atinge ate um 30% de expressão de CD69 e na subpopulação de linfócitos TCD8 HL que a pesar de ter uma expressção inicial basal elevada (40%) ela só aumenta hasta um 70% na expressão de CD69.

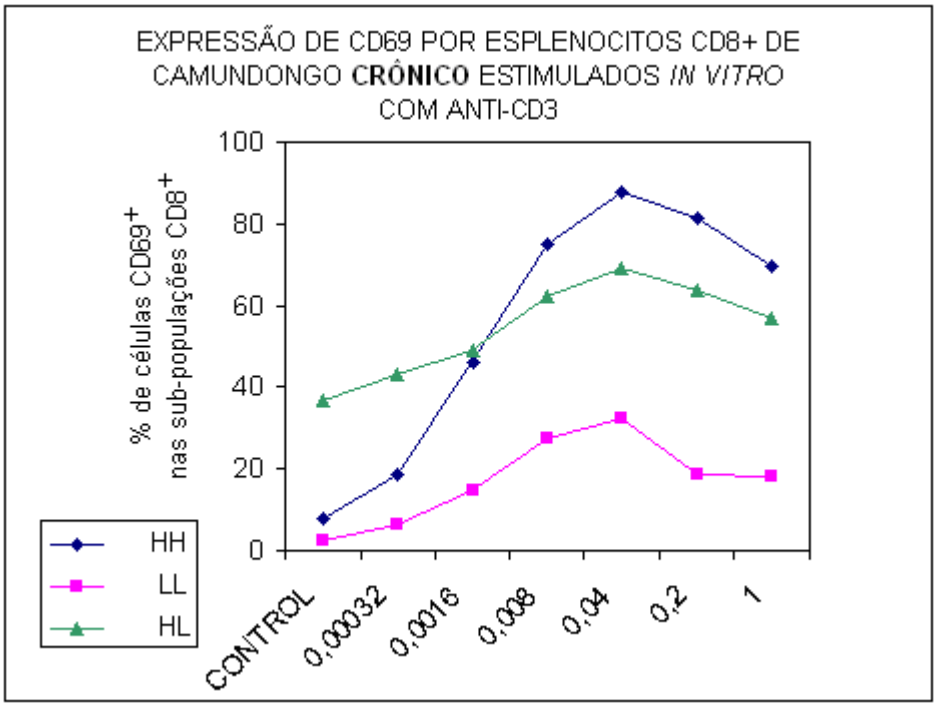

Figura 16– Expressão de CD69 pelas sub-populações celulares CD8$^+$ do baço de camundongo crônico após estimulação *in vitro* com diferentes doses de anticorpo anti-CD3. O gráfico mostra a variação porcentual de células CD69$^+$ de cada sub-população após 5 horas de cultura.

A principio poderia se cogitar que a ativação parcial das células CD8LL do animal crônico indicasse a existência de um limiar de ativação mais elevado nesta sub-população, condição que poderia ser explicada pela sua expressão diminuída de receptores e co-receptores. No entanto, o fato do pico de expressão de CD69 acontecer para as três sub-populações CD8+ na mesma dose de anti-CD3 sugere não seja este o caso. Alternativamente, a baixa freqüência de células expressando este marcador poderia estar relacionada à menor sobrevivência em cultura destas células.

4.10 NA ESTIMULAÇÃO *IN VITRO* COM ANTI-CD3 AS CÉLULAS CD8$^+$ EXPRESSAM MOLÉCULAS RELACIONADAS À MORTE: LIGAÇÃO A ANEXINA

Ao avaliarmos a possibilidade de que a diminuição das células seja por AICD nos medimos a expressão de fosfatidil serina na superfície dos linfócitos TCD8 já que á inversão da expressão do lado interno para a superfície da membrana celular de fosfatidil serina pode ser marcado especificamente por o anticorpo que se liga a Anexina V, um marcador de morte celular indicativo de que a célula estaria entrando em apoptose. Assim de forma semelhante a expressão de CD69 na estimulação com anti-CD3 aderido na placa (com ou sem anti-CD28) em doses crescentes, observamos nas células do baço do camundongo crônico que a expressão basal de anexina nos linfócitos TCD8 é maior na subpopulação TCD8 HL (55%), as outras sub-populações expressam em menor quantidade, pero a diferencia da expressão de CD69 a diferencia de expressão de anexina V se manteve nas três sub-populações na estimulação com doses crecentes de anti-CD3. A curva de expressão de anexina V aumenta progressivamente chegando ao maximo com doses intermediarias, posteriormente platona e com as maiores doses também apresenta diminuição no numero total de linfócitos TCD8 que expressam anexina V.

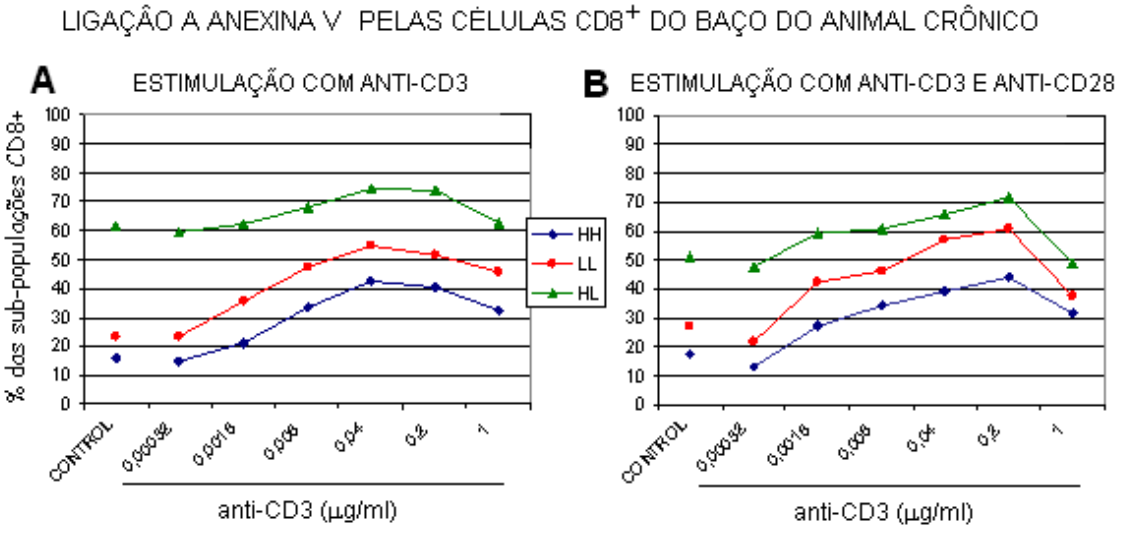

Figura 17 – Ligação de Anexina V pelas células CD8$^+$ do baço de camundongo crônico após a estimulação *in vitro* com diferentes doses de anticorpos anti-CD3 (A), ou anticorpos anti-CD3 e anticorpos anti-CD28 (1ug/ml) (B). Os gráficos indicam a variação porcentual de células Anexina V$^+$ no exame por citometria de fluxo após 6 horas de cultura com os anticorpos.

A maior ligação basal a Anexina V dos linfócitos T CD8 HL sugere que esta população seja dentre as sub-populações CD8$^+$ do baço do camundongo crônico aquela que tem maior susceptibilidade à morte por AICD. No entanto, estes resultados estão em conflito com os dados de recuperação celular (acima descritos), nos quais mostramos que as células CD8HL constituem a população que menos sofre perda após estimulação com anti-CD3. Uma forma de conciliar estes resultados seria admitir que o número total de células CD8HL após tratamento com anti-CD3 poderia ser a resultante de dois processos opostos: morte celular de CD8HL por AICD e conversão para o fenótipo CD8HL a partir de células com outros fenótipos. A provisão, junto ao anti-CD3, do estímulo co-estimulador (na forma de tratamento com anti-CD28) não se mostrou diferente da estimulação com só anti-CD3, não se evidenciando em forma clara qualquer efeito protetor do anti-CD28 adicional (Figura 17B).

4.11 NO DESAFIO INTRA-PLEURAL DO ANIMAL CRÔNICO, AS CÉLULAS CD8$^+$ MIGRAM DE FORMA PREFERENCIAL PARA A CAVIDADE PLEURAL CHEGANDO A INVERTER A RELAÇÃO CD4/CD8

A apresentação de antígenos do *T. cruzi in vivo* deve de acontecer em diferentes contextos. Nas células não leucocitárias (tais como o miócito), onde os antígenos são apresentados nas moléculas de MHC-I, o parasita pode completar seu ciclo e romper a célula hospedeira liberando as formas circulantes conhecidas como tripomastigotas. Logo após, a alta carga parasitaria no local onde quebrou o ninho deve desencadear um processo inflamatório localizado que resulta na migração de células fagociticas, junto com células T. Os tripomastigotas liberados devem de ser opsonizados pelos anticorpos e complemento e na sua grande maioria eliminados pelas células fagociticas. Estas células devem apresentar os antígenos do parasita nas suas moléculas de MHC classe II, e nas moléculas de MHC-1 por um mecanismo de apresentação cruzada. Além disto, pode acontecer uma forma alternativa de apresentação decorrente da infecção ativa de células da estirpe macrofágica pelo *T. cruzi*. A possibilidade de que nestes dois processos existam diferencias na migração e ativação de células efetoras, tais como as células CD8$^+$, é uma possibilidade importante que merece ser analisada.

O modelo de desafio intra-pleural do animal crônico é de muita utilidade por ser o espaço pleural uma cavidade fechada onde é possível recuperar as células que poderiam migrar e analisar seu estado funcional *in vivo*. Assim, utilizando o desafio intra-pleural com antígeno de *Trypanosoma cruzi* foi possível analisar o potencial migratório das diferentes populações celulares e entre estas os linfócitos T CD8 e suas sub-populações alem de isso poderemos avaliar o estado funcional destas células.

Camundongos C57BL/6 crônicos (infectados por *T. cruzi* da cepa Y) foram desafiados via intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* homólogo. Nestes experimentos utilizamos três grupos de animais crônicos: a) grupo controle injetado na cavidade pleural com PBS; e b) e c) grupos experimentais inoculados na cavidade pleural com antígeno de *T. cruzi* (quantidade equivalente a 10^8 parasitas) em 200 ml de PBS, inoculados 24h e 48h antes do sacrifício. Os animais sacrificados foram avaliados nos compartimentos sangüíneo, baço e a cavidade intra-pleural.

Os números totais de células obtidas da cavidade intra-pleural foram de $28x10^4$ células nos animais inoculados com PBS e $79x10^4$ e $100x10^4$ células, nos animais inoculados com antígeno por 24 e 48 horas. Na análise percentual da distribuição das populações celulares que se recuperaram após lavado da cavidade pleural, se observam no animal crônico controle um predomínio de células $B220^+$, seguido de células semelhantes a macrófago (Mac-1+ $Ly6G^{INT}$), e de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, presentes em números similares, e finalmente de umas poucas células com características de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) (Mac1+,$Ly6G^{HIGH}$) (Figura 18). Após as primeiras 24 horas do desafio observamos um aumento no numero de células semelhantes à PMN (em uma ordem de até 15 vezes o número inicial) que diminuem às 48 horas após o desafio, mas sem chegar ate o número inicial. Por outro lado, as células com fenótipo de macrófago aumentam progressivamente após o desafio com valor máximo às 48 horas. As células $B220^+$ no inicio constituem a população predominante, poderiam corresponder a células B-1, sua distribuição porcentual mostra uma queda nas 24 e 48 horas pós-desafio, mas em números absolutos não sofrem muita variação.

Finalmente, com relação às células T, podemos observar que ambas as populações de células $CD4^+$ e $CD8^+$ aumentam nas primeiras 24h após o desafio,

sendo maior o aumento das células CD8$^+$, enquanto que às 48h após o desafio, ambas as populações mostram uma pequena diminuição.

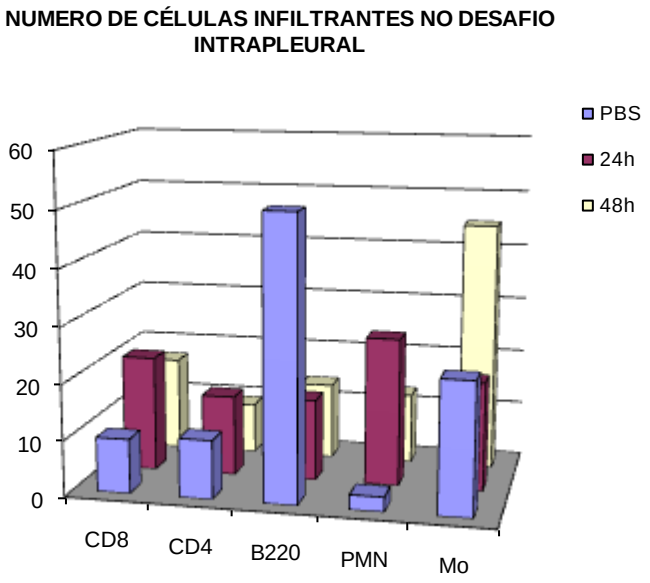

Figura 18– Número total das células que infiltram a cavidade pleural do animal crônico 24 e 48 horas após desafio intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* ou PBS Camundongos C57BL/6 crônicos foram desafiados via intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* (1x10^8 tripomastigotas) ou PBS estéril como controle e avaliados após o desafio.

A migração de linfócitos T CD8$^+$ é maior que o dos linfócitos T CD4$^+$, mas a distribuição das sub-populações T CD8$^+$ tem um comportamento bem interessante. Evidencia-se um aumento das três sub-populações na cavidade pleural, mas diferentemente do sangue e baço, há predomínio de linfócitos T CD8HL tanto no controle como as 24 e 48 horas após-desafio. No entanto, as células com fenótipos CD8HH e CD8LL também sofrem grande aumento em termos numéricos, apesar de que às 48 horas após o desafio as células CD8HH diminuem percentualmente. Em termos absolutos, o aumento das populações CD8$^+$ é de 6

vezes para as células CD8HL e CD8LL e de 4,5 vezes para as células CD8HH (Figura 18).

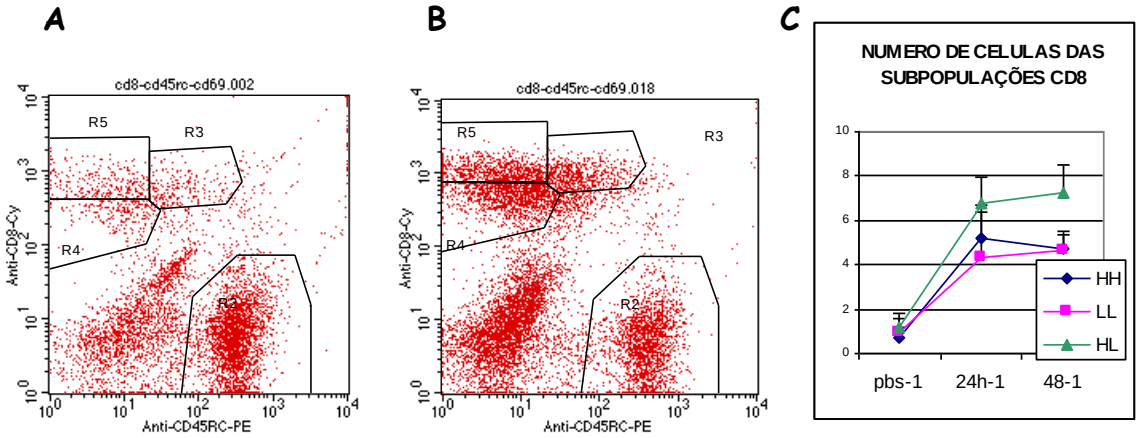

Figura 19– A-B: Dot-plots representativos da distribuição das células $CD8^+$ na cavidade pleural (baseada na expressão de CD8 e CD45RC), após desafio intra-pleural com PBS (A), ou antígeno de *T. cruzi* (48 horas) (B). As janelas desenhadas nos gráficos de pontos representam as subpopulações CD8HH, CD8HL e CD8LL. C: Número de células das sub-populações $CD8^+$, 24 e 48 horas após o desafio intra-pleural com antígeno de *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 crônicos foram desafiados via intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* ($1x10^8$ tripomastigotas), ou PBS estéril.

Uma forma interessante de avaliar a dinâmica das mudanças nas células $CD4^+$ e $CD8^+$ é determinando a relação CD4/CD8 nos diferentes locais avaliados. A relação CD4/CD8 no baço do animal crônico desafiado via intra-pleural com PBS (24h) [controle do desafio] foi próxima a 2. Após 24 e 48 horas do desafio intra-pleural com antígeno de *Trypanosoma cruzi* podemos observar que no baço a relação de células CD4/CD8 não se altera.

Já no sangue do grupo PBS a relação CD4/CD8 foi de 1,2. Nos animais desafiados com antígeno via intra-pleural, houve um aumento dos números absolutos das células $CD4^+$ e $CD8^+$ nas primeiras 24 horas e queda posterior até valores por baixo dos números iniciais no grupo PBS. No entanto, a proporção de células

CD4/CD8 não teve muita alteração, com exceção de um discreto aumento nas 24h após o desafio.

Já na pleura do grupo PBS-24 h a relação CD4/CD8 foi de 1,09. Nos camundongos desafiados com antígeno de *T. cruzi* via intra-pleural, se observou um aumento relativo e progressivo de linfócitos T $CD8^+$, determinando que a relação CD4/CD8 invertesse às 24 horas e mais intensamente às 48h.

Tabela 1- Relação de células CD4/CD8 após o desafio intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* no baço, sangue e pleura.

RELAÇÃO CD4/CD8

	BAÇÕ	SANGUE	PLEURA
PBS	2,46	1,21	1,09
24H	2,21	1,33	0,70
48H	2,30	1,23	0,55

4.12 AS CÉLULAS $CD8^+$ APRESENTAM DIFERENTES GRAUS DE ATIVAÇÃO DEPENDENDO DO COMPARTIMENTO ESTUDADO

Para objetivar a existência de diferenças funcionais nos linfócitos T $CD8^+$ de diversos compartimentos anatômicos, comparamos a expressão do marcador de ativação CD69 na pleura, sangue ou baço do animal crônico, antes e após do desafio com antígeno de *T. cruzi*.

Como era esperado a expressão de CD69 pelas células do baço a subpopulação de linfócitos TCD8 HL teve uma expressão basal maior com pouca alteração após o desafio, de forma semelhante às outras subpopulações se

alteraram pouco. No compartimento sanguíneo podemos observar que a expressão de CD69 de forma basal e baixa nas três subpopulações e com o desafio tem uma tendência a aumentar levemente a expressão de CD69 nas primeiras 24h. Nota-se que no compartimento pleural todos os linfócitos TCD8 tem uma expressão basal elevada de CD69 (65% na HL, 60% HH e 52% no LL) e ao contrario do que poderíamos esperar o desafio nas primeiras 24 horas mostra uma tendência de diminuição da expressão desta molécula que posteriormente se recupera na sua expressão mais não atinge os níveis basais.

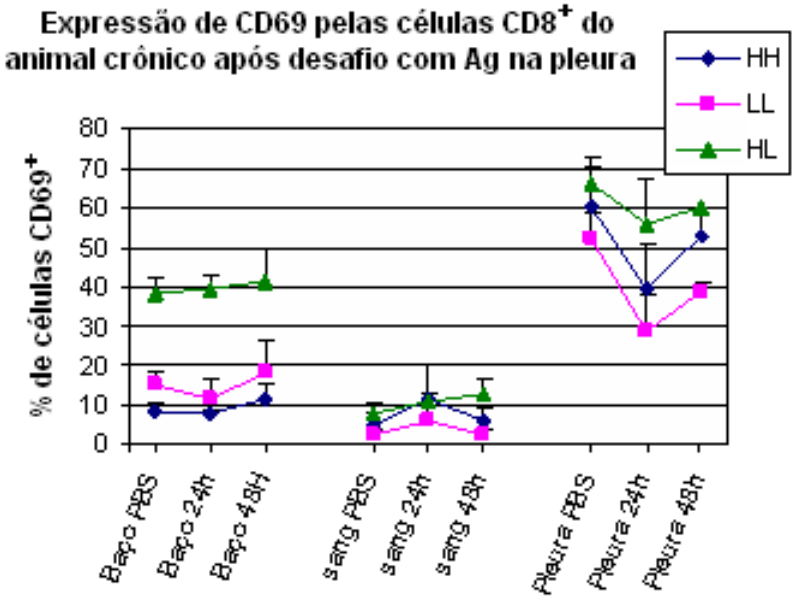

Figura 20– Expressão porcentual do marcador de ativação CD69 no baço, sangue e pleura após 24 e 48 horas do desafio intrapleural com antígeno de *T. cruzi*. Camundongos C57B-6 crônicos foram desafiados intrapleuralmente com antígeno de T. cruzi ($1x10^8$ tripomastigotas) e PBS estéril como controle e avaliados após o desafio.

O desafio intra-pleural do animal crônico (cepa Y) com antígeno de *T. cruzi* homólogo determina, às 24 horas da inoculação, uma queda na expressão de CD69 pelas células das 3 sub-populações $CD8^+$ que se encontram no exudato intra-pleural, queda que recupera parcialmente às 48h após o desafio. Em forma

interessante, as mudanças na expressão de CD69 nas células $CD8^+$ do sangue mostram um perfil oposto, uma tendência a aumentar nas primeiras 24 horas e volta à expressão inicial às 48 horas após o desafio. Contudo, nas células HL do sangue, o aumento na expressão de CD69 permanece até as 48 horas do desafio.
Estes resultados mostram que as células $CD8^+$ isoladas de diferentes compartimentos anatômicos se encontram em diferentes estados de ativação, sendo este parâmetro um indicador de um comportamento funcional eventualmente diferente.

4.13 AS CÉLULAS CD8HH PREDOMINAM NO BAÇO, AS CÉLULAS CD8LL PREDOMINAM NO SANGUE E AS CÉLULAS CD8HL PREDOMINAM NO INFILTRADO PLEURAL DO ANIMAL CRÔNICO

Após desafio intra-pleural do animal crônico com antígeno de *T. cruzi*, o número total de linfócitos T $CD8^+$ do baço não se altera, no sangue sofrem um aumento sem alteração da proporção CD4/CD8, e na pleura experimentam um aumento marcado. Visando ter uma idéia geral das mudanças que acontecem após o desafio, comparamos as alterações das sub-populações $CD8^+$ nestes três compartimentos. De inicio podemos observar que no camundongo controle (animal crônico inoculado com PBS por 24h) as células CD8HH predominam no baço (60%), as células CD8LL no sangue (50%), e na pleura predominam as células CD8HL (45%), apesar do número baixo. Assim no baço, 24 horas após o desafio intra-pleural com antígeno de *T. cruzi* observamos uma diminuição porcentual dos linfócitos T CD8LL, que se recuperam às 48 horas após o desafio , enquanto que as células CD8HH aumentam em porcentagem e tem uma diminuição posterior, os linfócitos CD8 HL se mantiveram em números percentuais estáveis. No sangue evidencia-se a diminuição progressiva da sub-população de linfócitos T CD8 HH

nas 24h e 48h após o desafio, os linfócitos T CD8 HL tem um aumento significativo percentual às 24 horas, mas volta a números semelhantes ao basal as 48h após o desafio. Na pleura se evidencia o predomínio de linfócitos T CD8, mas após o desafio percentualmente se modifica pouco. A queda das CD8LL observada no baço após desafio intra-pleural é muito mais discreta daquela que tínhamos observado em trabalho anterior após desafio endovenoso com *T. cruzi*.

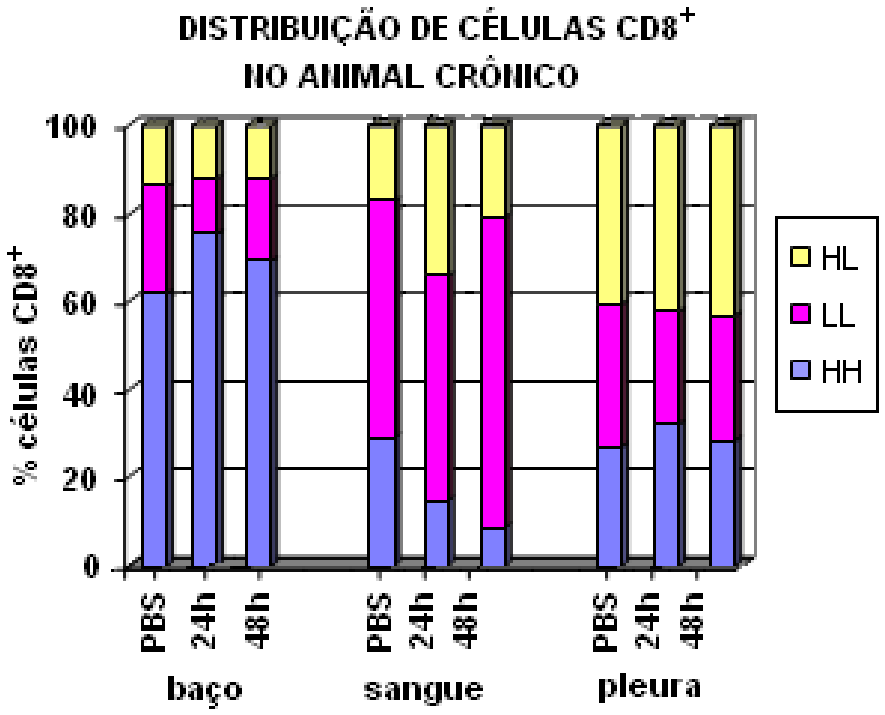

Figura 21– Distribuição percentual (A) das subpopulações de células $CD8^+$ em camundongos crônicos desafiados intrapleuralmente com antígeno de *T. cruzi* no baço, sangue e pleura após 24 e 48 horas. Camundongos C57BL/6 crônicos foram desafiados intrapleuralmente com antígeno de T. cruzi ($1x10^8$ tripomastigotas) e PBS esteril como controle e avaliados após desafio por lavado pleural e posterior marcação para FACS.

Quando avaliamos em números absolutos as diferentes sub-populações celulares nos diferentes compartimentos, podemos observar que a diferencia do

que acontece no desafio inespecifico com Poly-IC que era um reflexo em menor intensidade do desafio *in vivo* com trypanosoma vivo, no desafio intra pleural nos evidenciamos que em números absolutos os linfocitos T CD8 do baço não tem uma alteração significativa nas 24h nem nas 48h após o desafio. No sangue que no inicio tem um valor de de $12x10^4$ aumenta para $15,5x10^4$ nas 24h após o desafio e cai para perto de $9x10^4$ nas 48h após o desafio, surpreendentemente nos confirmamos a diminuição de linfócitos T CD8 HH progressivamente nas 24 a 48h após o desafio, nota-se um aumento evidente das células CD8HL nas primeiras 24h após o desafio mas volta a valores perto do basal, e os linfócitos T CD8LL tem um aumento mais discreto nas primeiras 24h após desafio que volta a valores semelhantes do basal após 48h do desafio. A diminuição no número total de células $CD8^+$ no sangue é a custas dos linfócitos T CD8HH. Em todo momento as células CD8LL constituem a população predominante.

Na pleura todas as populações aumentam após o desafio com antígeno de *T. cruzi*, reforçando o predomínio das células CD8HL, que de valores iniciais de $3x10^4$ aumenta ate $16x10^4$ células e se mantiveram num numero estável nas 24h e 48h após o desafio com uma tendência a manter números mas elevados de linfócitos T CD8 HL.

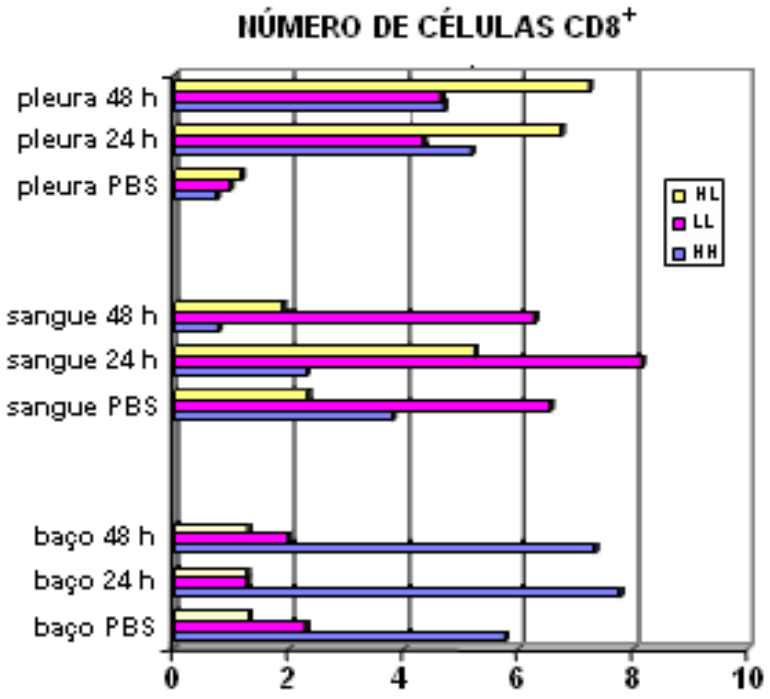

Figura 22 – Numero das subpopulações dos linfócitos T CD8$^+$ no baço, sangue e pleura de camundongos crônicos desafiados intrapleuralmente com antígeno de *T. cruzi* por 24 e 48 horas. Camundongos C57BL/6 crônicos foram desafiados intrapleuralmente com antígeno de T. cruzi ($1x10^8$ tripomastigotas) e PBS esteril como controle e avaliados após o desafio por lavado pleural e posterior marcação para FACS.

4.14 DESAFIO COM MACRÓFAGOS (DCS) INFETADAS COM *TRYPANOSOMA CRUZI* CAUSA RECRUTAMENTO SELETIVO DE CÉLULAS CD8$^+$, PORÉM EM MENOR INTENSIDADE QUE O DESAFIO COM ANTÍGENO DE TRYPANOSSOMA.

Como indicado anteriormente, a ruptura espontânea de um ninho de amastigotas num tecido resulta na liberação de tripomastigotas e antígeno de *T. cruzi*. No entanto, parte destes tripomastigotas podem ser fagocitados por células da estirpe macrofágica (macrófagos e DCs) residentes no local, interação que resulta na produção de diversas moléculas pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas, produtos do acido araquidônico etc. Pela sua vez, a interação de

algumas destas moléculas com os vasos próximos ao local da quebra do ninho resulta na indução de moléculas de adesão, elementos fundamentais para se iniciar o recrutamento leucocitário. Para caracterizar a migração de células das diferentes sub-populações $CD8^+$ em resposta às moléculas secretadas pelas células macrofágicas, camundongos crônicos foram desafiados via intra-pleural com macrófagos infectados com trypanosoma cruzi, células macrofágicas de controle, ou PBS, e 36 horas mais tarde procedemos à análise do infiltrado intra-pleural.

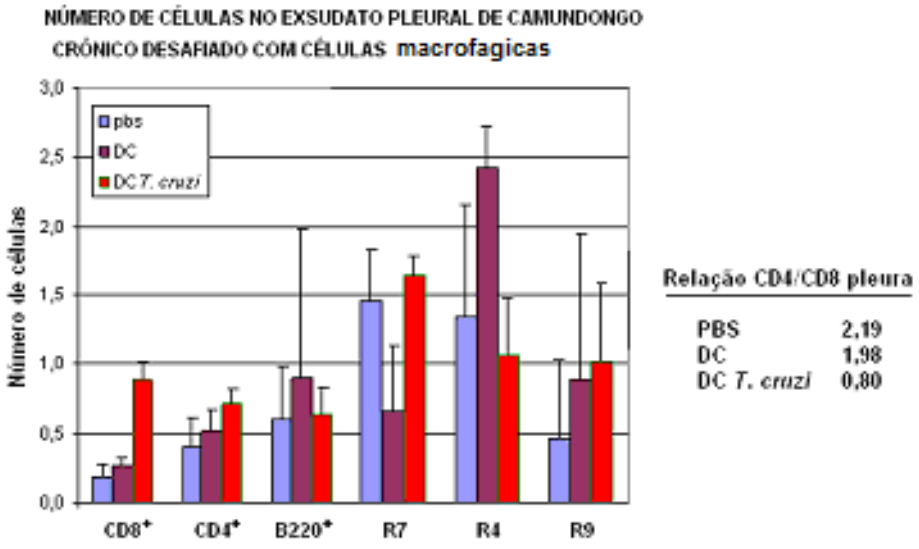

Figura 23– Número total de células infiltrantes na cavidade pleural de animais C57BL/6 crônicos, 24 horas após desafio intra-pleural com PBS, células dendríticas ou células dentriticas infetadas com *T. cruzi* da cepa Y na relação 5:1. R7 e R4 correspondem a macrófagos e R9 a PMN.

Neste experimento, observamos as células linfoides são as que mostram uma maior e mais seletiva migração intra-pleural em resposta à inoculação de macrófagos infetados são os linfócitos $CD8^+$. Assim, se analisamos a relação CD4/CD8 no infiltrado pleural verificamos que ela é alta no grupo desafiado com

PBS (2,19) e muito semelhante à dos animais desafiados com macrofagos não infectadas (1,98). No entanto, nos camundongos desafiados com macrofagos infetados com *T. cruzi* observamos uma migração intensa de células $CD8^+$, que logra inverter a relação CD4/CD8 até 0,8. Em relação às células B ($B220^+$), elas constituem a população predominante na cavidade pleural do animal desafiado com PBS, e pouco se alteram após a inoculação de macrofagos ou macrofagos infetados, similarmente ao observado na inoculação de antígeno de *T. cruzi*.

Numa analise minuciosa da população macrofágica no infiltrado intra-pleural dos diferentes grupos de animais crônicos inoculados distinguimos uma população de células grandes (R4) e outra de células pequenas (R7). Curiosamente uma diminuição de macrófagos pequenos e um aumento de macrófagos grandes foi observado nos animais crônicos desafiados com dendríticas não infetadas, mas não naqueles desafiados com dendríticas infectadas. Em relação aos PMN (R9), observamos poucas mudanças pelo desafio, fato diferente daquele registrado no desafio com antígeno de *T. cruzi* onde se observa uma migração preferencial de PMN nas primeiras 24h. Estes resultados indicam que a forma de apresentação do antígeno pode mudar o perfil de migração leucocitária.

4.15 A TRANSFERÊNCIA DE ESPLENÓCITOS DE CAMUNDONGO CRÔNICO PROTEGE PARCIALMENTE DA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

Tendo como objetivo final avaliar a atividade funcional *in vivo* das células CD8LL e mais concretamente para verificar se esta população tem papel protetor frente ao *T. cruzi*, realizamos um experimento inicial de padronização do ensaio de proteção por transferência de esplenócitos totais. Desta forma, $2x10^6$ células de baço de camundongo crônico (cepa Y), ou de camundongo controle não infectado, foram transferidas i.p. para receptores sadios e duas horas após a

transferência os animais foram infectados com 50.000 ou 5.000 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* para análise de parasitemias nos dias subsequentes.

Nos camundongos transferidos com células do baço de animal controle e desafiados com 50.000 trypanossomas o pico da parasitemia ultrapassa os $100x10^4$ *T.cruzi* ml, enquanto que nos animais transferidos com esplenócitos de camundongo crônico e infectados com a mesma dose de parasitas, o pico é de pouco mais de $60x10^4$ *T.cruzi* ml. Assim, na infecção por 50.000 *T. cruzi,* a proteção que resulta da transferência de $2x10^6$ células de baço crônico foi muito discreta.

Nos camundongos infetados com 5.000 trypanosomas pode-se observar que no grupo transferido com esplenócitos de camundongo não infectado o pico de parasitemia atinge um valor próximo a $70x10^4$ parasitas/ml, enquanto que naqueles que receberam células do baço de camundongo crônico a parasitemia foi sensivelmente menor (inferior a $20x10^4$ parasitas/ml), clara evidencia de um efeito protetor parcial.

A pesar de que não obtivemos uma proteção total, o experimento é alentador já que nos indica que com um número relativamente baixo de células ($2x10^6$ esplenócitos) é possível obtermos um relativo controle na infecção por um número pequeno, mas ainda considerável, de *T. cruzi*. Assim, a proteção será provavelmente maior se a infecção for realizada com 1000 *T. cruzi*/animal.

As duas tentativas de obtermos "sorted CD8LL" de baço de animal crônico utilizando o aparelho FACS VANTAGE do departamento de Imunologia resultaram em preparações com um grau muito baixo de pureza, inadequadas para avaliar o efeito protetor das células CD8LL.

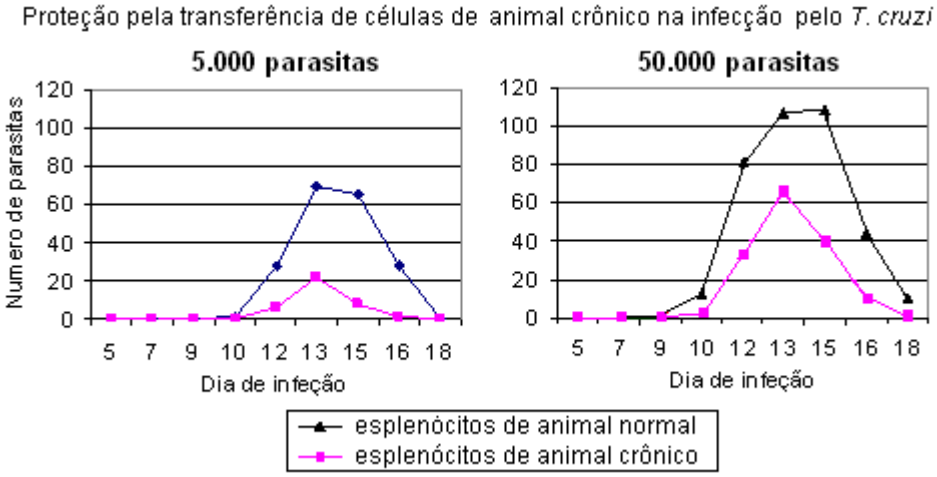

Figura 24– Curva parasitêmica de animais infetados com 5.000 (A) ou 50.000 (B) após transferência de esplenócitos de animal controle ou de animal crônico. Camundongos C57BL/6 sadios foram transferidos com $2x10^6$ células esplênicas de camundongo controle ou camundongo crônico (cepa Y), e, após duas horas, infetados com tripomastigotas de repique da cepa Y.

4.16 GERAÇÃO E MANTENIMENTO DAS CELULAS $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ DE CAMUNDONGOS NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

O terceiro objetivo principal deste projeto é esclarecer se a geração das células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ decorre exclusivamente da estimulação contínua através do TCR, ou há outros elementos participando no seu estabelecimento e/ou manutenção. Esta pergunta foi avaliada analisando o fenótipo das células T $CD8^+$ em camundongos deficientes em determinadas populações/mediadores da resposta imune infetado com T. cruzi e posteriormente determinada a geração de linfócitos T CD8 LL.

Animais com ausência dos linfócitos T $CD4^+$, deficientes nas citocinas IL-12/IL-23 ou deficientes em INF-gama, na molécula receptora de sinal co-

estimulador CD28, ou na enzima iNOS, assim como animais deficientes no fator de transcrição IRF-1, que mostram um número reduzido de células $TCD8^{+}$, foram infetados. Estas experiências foram realizadas com *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4, que por ter uma baixa virulência, permite nos animais deficientes uma sobrevida maior do que na infecção por parasitas da cepa Y. Nestes animais, a presença de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ foi avaliada no baço.

4.17 PARASITEMIA EM DIFERENTES CAMUNDONGOS IMUNO-DEFICIENTES

Para a realização desta parte do projeto os camundongos imunedefientes foram infetados com o Trypanosoma cruzi cepa Sylvio X10/4, o numero de parasitas infetantes foi de $1x10^6$ parasitos por camundongo, a via de infecção foi intraperitoneal, foram avaliadas as parasitemias, e como já sabíamos por estudos anteriores a visualização de trypamastigotas circulantes em camundongos imune competentes durante a fase aguda é um evento raro na infecção murina pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4. Observamos que os camundongos deficientes em linfócitos T CD4, linfócitos TCD8, deficientes em CD28, deficientes em iNOS, e deficientes em IL-12 não apresentaram parasitemia patente durante a fase aguda nem durante todo o tempo que duro o experimento, o foi muito baixa em um ou outro camundongo IL-12-KO, CD4-KO. CD8-KO, mais os camundongos deficientes em INF-gamma apresentarom parasitemia a partir do dia 17 p.i., ela se apresento de forma progressiva com um aumento lento ate o dia 30 p.i. onde llego a cerca de 200p-ml, de forma semelhante nos camundongos nude/nude (em background BALB/c) apresentaram parasitemia a partir do dia 15 p.i. (Figura 25) mas a diferencia do camundongo deficiente em INFgama ela foi rapidamente progressiva, llegando ate valores de 400p-ml no dia 17.

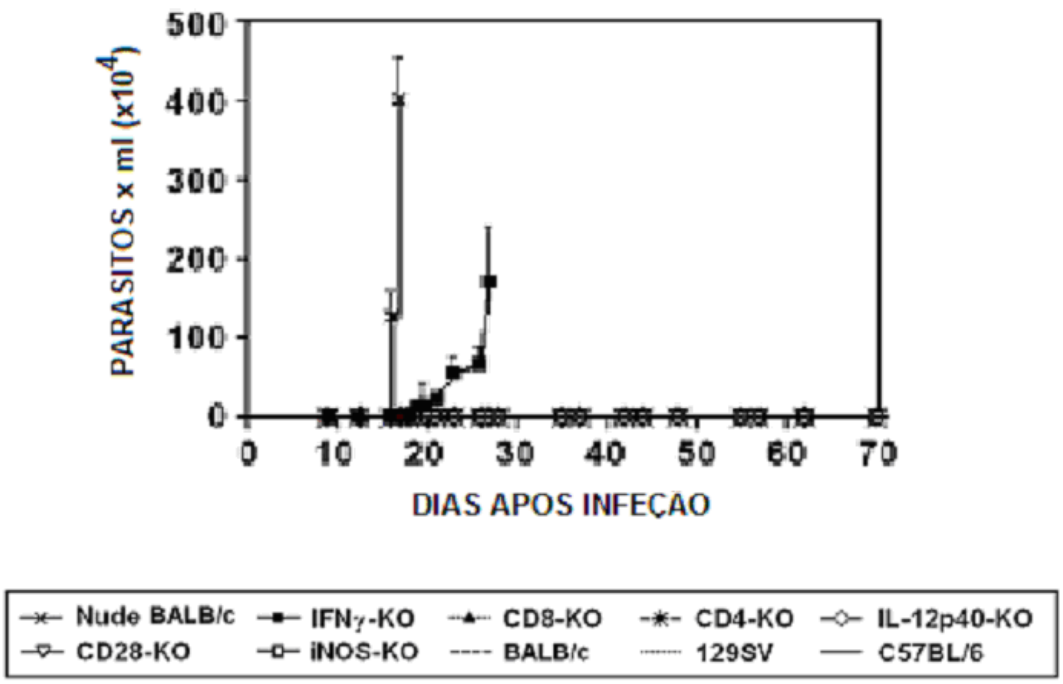

Figura 25- Curvas de parasitemia (A) e mortalidade (B) de camundongos de diferentes linhagens imuno-deficientes e camundongos controle WT infectados. Os camundongos deficentes em IL-12, INFg, CD4, CD8, CD28, iNOS e nude foram infetados com $1x10^6$ *T. cruzi* de cultura da cepa Sylvio X10/4 por via intraperitoneal,

Em concordância com os resultados da parasitemia, 100% dos camundongos nude (BALB c) morreram ao redor do dia 17p.i. enquanto que os camundongos deficientes em INFgama morreram perto do dia 30p.i.. A despeito da negatividade das parasitemias, os camundongos imunedefientes que não tiveram parasitemia evidente durante a fase aguda tal como IL-12p40-KO infectados, 100% dos camundongos acabaram morrendo até o dia 62 p.i. Pela sua vez, nos camundongos deficientes em linfócitos TCD4-KO tiveram uma mortalidade de 60% até o dia 64 p.i. e os camundongos deficientes em linfócitos TCD8-KO uma mortalidade de 30% até o dia 70 p.i. Em contraste, a totalidade dos camundongos CD28-KO e iNOS-KO infectados sobreviveram até essa data (Figura 26).

Já nos camundongos SV129 WT e SV129 IRF1-KO infetados i.p. com 1000 formas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*, a parasitemia se torna evidente por volta da segunda semana de infecção, sendo que 100% dos animais deficientes em IRF-1 acabam falecendo, enquanto que os camundongos WT SV129 controlam a infecção aguda, as parasitemias se tornando negativas (dados não mostrados).

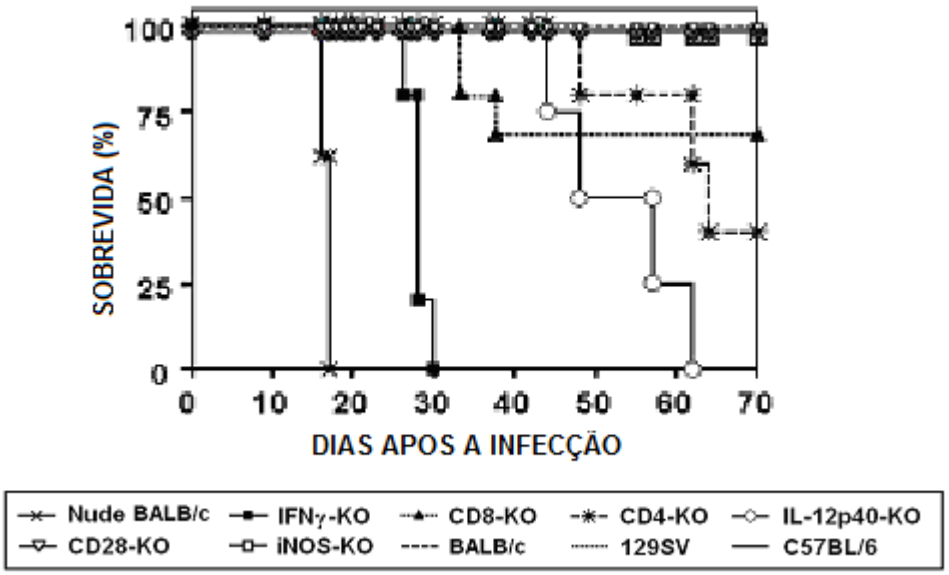

Figura 26- Curvas mortalidade de camundongos de diferentes linhagens imuno-deficientes e camundongos controle WT infectados. Os camundongos deficentes em IL-12, INFg, CD4, CD8, CD28, iNOS e nude foram infetados com $1x10^6$ *T. cruzi* de cultura da cepa Sylvio X10/4 por via intraperitoneal.

4.18 CAMUNDONGOS DEFICIENTES NA RECEPÇÃO DO SINAL CO-ESTIMULADOR POR CD28, NA ENZIMA iNOS, OU NA POPULAÇÃO T $CD4^+$, GERAM CÉLULAS $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$

Os camundongos CD28-KO infectados por Sylvio X10/4 não mostram maior morbidez que os camundongos WT infetados, e não apresentam maiores diferenças em relação à distribuição percentual e números absolutos das

populações $CD8^+$, $CD4^+$ e $B220^+$ no baço. Em relação às mudanças decorrentes da infecção, observam-se nos animais CD28-KO um aumento das células $CD8^+$ no dia 35 p.i., que desce no dia 54 p.i. a níveis semelhantes à mostrado pelos animais WT infetados (dados não mostrados).

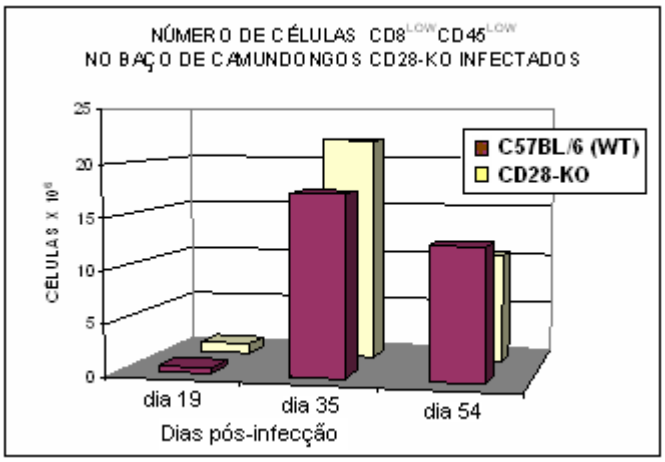

Figura 27– Número total de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço de camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes para a molécula CD28, em diferentes momentos após infecção com 10^6 *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4.

Por outro lado, no que se refere às sub-populações $CD8^+$, no dia 19 pós-infecção, não se observam ainda células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço dos animais CD28-KO e WT infectado. No dia 35 p.i., entretanto, há o aparecimento definitivo da população $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ em níveis semelhantes aos do animal WT infetado (Figura 28). Em forma análoga à população $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$, as freqüências e números de células $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$ e células $CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$ dos animais CD28-KO infectados não são diferentes daquelas nos camundongos WT infetados, ainda que mostram uma tendência para diminuir em fases mais tardias da infecção.

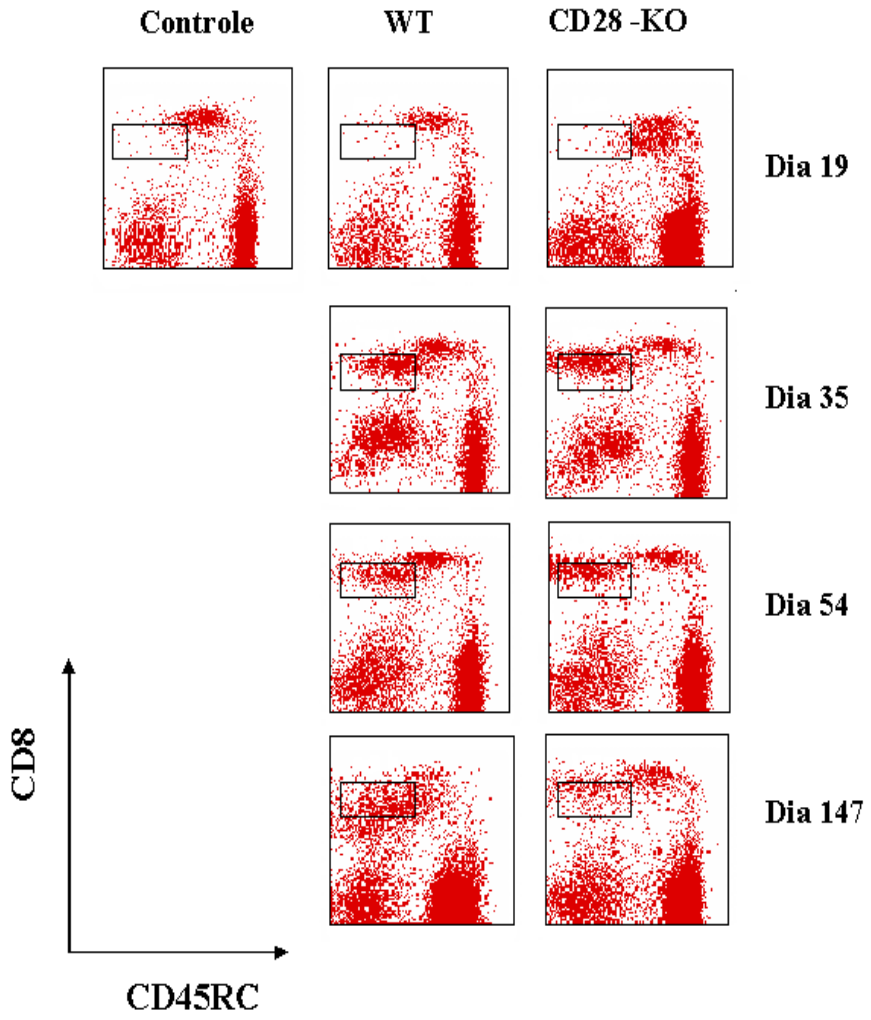

Figura 28– Indução de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ em camundongos C57BL/6 não infetados (controle) e em camundongos C57BL/6 (WT) e CD28-KO infectados i.p. com 10^6 *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4.

Camundongos iNOS-KO não mostram parasitemia patente e têm 100% de sobrevida até o dia 125 p.i., mas têm aumento significativo da freqüência de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ (Figura 26). O fato dos animais iNOS-KO infectados e tratados com Benzonidazol terem números mais elevados de células CD8LL no dia 37 p.i. do que os animais iNOS-KO infectados e não tratados, poderia sugerir que

o excesso de parasita/antígeno de *T. cruzi* de alguma forma inibe a regulação negativa de receptores e co-receptores. No entanto, nos animais IL-12p40-KO infectados, o tratamento com esta droga não resultou em aumento de células $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ (dados não mostrados).

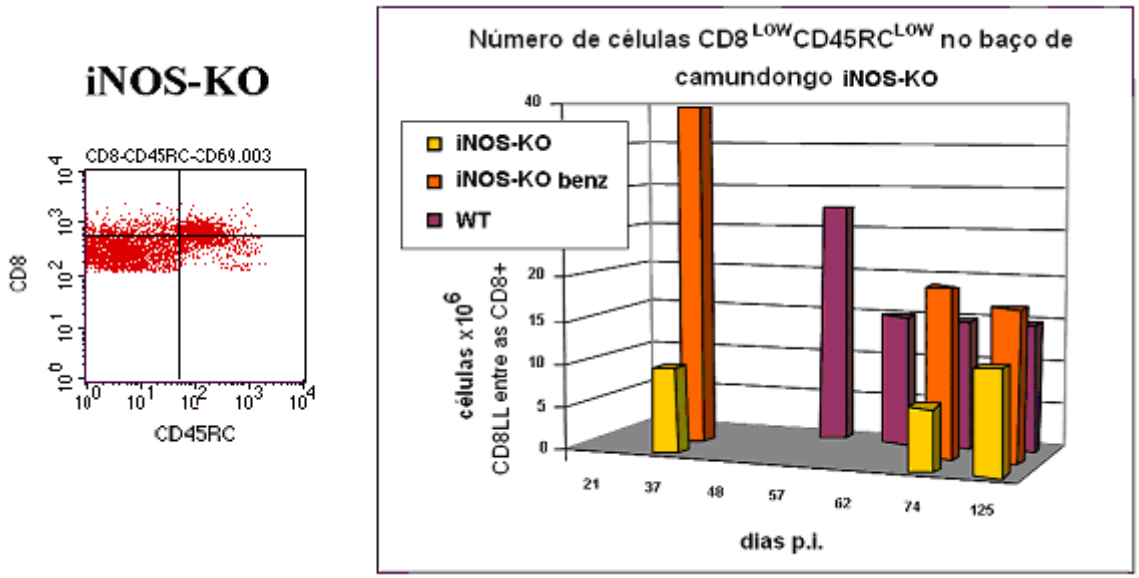

Figura 29– Indução de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ em camundongos C57BL/6 (WT) e em camundongos deficientes para iNOS infectados i.p. com 10^6 *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4. Uma fração dos animais iNOS-KO infectados foi tratada com benzonidazol oral (1g/Kg de peso).

Os camundongos CD4-KO infectados por parasitas SylvioX10/4 não mostram parasitemia patente y têm uma taxa de sobrevida de 60% até o dia 125 p.i. Nestes animais, a geração de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ não se altera durante a fase aguda, mas, nas fases sub-aguda e crônica, o porcentual e número absoluto de células $CD8^+$ e da sub-população $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ chega a ser a metade à encontrada no camundongo WT crônico. Estes resultados poderiam indicar a necessidade das células $CD4^+$ pra manter níveis altos de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$. No entanto, não podemos descartar a possibilidade do menor

número destas células no camundongo CD4-KO seja devido a uma maior mobilização de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ para os tecidos infectados, com conseqüente diminuição no baço.

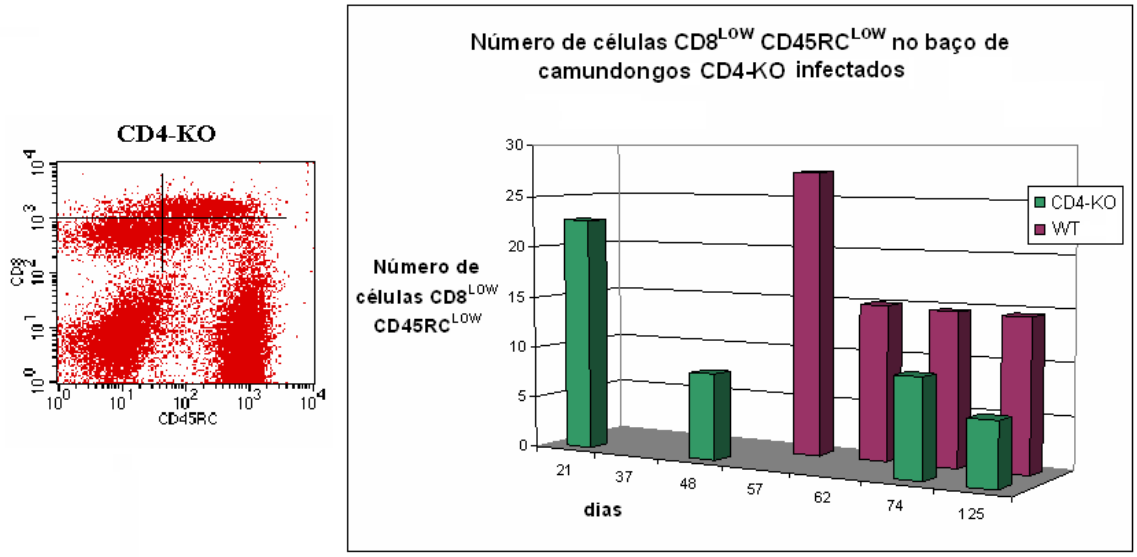

Figura 30– (A) Dot-plot representativo da distribuição de sub-populações $CD8^+$ no baço de um animal CD4-KO infectado, e (B) número de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço de camundongos C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para CD4 (CD4-KO), infectados com 10^6 *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4.

4.19 CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM IL-12/IL-23 TÊM DEFICIÊNCIA PARCIAL NA GERAÇÃO DE CÉLULAS CD8LL E CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM INF-GAMA TÊM UM SEVERO COMPROMISSO NA GERAÇÃO DE CÉLULAS CD8LL

A diferenciação em linfócitos T $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ mostrou-se muito baixa nos camundongos INF-gama-KO e IL12p40-KO infectados por parasitas Sylvio X10/4. Estes resultados não implicam obrigatoriamente a necessidade do INF-gama e/ou da IL-12/IL-23 para a regulação negativa de receptores/co-

receptores, uma vez que o escasso número de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ poderia ser também devido ao aumento da carga parasitaria nestes animais. No modelo de infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y temos anteriormente observado que as células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ não estão presentes no baço durante a fase aguda da infecção, quando o nível de *T. cruzi* no sangue e tecidos atinge seu pico. Entretanto, elas atingem freqüências elevadas logo após o controle da parasitemia, declinando em forma gradativa a partir deste momento e no decorrer da fase crônica (se isto for verdade os camundongos IL12p40-KO tratados com Benz deveriam ter aumento das CD8LL, ao igual que os iNOS-KO tratados). No camundongo IL-12p40-KO infectado, tratado ou não tratado com Benzonidazol, não se observa parasitemia patente, mas a taxa de mortalidade atinge 100% por volta do dia 55 p.i. No camundongo IL-12p40-KO tratados com Benzonidazol se evidencia uma discreta diminuição de células $CD8^+$, que em números absolutos representa uma diminuição de 37% em relação à do animal WT infectado; no entanto, posteriormente o número de células $CD8^+$ se torna semelhante ao do animal não deficiente. Nos animais IL-12p40-KO infectados e não tratados observa-se uma diminuição progressiva da porcentagem de células $CD8^+$ que se alastra até o dia da morte (dados não mostrados). Em relação às sub-populações $CD8^+$, a geração da sub-população $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ está diminuída em ambos os grupos (29% e 10% dos números no animal WT crônico). Percentualmente os animais IL-12p40-KO tratados e não tratados têm numero semelhante de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ na fase subaguda, mas no inicio da fase crônica a freqüência de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ chega a ser o dobro nos animais IL-12p40-KO tratados em relação à dos animais IL-12p40 não tratados (Figura 31).

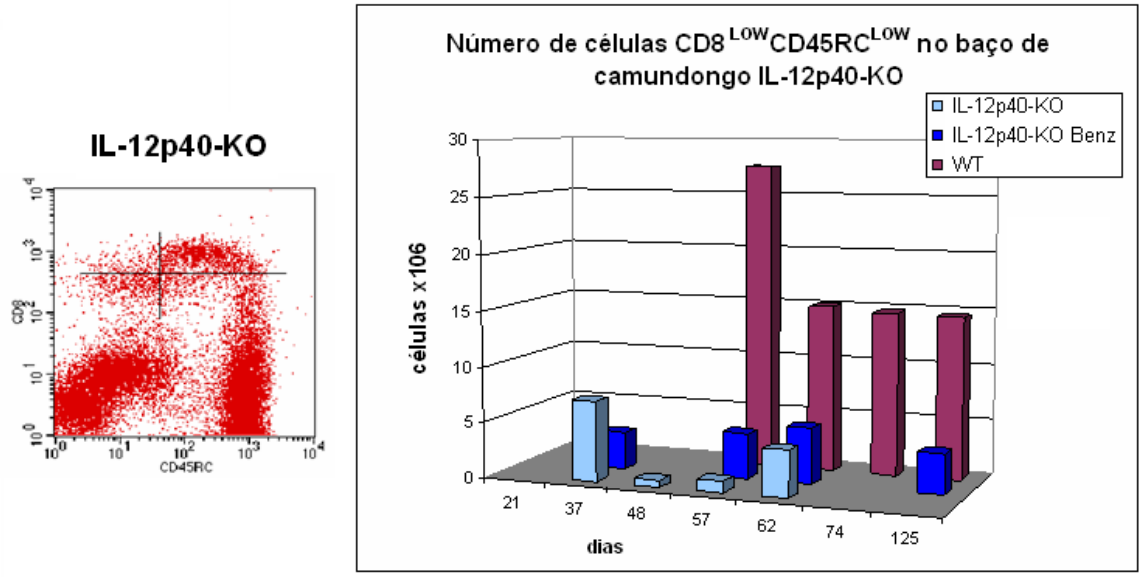

Figura 31– (A) Dot-plot representativo da distribuição de sub-populações $CD8^+$ em um animal IL-12p40-KO infectado e (B) número de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço de camundongos C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para IL-12p40 (IL-12p40-KO), infectados com 10^6 *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4. Uma fração dos animais IL-12p40-KO infectados foi tratada com benzonidazol oral (1g/Kg de peso).

Nos camundongos INF-gama-KO infectados por Sylvio X10/4 o número de linfócitos T $CD8^+$ no baço é menor que no camundongo WT infectado. Em relação às sub-populações $CD8^+$, observa-se no animal INF-gama-KO infectado uma distribuição alterada com predomínio da sub-população $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$, sugerindo a necessidade desta citocina na geração da sub-população $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ (Figura 32).

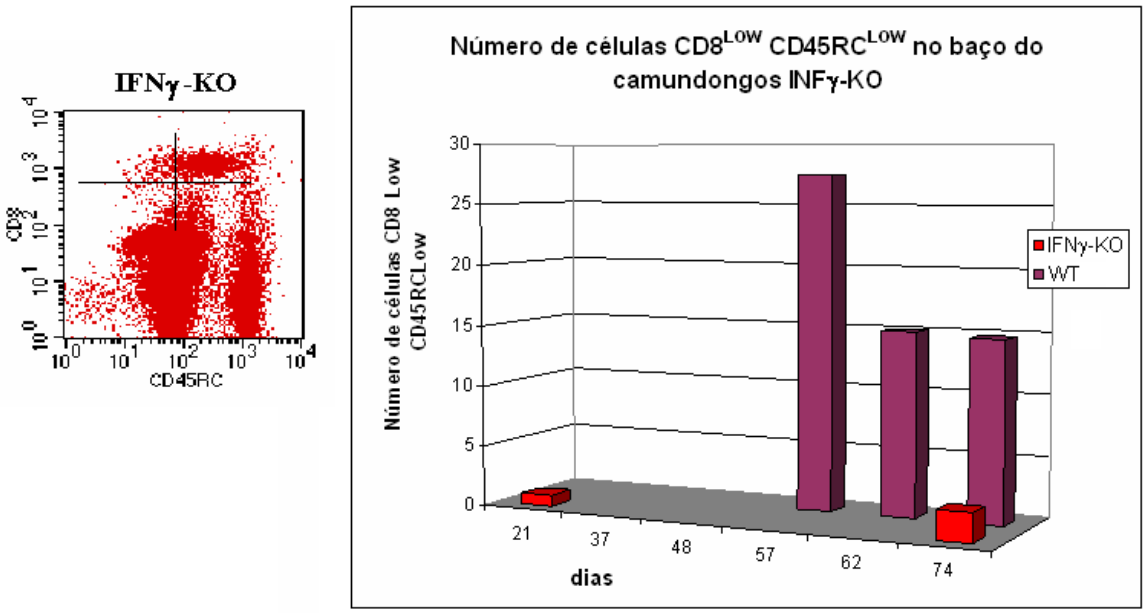

Figura 32– (*A*) Dot-plot representativo da distribuição de sub-populações $CD8^{+}$ em um animal IFN□-KO infectado e (B) número de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço de camundongos C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para IFN□ (IFN□-KO), infectados com 10^{6} *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4.

Nas figuras anteriores temos visto que o número de células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ no baço de camundongos IL-12p40-KO e INF-gama-KO infectados é baixo, particularmente no segundo. Estes resultados podem indicar a necessidade destas citocinas na geração das células CD8LL. No entanto o papel destas citocinas pode ser indireto, pelo seu papel no controle da carga parasitária sistêmica. Mais ainda, como estes animais têm alto nível de parasitismo tissular, a baixa freqüência de células CD8LL no baço pode ser também decorrente da sua acentuada migração para os focos inflamatórios tissulares.

4.20 CAMUNDONGO IRF1-KO (QUE APRESENTA UMA REDUÇÃO MARCADA NO NÚMERO DE CÉLULAS CD8$^+$) CONSEGUE GERAR CÉLULAS CD8$^+$ EFETORAS APÓS O CONTROLE DA FASE AGUDA COM TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

Os IRFs constituem uma família de fatores de transcrição relacionados ao interferon, sendo descritos como os mais importantes o IRF-1, IRF-2 e IRF-3. A deficiência no IRF-1 (IRF1-KO) resulta em uma falha na geração de células CD8$^+$, população que sofre uma redução de até 20 vezes em relação aos animais controle. Sendo este um modelo interesante para avaliar a geração de células CD8LL em camundongos sabidamente com deficiência parcial destas células. Nas nossas experiências observamos que a infecção do camundongo IRF1-KO com *T cruzi* da cepa Y resulta na morte na fase aguda, enquanto que os controles SV129 conseguem controlar a infecção. No entanto, o tratamento do camundongo IRF1-KO infectado com Benzonidazol com a dose descrita permite que o animal tenha tempo necessário para montar uma resposta imune e sobreviva a fase aguda da infecção passando à fase crônica.

Nos animais IRF1-KO cronificados através do tratamento com Benzonidazol se aprecia, em relação aos animais WT crônicos (da linhagem SV129), uma freqüência menor de células CD8$^+$ e uma freqüência discretamente maior de células CD4$^+$. Já em números absolutos se evidencia nos animais IRF1-KO crônicos um número menor de células CD8$^+$ (6 vezes menor do que nos animais WT crônicos). Por outro lado, nos animais IRF1-KO crônico se observa uma pequena queda no número de células Tgamadelta e, dentre os fagócitos, um predomínio das células com fenótipo Mac1$^+$ enquanto que no camundongo SV129 crônico há predomínio das células Ly6G$^+$ (Figura 30,A-B).

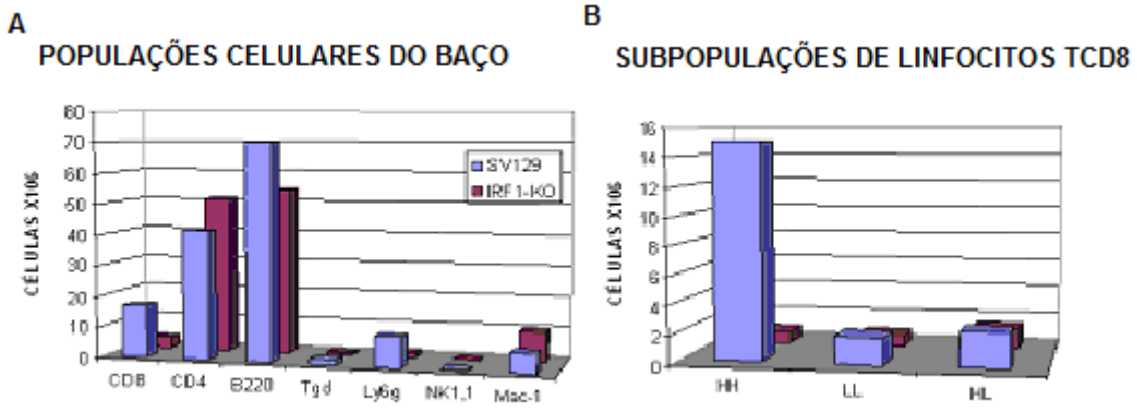

Figura 33– Numero total de células das populações celulares do baço(A) das subpopulações de linfócitos T CD8(B). Camundongos IRF1-KO e WT crônicos foram infectados com 10^3 *T. cruzi* da cepa Y e na fase crônica avaliado as populações celulares por FACS..

Apesar da deficiência no numero de linfócitos T $CD8^+$ no baço do camundongo IRF1-KO crônico, observamos que após o tratamento quimioterapeutico especifico foi possível montar uma resposta imune adequada aonde as células TCD8 conseguem se diferenciar em células TCD8LL. Assim, quando comparadas as células $CD8^+$ dos camundongos WT elas mostram uma distribuição e numero absoluto semelhante de células CD8LL que os camundongos WT.

Em números absolutos é evidente o predomínio da sub-população CD8HH no camundongo SV129 crônico (75%), mais consegue gerar linfócitos T CD8 LL (10,5%) alem de linfócitos T CD8 HL (10%). Já no camundongo IRF1-KO crônico podemos observar um evidente predomínio de linfócitos T CD8 HL (46,6%), enquanto que a sub-população CD8HH mostra valores baixos (28,3%), mas tem linfócitos T CD8LL (25%) em maior quantidade que o controle.

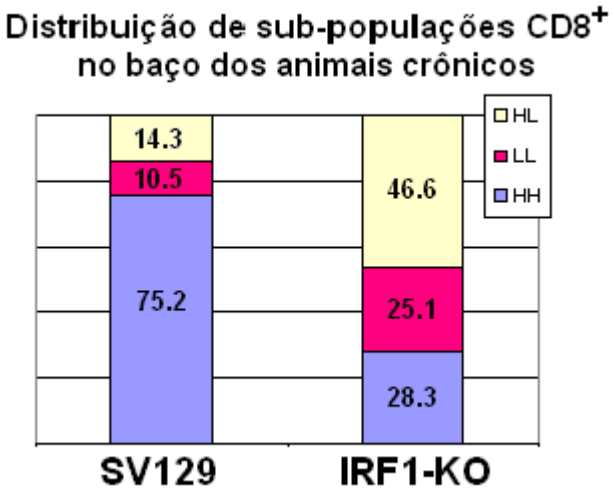

Figura 34– Distribuição porcentual das sub-populações CD8$^+$ esplênicas nos camundongos crônicos WT (SV129) e IRF1-KO. O gráfico acima indica a distribuição porcentual de cada sub-população em exame *ex vivo*. A infecção foi realizada com 10^3 *T. cruzi* do clone Y.

4.21 CAMUNDONGO IRF1-KO (QUE APRESENTA UMA REDUÇÃO MARCADA NO NÚMERO DE CÉLULAS CD8$^+$) CONSEGUE GERAR CÉLULAS CD8$^+$ EFETORAS APÓS O CONTROLE DA FASE AGUDA COM TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A pesar da deficiência no número de células CD8$^+$ e das diferencias na distribuição de sub-populações, as células CD8$^+$ dos camundongos IRF1-KO crônicos (que foram tratados com Benzonidazol) têm uma sobrevida semelhante às do controle sadio (dados não mostrados), indicando que estas células seriam funcionalmente suficientes para manter o controle parasitário.

Estimando o estado de ativação das sub-populações CD8$^+$ pela expressão da molécula CD69 observamos que, apesar de estarem em número reduzido, as células CD8HH do animal IRF1-KO crônico se encontram em um estado mais alto

de ativação (5% a 30% destas células são CD69^{+} nos animais SV129 e IRF1-KO crônicos, respectivamente). No entanto, a sub população quem mostra o nível mais elevado de ativação do animal IRF1-KO crônico é CD8HL, superior também à do animal SV129 crônico. Curiosamente, a população CD8LL apresenta nível de ativação semelhante em ambos os animais crônicos (Figura 35). Assim, podemos concluir que apesar de que as células CD8^{+} do animal IRF1-KO crônico se encontram em número menor, elas estão em um estado de maior ativação.

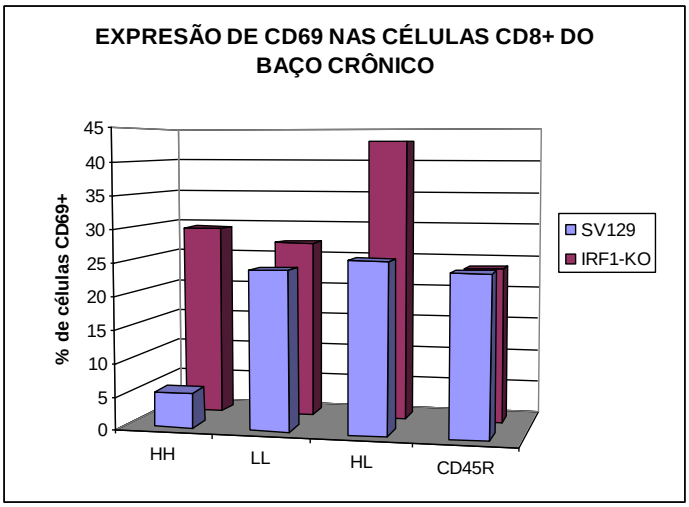

Figura 35– Freqüência de células CD69 nas sub-populações celulares CD8^{+} e B (CD8^{-} CD45RC$^{VERY\ HIGH}$) esplénicas de camundongos crônicos WT e IRF1-KO, após estimulação *in vitro* por 6 horas com anticorpo anti-CD3.

As células CD8+ do camundongo IRF1-KO crônico são células funcionalmente eficientes, não apresentando deficiência na produção de INF-gama, o que pode ser constatado na produção espontânea e principalmente, após estimulação in vitro com anti-CD3. Quando contemplamos os números absolutos de células CD8^{+} IFN-gama por baço observamos que estes são muito semelhantes em ambos os animais crônicos (Tabela 2).

Tabela 2– Porcentuais e números totais de células produtoras de INFg nas células $CD8^+$ de camundongos IRF1-KO e SV129 crônicos após 6 horas de cultura com ou sem anticorpos anti-CD3 e anti-CD28.

	PRODUÇÃO DE IFN gama PELAS CÉLULAS $CD8^+$ DO BAÇO DE ANIMAIS CRÔNICOS			
	Porcentagem		Número de células x 10^6	
anti-CD3	-	+	-	+
SV129	0,81	4,23	0,16	0,82
IRF1-KO	2,4	27,1	0,08	0,87

Estes resultados sugerem que o controle parasitário mediado pelas células $CD8^+$INF-gama$^+$ independe do número total de células $CD8^+$. Por outro lado, observamos neste modelo experimental que a diferenciação para o fenótipo $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ acontece na ausência do fator de transcrição IRF-1, em forma idêntica que acontece a diferenciação para a função efetora. Em forma interessante, predominam no baço dos animais IRF1-KO crônicos as células CD8HL, fenótipo predominante nos tecidos do animal infectado.

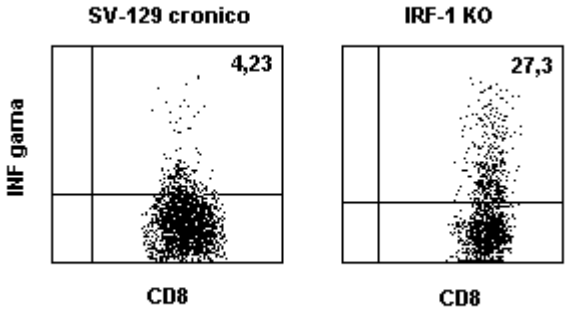

Figura 36– Freqüência de células produtoras de INF-gama. Células esplênicas de camundongos crônicos SV-129 WT e IRF1-KO após estimulação *in vitro* por 6 horas com anticorpo anti-CD3 foi determinada a produção de INF-gama por marcação intracelular.

4.22 CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM INF-GAMA OU EM IL-12P40 QUANDO INFETADOS COM *T CRUZI* DA CEPA SYLVIO X10/4 DESENVOLVEM UM QUADRO NEUROLÓGICO

Camundongos deficientes na produção de INF-gama ou em IL-12p40 quando infetados com *T cruzi* da cepa Sylvio X10/4 numa dose de $1x10^6$ parasitos por via intraperitoneal no percurso da infecção desenvolvem um quadro neurológico subagudo progressivo, expressão de uma mielite ascendente, com paralisia progressiva da cauda, membros inferiores e membros superiores, que culmina na morte por insuficiência respiratória a conseqüência de um processo inflamatório intenso por falta de controle adequado ao *T cruzi* que invade o sistema nervoso (MARINHO et al., 2007). Esta progressão nos permitiu realizar a avaliação progressiva dos sintomas neurológicos mediante um score clinico neurológico. Os camundongos deficientes em IL-12p40 desenvolvem de forma espontânea ao redor do dia 36 p.i. o quadro neurológico, tendo uma progressão mais rápida para sintomas avançados, mais tem um tempo de sobrevida semelhante aos

camundongos deficientes em INF-gama ate ao redor do dia 60 p.i.. Os camundongos deficientes em INF-gama naturalmente não conseguem controlar a fase aguda da infecção sendo necessário à administração do medicamento parasiticida especifico no dia 18p.i. para que possa montar uma resposta imune que permita progredir ate a fase subaguda e de ser possível ate a fase crônica, neste modelo consegue controlar a fase aguda y de forma semelhante ao camundongo deficiente em IL12p40 desenvolve o quadro neurológico progressivo no dia 32 p.i. mais insidiosamente chegando a morte de todos os camundongos ao redor do dia 60p.i.

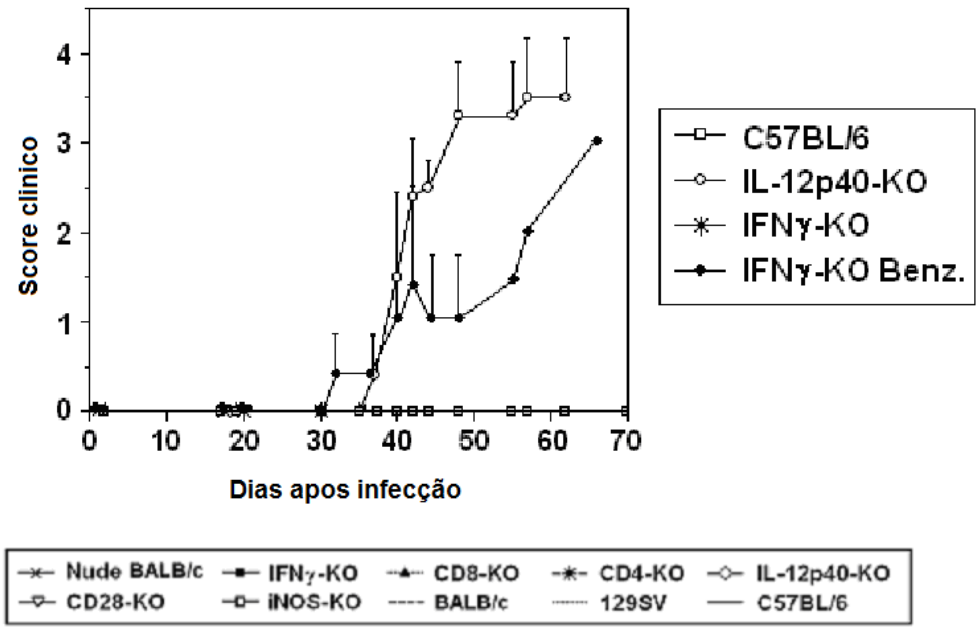

Figura 37– Score clinico da síndrome neurológico desenvolvido em IL-12p40-KO e INFg-KO tratado com benzonidazol. IL-12p40-KO e INFg-KO e C57BL/6 foram infetados com $1x10^6$ trypomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4 , os camundongos INFg-KO foram tratados com uma dose única de benzonidazol (1 mg/ml) via oral no dia 18 p.i.

4.23 A POPULAÇÃO CELULAR PREDOMINANTE NO INFILTRADO CELULAR NA MEDULA ESPINHAL DOS CAMUNDONGOS COM O QUADRO NEUROLÓGICO SÃO A PREDOMÍNIO DE MACRÓFAGOS E PMN, ALEM DE LINFÓCITOS TCD8

Este quadro neurológico subagudo progressivo, expressão de uma mielite ascendente, com paralisia progressiva nos permite realizar o isolamento do infiltrado inflamatório da medula espinhal, o que nos permite ter uma avaliação *in vivo* dos diferentes tipos celulares infiltrantes que estariam participando da resposta imune. Assim o estudo do infiltrado celular na medula espinhal nos camundongos deficientes em INF-gama-KO e IL-12p40-KO infectados com *T cruzi* da cepa Sylvio X10/4, não mostrou muita diferencia em quanto ao número total de células recuperadas da medula espinhal, sendo estes $9,5x10^6$ e $10x10^6$ células respectivamente. Contudo, nos animais IFN-gama-KO os ninhos de amastigotas foram muito mais numerosos. Em relação à distribuição populacional do infiltrado revela-se o predomínio de células $Mac1^+$, e dentro destas as mais predominantes são os macrófagos (65% e 71% respectivamente), seguido dos polimorfonucleares (PMN) (17,7% e 18,5% respectivamente). A segunda população celular mais numerosa no infiltrado celular na medula espinhal foram os linfocitos T, $CD4^+$ e $CD8^+$, que no camundongo IFN-gama-KO perfazem respectivamente 7,9% e 5,9% da totalidade do infiltrado, e no camundongo IL12p40-KO os linfócitos T CD4 e CD8 foram 2,2% e 5,2% das células no infiltrado (A relação CD4/CD8 é de 1,3 no animal INF-gama-KO infetado e de 0,4 no animal IL12p40-KO infetado). Populações menores, como $CD4^+CD8^+$ duplo-positivas e NK (NK1.1+) são também encontradas (Figura 38). O significado da diferente relação $CD4^+/CD8^+$ no infiltrado da medula espinhal dos animais IFN-gama-KO e IL-12p40-KO infectados é desconhecido. Uma possível explicação poderia ser construída considerando que as células $CD8^+$ constituem a principal fonte de INF-

gama na medula do camundongo IL-12p40-KO. Assim, na ausência desta citocina, as células CD4^{+} tentariam uma compensação aumentando o seu número para produzir outras citocinas com atividade anti- *T. cruzi*, como o TNF-alfa.

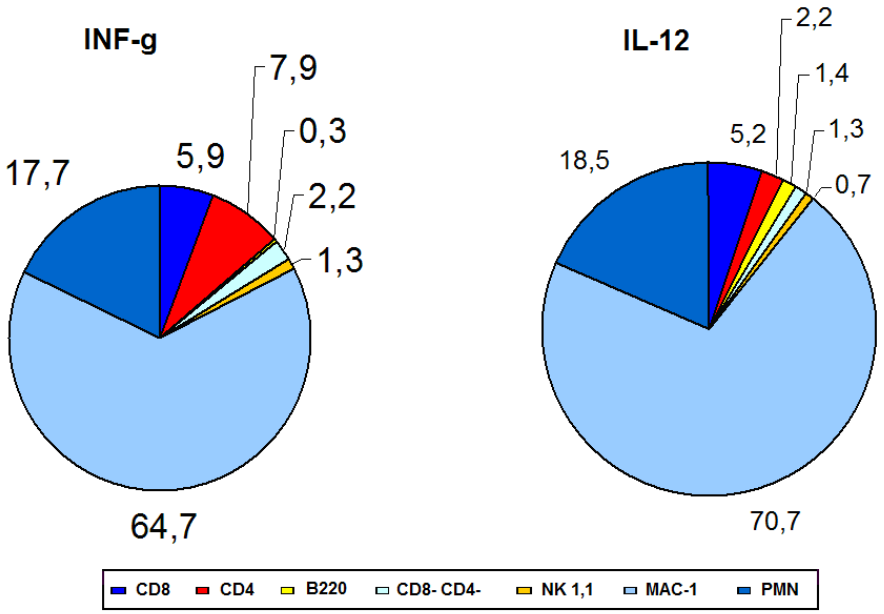

Figura 38– Freqüência das diferentes populações leucocitárias no infiltrado da medula espinhal em camundongos IFN-gama-KO e IL12p40-KO infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4. Células infiltrantes da medula espinhal foram isoladas no dia 55 p.i. de acordo ao protocolo descrito e feita a marcação de superfície com anticorpos específicos para posterior analise por FACS.

4.24 Os linfócitos TCD8^{+} que infiltram a medula espinhal de camundongos IL-12p40-KO ou IFN-gama-KO que desenvolvem o quadro neurológico sub-agudo, apresentam u m fenótipo predominantemente misto de CD8^{High} CD45RC^{Low} e CD8^{Low} CD45RC^{Low}

Como foi mostrado anteriormente o camundongo deficiente em IL_12p40 tem uma diminuição dos linfocitos T CD8^{low}CD45RC^{low} no baço e que estadeficiência na geração destas células com este fenótipo e mas severa no

camundongo deficiente em INF-gama. A diminuição desta população no baço pode responder a diversos motivos e entre estes uma maior migração para os tecidos perifericos. Nos linfócitos T $CD8^+$ isolados da medula espinhal dos camundongos IFN-gama-KO e IL-12p40-KO, que constituem em média um 5,5% do total das células infiltrantes (não tendo uma diferencia significativa entre eles), a distribuição das sub-populações mostrou a presencia dos três fenótipos estudados com um predomínio do fenótipo $CD8^{HIGH}CD8RC^{LOW}$, seguido do fenótipo $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$. A demarcação destas duas sub-populações de linfócitos TCD8 é difícil porque a expressão da molécula CD8 é um contínuo que dificulta uma separação clara. Por outro lado, a freqüência de células com fenótipo $CD8^{HIFG}CD45RC^{HIGH}$ no infiltrado medular foi muito baixa a pessar da expressão deste fenótipo por outras células que no analise mais detalhado por tamanho e granulosidade são compatíveis com células dentriticas CD8+, CD45RC+. A distribuição das diferentes sub-populações $CD8^+$ foi semelhante em ambos os camundongos knock-out, assim os linfocitos TCD8HH perto do 1%, os linfócitos CD8HL 68% e os linfócitos CD8 LL 30%. O alto número de células $CD8^{HIGH}$ $CD45RC^{LOW}$ na medula destes animais poderia ser uma indicação de que em um contexto inflamatório há re-expressão da molécula CD8 pelas linfócitos T $CD8^{LOW}$ $CD45RC^{LOW}$ que mudariam para $CD8^{HIGH}$ $CD45RC^{LOW}$. Alternativamente, a presença de células $CD8^{HIGH}$ $CD45RC^{LOW}$ no tecido poderia decorrer de uma migração seletiva desta sub-população.

Com base aos resultados obtidos consideramos que existe a possibilidade do último estagio de diferenciação do linfócito $CD8^+$ no tecido inflamado seja a re-expressão da molécula CD8 (e talvez também das moléculas CD3 e TCR) e mudança para o fenótipo $CD8^{HIGH}CD8RC^{LOW}$. Por outro lado, as células com fenótipo $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ constituiriam células antígeno-experimentadas do sangue e baço que estariam em um estado de diferenciação intermediário.

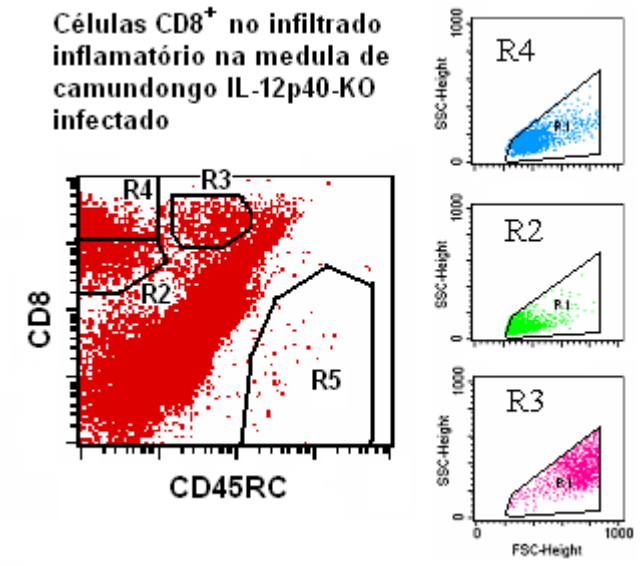

Figura 39- Freqüência de sub-populações CD8$^+$ no infiltrado da medula espinhal em camundongos IL-12p40-KO infetados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X 10/4. (A) Observa-se a presencia das três subpopulações de linfócitos TCD8 em estudo, não sendo encontrado um limite de separação definido entre as células CD8LL e CD8HL,(B) Na direita observa-se o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das sub-populações T CD8$^+$ (R4, R2 e R3). Note-se que as células da na população R3 tem grande tamanho e granulosidade, um fenótipo incompatível com o de linfócitos CD8$^+$. R5 constitui a região dos linfócitos B (CD45RC$^{VERY\ HIGH}$).

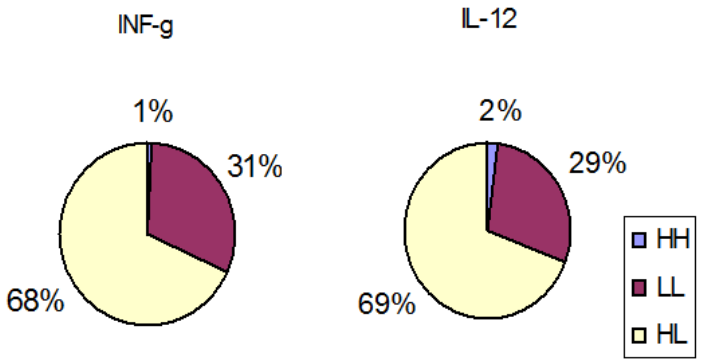

Figura 40– Freqüência das sub-populações celulares CD8$^+$ que infiltram a medula espinhal de camundongos IL12p40-KO e INF-gama-KO infectados pelo Sylvio X10/4. As células infiltratantes foram marcados com os anticorpos de superfície específicos para posterior analise por FACS.

4.25 Os linfócitos TCD8$^+$ que infiltram a medula espinhal de camundongos IL-12p40-KO ou IFNg-KO que desenvolvem o quadro neurológico sub-agudo, expressam elevados níveis de CD69 de forma espontânea

O fenótipo funcional dos linfócitos T CD8$^+$ que infiltram a medula do animal IL-12p40-KO parece ser diferente daquele descrito para as células que infiltram o coração, que para alguns autores se encontram em um estado não típico de anergia, mais também e diferente quando comparado com os linfócitos TCD8 do baço e do sangue. No nosso modelo, os linfócitos TCD8 infiltrantes expressam de forma espontânea elevados níveis da molécula de ativação CD69. A expressão deste marcador é alta em todas as sub-populações de linfócitos TCD8$^+$, podemos observar que os a subpopulação HL expressa um 80%, a subpopulação LL 40%, e ainda os escassos linfócitos T CD8 HH (menos de 1%) apresentam valores semelhantes aos linfócitos HL.(Figura 41). O fato que os linfócitos T CD8$^+$ do camundongo deficiente em IL-12p40-KO e o camundongo deficiente em INF-gama expressem quantidades elevadas de CD69, mostra que estas células estariam prontas se não que já estariam mediando uma função efetora. Tratando de conciliar os nossos resultados com aqueles de anergia acima citados, é provável que na medula do animal IL-12p40-KO infectado o ambiente inflamatório seja tão intenso que consiga reverter a sinalização negativa que leva ao estado disfuncional dos linfócitos T CD8$^+$. Alternativamente, pode ser que ainda seja cedo para a geração do fenótipo disfuncional.

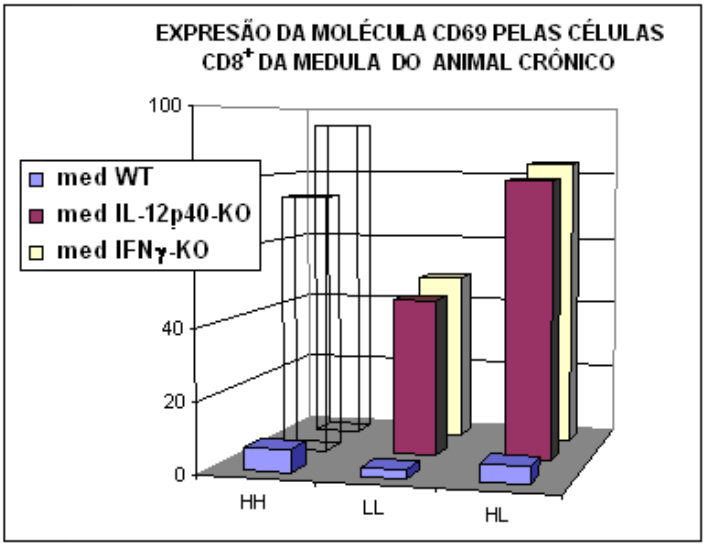

Figura 41- Expressão espontânea do marcador de ativação precoz CD69 pelas sub-populações celulares $CD8^+$ que infiltram a medula de camundongo WT crônico, IL-12p40-KO e INFg-KO. O gráfico indica a variação porcentual espontânea de células que expressam o marcador de superfície de ativação $CD69^+$ de cada sub-população em exame *ex vivo.*

4.26 OS LINFÓCITOS T $CD8^+$ QUE INFILTRAM A MEDULA ESPINHAL DE CAMUNDONGOS IL-12P40-KO PRODUZEM INF-GAMA DE FORMA ESPONTÂNEA E QUANDO ESTIMULADO COM ANTI-CD3

Outra forma de avaliar o estado funcional es medindo a expressão de INF-gama, onde nos podemos observar que os linfócitos T $CD8^+$ que infiltram a medula espinhal do camundongo IL-12p40-KO infectados, produzem IFN-gama não somente após estimulação *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 (51%), mas em forma espontânea (*ex vivo*) (16%). Estes resultados indicam que os linfócitos T $CD8^+$ que infiltram na medula dos animais IL-12p40-KO estão exercendo uma função efetora no tecido, o que acontece em um grau menor no baço do mesmo camundongo com o quadro neurológico (0,7%), no camundongo WT controle sem infetar 2,2% de forma espontânea e 7,5% dos linfocitos TCD8 quando estimulados produzem INF-gama. No camundongo WT crônico 1,8% espontaneamente e 28%

quando estimulado; (Figura 42). A alto grau de ativação espontânea medido pela expressão espontânea de CD69 se correlaciona com a expressão espontânea de INF-gama indicando que estas células estão prontas e algumas já estariam exercendo a sua função efetora, fato que se vê reforçado na estimulação com anti CD3-CD28 onde se observa uma produção perto do dobro em números porcentuais quando comparados com o baço do camundongo controle WT, mais também chama a atenção que as células do baço do camundongo imune deficiente produzem muito pouco INF-gama quando comparado ao baço do camundongo WT, alem de isso numa analise mais detalhada (linha vermelha) podemos observar que as celulas com maior expressão de CD8(CD8^{high}), são as que demonstram maior secreção de INF-gamma.

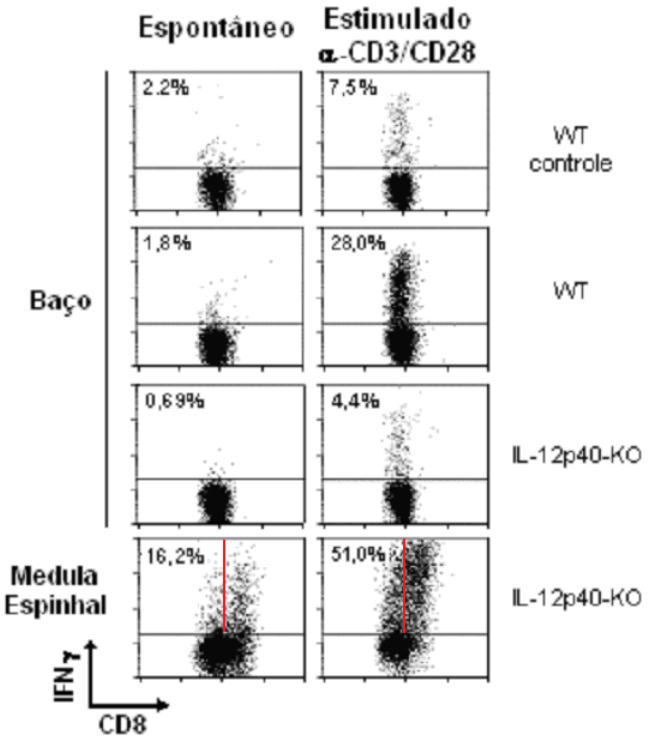

Figura 42- Freqüência de linfócitos CD8^{+} produtores de INF-gama no baço do camundongo WT infectado e na medula espinhal e baço do camundongo IL-12p40-KO infectado. As células infiltrantes de medula espinhal e do baço obtidos no 55 p.i. de camundongos IL-12p40-KO infectado e seus respectivos controles foram determinadas a produção de INF-gama por marcação intracelular em células que foram estimuladas com Anti-CD3-Anti CD28 ou de forma espontânea.

5 DISCUSSÃO

Na fase crônica da infecção com trypanosoma cruzi nos é possível observar o aumento dos linfócitos TCD8 do baço de camundongos na fase crônica, fato que se evidencia melhor ao estabelecer a relação de linfócitos TCD4;TCD8 onde observamos que e de 1,77 na fase aguda, passa para 0,74 na fase crônica, sendo evidente o aumento dos linfócitos T CD8. Este fenômeno tinha sido descrito anteriormente e incluso foi relatada uma correlação direta entre os níveis de parasitemia residual e o número de linfócitos T CD8 no baço de camundongos infetados com T. cruzi (MARINHO et al., 1999; OLIVIERI et al., 2002), A expansão de linfócitos TCD8 também acontece no compartimento sanguíneo e em linfócitos infiltrantes no fígado, não e transitoria pois se observa ate 300dias após infecção em níveis variáveis (GRISSOTO, 2002; SARDINHA, 2004). O aumento seletivo dos linfócitos TCD8 na fase crônica poderia ser a uma maior ou persistente apresentação de antígeno do T. cruzi no contexto de moléculas de classe I do MHC. Assim, experimentos in vitro demonstraram que a capacidade de apresentação de antígeno de T. cruzi em moléculas MHC classe II está prejudicada (PLASMAN et al., 1995), fato que não ocontece em relação a moléculas MHC da classe I (BUCKNER et al., 1997).

Alem de isso fatores independentes da sinalização via MHC-TCR podem contribuir para a expansão e-ou mantenimento do compartimento CD8+ elevado durante a infecção crônica. Assim, foi descrito (ZHANG et al., 1998) que a presença de IFN-a (que inibe a proliferação celular in vitro) pode promover a expansão de células CD8+ com fenótipo de memória (CD44+) numa via independente do TCR. Este trabalho sugere que esta estimulação se dê de maneira indireta, através da produção de citocinas como a IL- 15. Por outro lado, LOPES et al. (1995) mostraram na infecção chagásica murina que as células CD8+ são mais

resistentes à AICD (morte celular induzida por ativação) que as células CD4+. Alem de isso tem se demostrado que em corações de camundongo infetados com trypanosoma cruzi e detectada a geração de IL7 e IL15 que poderiam explicar o mantenimento destas células em numeros elevados neste tecido (CUNHA NETO, 2007).

Na analise dos linfócitos TCD8+ durante a fase crônica inicial, podemos observar que uma porcentagem tem uma baixa expressão da molécula coreceptora CD8 (cerca de 50%).A baixa expressão da molécula CD8 já havia sido descrita por Lopes et al. (1995) na infecção de camundongos BALB/c por tripomastigotas metacíclicos derivados de triatomídeos ou induzidos quimicamente. Além da molécula correceptora CD8, verificamos também que estas células CD8+ apresentaram uma baixa expressão de moléculas CD3, TCRaβ e das isoformas da molécula CD45RC. Ao avaliarmos por a expressão simultânea de CD8 e CD45RC foi possível identificar duas subpopulações importantes de linfócitos TCD8+ no baço de camundongos crônicos: uma subpopulação com o fenótipo $CD8^{LOW}$CD45RA,RB,RC^{LOW}(CD8LL) que também é CD3LOWTCRaβLOW e uma outra subpopulação CD8+ que possui expressão normal (high) para os mesmos receptores e correceptores $CD8^{HIGH}$CD45RA,RB,RC^{HIGH}(CD8HH). Alem desta duas subpopulações e possivel identificar uma terceira subpopulaçõ que llega a ser ate um 9% dos linfócitos T CD8 no baço e muito menos no sangue que tem uma expressão normal de CD8 e baixa expressão de CD45RC $CD8^{HIGH}$CD45RA,RB,RC^{LOW}(CD8HL) A diminuição conjunta desta moléculas poderia ser devido a que estas moléculas poderiam fazer comigração conjunta na superfície celular como foi demostrado indiretamente nos linfócitos TCD4, que mostra que o TCR, o CD45 e CD4 fazem na superfície celular de células de memória comigração simultanea (DIANZANI et al., 1990). Neste modelo, não acontece este fenômeno nas células T CD4+ (dados não mostrados). Na infecção

por Tryapanosoma gera linfócitos TCD8 LL independentemente da cepa infectante Grissoto (2002) como acontece neste modelo na infecção com trypanosoma cruzi da cepa Y e o clone Silvio, tinha-se descrito que a baixa expressão CD8 acontece independente do parasita e linhagem de camundongo o que variava era o nivel de baixa expressão, neste caso o nível de geração de linfócitos TCD8LL foi semelhante. Alem de isso na infecção crônica pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), ocorre a regulação negativa das moléculas de TCR e CD8 por células T CD8+, específicas contra o vírus, devido ao aumento da carga viral decorrente da interrupção da terapia antiretroviral. (OXENIUS et al., 2001) sendo um dado indireto de que parasitemia residual poderia ser um fator a mais que participaria na expansão deste tipo celular. A existência desta heterogeneidade entre as células CD8+ pode refletir um estado funcional diferenciado bem como um potencial efetor distinto, motivo pelo qual nossas análises foram baseadas então nessas 3 subpopulações: $CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$, $CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$ e $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$.

Os linfócitos T CD8 com baixa expressão de CD8 e CD45RC (CD8LL) tem características de células antígeno experimentadas já que tem uma elevada expressão de CD44 alem de ter uma baixa expressão de CD62L indicandonos que não tem potencial de ingressar aos linfonodos por HEVs. Os linfócitos com alta expressão de CD8 e CD45RC (CD8 HH) têm uma expressão baixa de CD44 mais algumas células o expressam em quantidades consideravelmente elevadas, e tem uma expressão elevada de CD62L todas as características predominantemente de linfócitos T naive (GRISSOTO, 1999).

Num primeiro momento os linfócitos foram classificados como naive, memória e efetor, baseados na expressão de moléculas de superfície CD27 e CD45RA (HAMANN, 1997), os linfócitos de memória foram também chamados de células antígeno experimentadas, as células do nosso estudo tem estas

características, os linfócitos T CD8 LL são células de memória ou antígeno experimentadas e os linfócitos T CD8HH são naive. Federica Sallusto propus uma classificação inicial em linfócitos de memória central e de memória efetora distinguíveis pela expressão de CCR7 e CD45RA provendo um importante avance na dinâmica e compartimentalização dos linfócitos T (SALLUSTO, 1999; GEGINAT et al., 2003; WHERRY et al., 2003) posteriormente foram identificados populações de linfócitos T CD8 especificas em diferentes modelos de infecções virais (APPAY, 2002), e finalmente com o desenvolvimento de citometria policromatica foi possível ampliar o estudo fenotipico e o entendimento das sub-populações de linfócitos T. A caracterização fenotipica esta mais definida em células humanas mais no modelo de camundongo tem uma diferenciação muito parecida.

Os marcadores mais comumente utilizados atualmente vão do rango de receptores envolvidos na ativação de células T (CD45RA, CD45RO), moléculas de co-estimulação (CD28, CD27), ou moléculas de regulação (PD-1), diferencias em moléculas implicadas no mantenimento homeostatico como citocinas (IL_2) ou receptores de citocinas (IL-7R) alem de algumas moléculas de adesão (CD62L, CD11a) ou receptores de quimiocinas (CCR7, CX3CR1). A expressão surpreendentemente amplia de um grande numero de moléculas marcadoras pode ser reflexo de uma grande hetereogenidade de sub tipos de linfócitos T já que a diferenciação e feita por combinação destes marcadores indicando que em muitas ocasiones se sobrepõem ou estão associados, mais ainda assim e possível identificar padrões.

Assim realizando uma análise mais detalhada pela expressão de CD62L que tem uma expressão um tanto heterogênea em primatas e humanos mais que e mais estável em camundongos, podemos evidenciar que no compartimento de células antígeno experimentadas ou de memória (CD8LL) e possível diferenciar que perto

de um 80% de células correspondem a linfócitos TCD8 de memória efetora, e aproximadamente um 20% a linfócitos de memória central, e nas células CD8HH mais do 90% são células naive, mais na avaliação complementar com CD127 dos linfócitos TCD8LL e possível também diferenciar cerca de um 60%de células efetoras de memória e o restante de memória central, mais não tem um limite de corte evidente alem do porcentagem de expressão diferente quando comparada a expressão de CD62L , esta diferencia pode indicar que 60% seriam realmente células de memória efetora e um 20 % corresponderia a uma população intermediaria , assim os linfócitos T CD8 LL tem um predomínio de linfócitos de memória efetora classicamente caracterizados pela expressão de CD62L e CD127 (60%), um 20 % dos linfócitos $CD62L^{LOW}$ tem uma expressão maior de CD127 podendo ser uma população intermediaria y um 20% são células naive. E também interessante fazer notar que em modelos virais com limpeza absoluta de antígeno tem uma tendência a ter um predomínio de linfócitos TCD8 de memória central, o predomínio de linfócitos de memória efetora e um indicador a mais que na infecção por *Trypanosoma cruzi* não tem um controle parasitário completo.

Nos linfócitos T que expressam PD1 um 80 % delas expressam PD-L1, assim o analise do PD-L1 nos da uma aproximação da expressão de PD-1. Ao avaliar a expressão de PD-L1 nos linfócitos T CD8 obtivemos expressões de PD-L1 baixas, mais foi possível evidenciar que os linfócitos TCD8HH têm uma menor expressão de ela sendo isto compatível com células naive, as outras sub-populaões a apresentam um uma maior intensidade, maior nos linfócitos TCD8HL que indica que tem um maior grau de diferenciação, mais ainda não e efetor totalmente diferenciado, ao tentar induzir um aumento da expressão do PD-L1 com a estimulação inespecifica com anti-CD3 observamos só um pequeno aumento com as doses mais altas o significado destes resultados requer maior estudo , mais e

possível inferir que estas células poderiam interagir com células do tecido periférico.

E importante também notar que os linfócitos TCD8 LL quase um 50 % de eles sobreregula marcadores de NK, o aumento destas moléculas foi identificado em linfócitos T CD8 que poderiam ser reguladores principalmente em modelos tumorais, a sua expressão indica que elas podem responder a antígenos de histocompatibilidade menores ou ainda a proteínas do choque térmico e de estresse. Avaliamos a expressão de NK 1,1 NKG2D e NKG2ACE, evidenciando-se o maior aumento do NKG2D que e sabidamente estimulador, mais um 50 % destas células expressam conjuntamente NKG2ACE, que tem maior avidez por NKG2A que e inibidor, assim só 20 % expressa só NKG2A e 30% só expressa NKG2D, o significado desta expressão de por si já surpreende mais ainda a hetereogenidade da expressão nestas sub-populações e de significado incerto.

Avaliamos a expressão de outras moléculas nos linfócitos TCD8LL entre elas CD5 e observamos que uma pequena porcentagem o sobre regula (20%), mais não aumenta a expressão de ICOS, B7,1 nem B7,2 e tivemos resultados contraditórios com a expressão de FAS (dados não mostrados). Todos estes dados nos indicam que o linfócito TCD8 LL pode ser regulado positiva ou negativamente y sua ativação poderia ser modulada ao reconhecer células de tecido periférico. E dependendo da interação destas moléculas resultaria a qualidade da resposta do linfócito TCD8.

Com el objetivo de avaliar e caracterizar a atividade funcional dos linfócitos TCD8, foi realizado no laboratório experimentos iniciais de desafio in vivo de camundongo crônico com T. cruzi vivo de cultura (ou antígeno de T. cruzi), este desafio determina mudanças intensas no numero total de linfócitos TCD8, às 24-48 horas após o desafio, tem uma diminuição do número de linfócitos T CD8+ sendo esta diminuição maior na subpopulação de linfócitos TCD8LL alem de

tambem acontecer no sangue, com um aumento relativo de linfócitos TCD8HH. (grissoto tese de doutorado) O estímulo com T. cruzi in vivo poderia sinalizar às células T CD8+ em forma específica, ou seja, através do seu TCR (as APCs captariam o T. cruzi ou complexos T. cruzi-anticorpo pela via endossómica e apresentariam os peptídeos deste, por "cross-priming", em moléculas MHC classe I), ou em forma inespecífica (o T. cruzi ou complexos T. cruzi-anticorpo sinalizariam as APCs, ou outra população celular, a produzir um mediador que estimularia não especificamente as CD8LL).

Para indagar em relação a esta última possibilidade, analisamos se a estimulação inespecífica in vivo com Poly-IC seria capaz de resultar em fenômeno parecido.

Assim observamos que a dinâmica do desafio inespecifico foi diferente, nos observarmos que o numero total de células TCD8 teve uma leve diminuição nas primeras 24h após o desafio, mas em relação às sub-populações teve uma diminuição importante nos linfócitos TCD8LL, mas volta a valores ainda levemente mais elevados nas 48h após o desafio, os linfócitos TCD8HL não se modificam e chama a atenção o aumento progressivo dos linfócitos TCD8HH, fenômeno parecido ao desafio com trypanosoma vivo, mais em muita menor intensidade. No sangue evidenciamos uma evidente diminuição de todas as sub-populações entre estas os linfócitos TCD8, nas sub-populações observamos uma diminuição dos linfócitos TCD8LL, mas que nas 48h após volta a valores ainda mais altos, as outras duas sub-populações permanecem em números baixos, assim notamos que o desafio inespecifico pode modular a cinetica de distribuição das sub-populações com uma tendência a diminuir o numero de linfócitos TCD8LL, este fenômeno e menos intenso que o desafio com trypanosoma vivo. Assim ao analisarmos detalhadamente a fase inicial após o desafio observamos que a diminuição do número de células CD8LL nas primeiras 24 horas pode estar ocorrendo por

diversos fatores, dentre os quais destacamos os quais achamos mais prováveis: 1) morte preferencial das células CD8LL por mecanismos de AICD; 2) migração das células $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ do baço e do sangue para outros órgãos; 3) mudança de fenótipo das células CD8LL para CD8HH .

Alem de isso outra questão importante é determinar se a regulação negativa das moléculas CD8, TCRαβ e CD3 por células CD8+ de animais crônicos promoveria um aumento no limiar de ativação ou um déficit funcional nas células CD8LL, já que o limiar de ativação e potencial efetor de células T parece ficar alterado pela diminuição do número de moléculas de TCR/célula (VIOLA E LANZAVECCHIA 1996). Assim avaliamos e comparamos as respostas das sub-populações de linfócitos TCD8 a diferentes estímulos in vitro com anticorpos anti-CD3 e anti CD3-CD28 como modelo de estimulação inespecifica. Esta abordagem pareceu-nos a mais adequada e factível de ser executada, apesar de não considerar a participação da molécula correceptora CD8 no processo de ativação linfocitária.

Primero observamos que após o estimulo com anti-CD3 o numero de células recuperadas diminui com o aumento de concentração do anticorpo, mas notamos que este efeito e menos intenso com as doses menores, A sub-população CD8LL e a que mais diminui, indicando-nos indiretamente que uma maior proporção destas células morre, os linfócitos TCD8HH tem o mesmo fenômeno mais de manera menos intensa, mais surpreendentemente os linfócitos TCD8HL tem uma aparente resistência a diminuir seu numero de células. O que se vê refletido pela diminuição porcentual de CD8LL com um aumento de CD8HH, e permanência estável de CD8HL permanece estável. Ao realizar a análise comparativa entre as subpopulações avaliando o estado de ativação pelo grau de expressão de CD69 observamos que a subpopulação CD8LL possui uma menor capacidade de ativação mediante estímulo com doses crescentes de anticorpos anti-CD3 comparada às

células CD8HL e CD8HH , os linfócitos TCD8HL apesar de ter níveis de CD69 iniciais elevados não se ativam completamente, a diferencia da sub-população TCD8HH que quase chega ao maximo, estes dados são de certa forma contraditórios, mas podem indicar que o nível de expressão de CD69 que precisam atingir para ativarse seja diferente nestas diferentes subpopulações (ou paradoxalmente que o limiar esteja diminuído). Alem de isso a subpopulação CD8LL possui um menor grau de apoptose quando comparado com a subpopulação TCD8HL no estimulo com anticorpos anti-CD3 ou anti-CD3 e anti-CD28, e importante hacer notar que estes dados estão em conflito com os dados de recuperação celular (acima descritos), nos quais mostramos que as células CD8HL constituem a população que menos sofre perda após estimulação com anti-CD3. Uma forma de conciliar estes resultados seria admitir que o número total de células CD8HL após tratamento com anti-CD3 poderia ser a resultante de dois processos opostos: morte celular de CD8HL por AICD e conversão para o fenótipo CD8HL a partir de células com outros fenótipos sendo a candidato mais provável os linfócitos TCD8LL, que diminuem em maior proporção por morte por AICD e provável mudança deste fenótipo (provavelmente para CD8HL). A provisão, junto ao anti-CD3, do estímulo co-estimulador (na forma de tratamento com anti-CD28) não se mostrou diferente da estimulação com só anti-CD3, não se evidenciando em forma clara qualquer efeito protetor do anti-CD28 adicional. Em conjunto, as observações destes experimentos sugerem que as células CD8LL possuem um limiar de ativação menor in vitro, sendo mais susceptíveis a AICD do que as células CD8HL sendo estes dados a favor da primeira possibilidade (morte por AICD).

Em relação à segunda possibilidade, ou seja, a migração de células CD8LL do baço e do sangue periférico para outros órgãos devemos considerar que, apesar do baço participar ativamente no processo remoção dos parasitas circulantes, o fígado e o pulmão são os órgãos preferencialmente envolvidos neste processo

(UMEKITA et al., 1999). Assim, a observação de que o número de células CD8LL diminui no baço e no sangue periférico do animal cronicamente infectado após 24 horas de desafio inespecifico com Poly-IC poderia indicar que, o estimulo inespecifico possa desencadear uma migração para estes órgãos atraídas por quimiocinas. A respeito da terceira possibilidade, que considera a mudança de fenótipo das subpopulações CD8+ esplênicas, o aumento do número de células CD8HH poderia ser explicado em parte pela mudança de fenótipo das células CD8LL. Assim, o aumento numérico da subpopulação CD8HH neste período poderia estar relacionado ao aumento de expressão das moléculas CD8 e CD45RC por células CD8LL que poderiam estar mudando para os fenótipos CD8HH ou CD8HL. Os dados da literatura demonstrando o aumento de expressão destes receptores e correceptores em células CD8+ são muito escasos, mais se tem uma evidência indireta que vem de trabalhos com células CD4+ de ratos onde foi observado a interconversão de células CD4+ CD45RBLOW para CD4+ CD45RBHIGH e vice versa (BELL e SPARSHOTT, 1990; SPARSHOTT et al., 1991) ainda que esta possibilidade seja mais lejana.. Mas em humanos tem se descrito após a estimulação in vitro na ausência de antígeno e na presença de citocinas a conversão de linfócitos TCD8CD45RA- para CD8+ CD45RA+ (TEM RA+) sendo este fenotipo aparentemente mais diferenciado (GEGINAT et al., 2003).

A estimulação *in vivo* com *Trypanosoma cruzi* de cultura desencadeia um estimulo intenso que causa grandes mudanças nas populações celulares do baço, a estimulação inespecifica com Poly-IC in vivo tem o mesmo comportamento ainda que em menor intensidade, e a estimulação in vitro com anti CD3 mostra um fenômeno parecido *in vitro*, mais não e ideal pelo alto grau de ligação deste anticorpo com o seu ligante, assim montamos um modelo experimental de desafio intrapleural com antígeno de *Trypanosoma cruzi*, que e mais fisiológico. Neste desafio ao avaliar as mudanças no baço nos observamos que o numero total de

células quase não se modifica e na analise das sub-populações CD8 observamos uma leve diminuição dos linfócitos TCD8 LL, com um leve aumento de linfócitos TCD8HH mostrando que o desafio ocasiona discretas mudanças no baço mais são parecidas aos desafios anteriores. No compartimento sanguíneo observamos uma gram diferencia , uma diminuição progressiva dos linfócitos TCD8HH com um aumento das outras duas sub-populações, fenômeno totalmente diferente aos desafios anteriores, alem de isso no compartimento da cavidade pleural observamos a migração especifica de linfócitos TCD8, isto mais evidente ao ver a relação CD4-CD8, A presença de células CD8+ em sítios inflamatórios como o peritônio e o coração pode ser mediado por quimiocinas. Neste sentido, Aliberti et al. (1999) verificaram um aumento na expressão de mRNA para MIP1a, RANTES, JE/MCP1 por macrófagos do exudato inflamatório peritonial infectados pelo T. cruzi. Ao avaliar as sub-populações no lavado pleural como era de esperar tem um predomínio de CD8HL e de CD8LL, ainda que surpreendentemente teve a migração de linfócitos TCD8HH, alem de isso evidencia-se que nas primeiras 24h após o desafio tem uma migração conjunta de PMN, e nas 48h após o desafio tem uma migração de macrófagos, este fenômeno evidencia que estes linfócitos têm sua capacidade migratória intacta para a cavidade pleural, neste modelo observamos uma migração normal ao lugar do desafio e não observamos uma diminuição intensa de linfócitos TCD8LL isto indica que o estimulo *in vitro* ou o desafio inespecifico não tem as características que necessitam para uma adequada ativação como aconteceria num modelo mais fisiológico, e que com estímulos inapropriados os linfócitos TCD8LL tem uma tendência a morrer provavelmente por AICD ainda que uma parte de eles possa mudar de fenótipo.

Ao analisar mais detalhadamente estes diferentes compartimentos (sangue, baço e cavidade pleural) observamos que tem uma distribuição fenotipica diferenciada, assim no baço predominam os linfócitos TCD8HH neste ponto chama

a atenção o numero menor de CD8LL mais poderia ser devido a que nestes camundongos foram de fases mais tardias da doença, no sangue predominam os linfócitos TCD8LL e no infiltrado pleural tem um maior numero de TCD8HL alem de LL, ao avaliar o estado de ativação os linfócitos no compartimento sanguíneo estão em reposo mas tem uma tendência a aumentar discretamente a expressão de CD69, os linfócitos da pleura tem basalmente níveis muito elevados de expressão de CD69,em todas as sub-populações perto de um 60% podendo indicar que se encontram num estado pre-ativado, fenômeno semelhante ainda que em menor intensidade foram descritos nos linfócitos residentes do intestino, mas o desafio ao contrario do que esperávamos diminui discretamente a expressão de CD69, este dado e intrigante mas o fato de ser apresentado como antígeno fragmentado o estimulo seja o suficientemente intenso para ocasionar uma migração seletiva mis não o suficiente como para poder fornecer o estimulo adequado para a ativação dos linfócitos TCD8, alem de isso e evidente que a dinâmica de expressão de CD69 e por lo tanto o estado de ativação muda com os compartimentos no espacio sanguineo que e o lugar para transporte e movilização dos linfócitos circulantes não estão ativados, de forma semelhante no tecido periférico neste caso representado pela cavidade pleural e evidente uma expressão basal maior de CD69, mais isso não que decir que estes linfócitos infiltrantes estejan funcionalmente normais. Apojando este argumento os tecidos a função de células T em níveis diferentes, visto que a resposta efetora de células T frente ao T. cruzi é maior no pulmão e no baço de animais cronicamente infectados do que no coração ou no músculo esquelético.(LEAVEY e TARLETON 2003). Alem de isso a dinâmica da migração e distribuição das sub-populações neste modelo nos da indícios de que na cavidade pleural poderia ter uma re-expressão de CD8 nos linfócitos CD8LL ou que tiver uma migração seletiva da subpopulação. TCD8HL já que no compartimento de transporte que e o sangue tem

um predomínio de linfócitos TCD8LL. Evidenciamos que os linfócitos TCD8LL não têm limitação para poder migrar aos tecido do desafio.

No desafio com células macrofagicas infetadas com trypanosoma cruzi observamos a migração seletiva de linfócitos TCD8 de manera semelhante ao desafio com antígeno de trypanosoma mais e possível evidenciar uma menor migração de PMN e uma migração seletiva de macrófagos grandes e pequenos, provavelmente estes macrófagos estão ou foram estimulados para se ativar, estes experimentos demonstram que o contexto de apresentação do antígeno pode mudar o perfil de migração celular na cavidade pleural e a intensidade dos linfócitos TCD8.

Nesta etapa dos experimentos podemos concluir que os linfócitos TCD8 com estímulos inespecificos muito intensos tem uma tendência a diminuir de numero por provável morte por AICD principalmente a subpopulação TCD8LL, mais sem descartar as outras duas alternativas, já num modelo de desafio mais fisiologico não evidenciamos uma queda tam dramática e incluso nos permite observar nos linfócitos TCD8 uma migração preferencial no lugar de desafio e incluso aconteça mudança de fenótipo, os linfócitos não aparentam estar anergicos.

Apesar de que estas observações preliminares que sugerem um papel protetor de células CD8+ algunos pesquisadores têm descrito que no coração e em outros órgãos os linfocitos T CD8+ isoladas de tecido muscular e coração de animais cronicamente infectados pelo T. cruzi apresentam um fenótipo compatível com células efetoras ou de memória, mas possuem uma capacidade limitada de citotoxicidade e uma menor produção de IFN-γ mediante estimulação in vitro com anticorpos anti-CD3 quando comparadas com células CD8+ do baço dos mesmos animais (LEAVEY e TARLETON, 2003). Assim abordaremos este punto mais adelante.

A geração dos linfócitos TCD8 e provavelmente a partir de linfocitos CD8HH é apoiada pela observação de que células CD8+ de camundongos diminuem a expressão de CD45RB quando ativadas in vitro (BIRKELAND et al., 1989). Uma das explicações possíveis para este fenômeno é que a estimulação do TCR por antígeno do parasita em moléculas MHC classe I acarreta uma internalização das moléculas de TCRαβ e CD8. Neste sentido, tem sido demonstrado *in vitro* que um grande número de moléculas TCR são internalizadas após o engajamento com moléculas de MHC carregadas com peptídeos (REINHERZ et al., 1982; VALITUTTI et al., 1995). Além disso, não podemos descartar que outros sinais além da interação TCR-MHC possam estar envolvidos na indução/manutenção da regulação negativa desses receptores e correceptores. Assim, alguns autores verificaram que o nível de expressão da molécula de TCR pode ser regulado por uma via independente da ligação desse receptor com o MHC (LAURITSEN et al., 1998). Assim na procura dos elementos envolvidos na geração dos linfócitos T CD8LL avaliamos vários elementos do sistema imune que poderiam participar na geração deste subtipo celular na infecção crônica por *Trypanosoma cruzi*. A grande maioria de trabalhos com *Trypanosoma cruzi* no modelo murino e feita com cepas de alta virulência que resulta numa fase aguda com parasitemia evidente e alta mortalidade, mais este modelo tem duas grandes limitações , primeira e que as cepas altamente virulentas não são representativas da apresentação dos quadros de infecção humana, a este respeito a infecção aguda em seres humanos na sua grande maioria só e detectada na fase crônica e muitas veces por exames de rotina que detectam títulos de anticorpos elevados já que tiveram uma fase aguda com mínima sintomatologia e segunda e que os estratos altamente virulentos não permitem definir com precisão os elementos imunes envolvidos no controle do *Trypanosoma cruzi*, para o fim de avaliar os elementos do sistema imune necessários para a geração de linfócitos T CD8 LL, nos realizamos experimentos

com a cepa de *Trypanosoma cruzi* Silvio clone X10-4, que sabidamente tem uma fase aguda que passa sem muita alteração, sem parasitemia evidente e com sobrevida de todos os camundongos infetados incluso com altas doses de infecção em camundongos imune competentes, mais que posteriormente desenvolvem a fase crônica da infecção, isto avaliado pelo titulo de anticorpos e em alguns modelos incluso podem desenvolver uma miocardite semelhante ao que acontece na infecção humana(MARINHO, 2002), alem de gerar o fenótipo de linfócitos T CD8LL que estamos estudando. Para isso infetamos camundongos deficientes em IL-12 INF-g CD4 CD8 nude CD28 iNOS IRF-1.

Um resultado inesperado neste modelo foi com o camundongo deficiente em CD28, que mostro um fenotipo de resistência relativa na infecção por Silvio, estes camundongos não mostraram parasitemia e todos sobreviveram ate o encerramento do estudo, estes resultados contrastam com resultados da infecção com trypanosoma cruzi com a cepa tulahuen (MUYAHIRA, 2003) e cepa Y (MARTINS, 2004) onde mostraram alta susceptibilidade, a diferencia do nosso modelo eles utilizaram cepas de alta virulência e os resultados com essas outras cepas foram interpretados como uma diminuição de produção de INFg pelos linfócitos T CD4 e CD8, déficit que só foi patente na fase inicial da infecção, mais no modelo com Silvio uma cepa de baixa virulência o nível de produção de citocinas parece ser o suficiente para controlar a fase aguda da infecção a pesar de ter na fase crônica uma deficiência na produção de imunoglobulinas. A geração de linfócitos TCD8LL foi semelhante ao controle indicando que na geração deste fenótipo a nível de estimulação na ausência desta molécula e o suficiente para desencadear uma diferenciação eficiente uma explicação alternativa poderia ser que os estímulos associados tais como o ambiente inflmatorio a ligação com CD40 e incluso a estimulação direta por TLR sea tão intensas que permitem adquirir este fenótipo, mais interesantemente em fases tardias se aprecia uma tendência

a diminuir de linfócitos TCD8LL, sendo um dado indireto que o CD28 poderia ser nessesario para o mantenimento deste fenótipo em fases mais tardias ou que eventualmente tengam um melhor controle parasitário gereando menos células CD8LL, a nessecidade periférica maior e uma possibilidade mais distante pelo fato que não se evidencia diferencia histológicas quando comparado ao WT.

Em relação ao CD4, todos os camundongos sobrevivem na fase aguda sem parasitemia, na fase crônica mostram um aumento de mortalidade, fato que indica-nos que os linfócitos TCD4 não são necessários no controle da fase aguda. A morte tardia dos camundongos infetados não foi devido a um bloqueio na ajuda aos linfócitos B, já que estes produziram IgG2a semelhante ao controle. Alem disso, os linfócitos TCD8LL foram gerados em números quase semelhantes ao WT, mas em fases posteriores se evidencia um menor número de linfócitos TCD8 que chegam até a metade do WT, indicando que os linfócitos CD4 não são indispensáveis para a geração de linfócitos TCD8LL mais que poderiam ser necessários para a sua manutenção.

Estudos *in vitro* demostram que o ON e uma molécula chave para a destruição de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos estimulados por INF-g e que pode ser inibida por inibição competitiva por N-monometil- L-arginina (inibidor competitivo da ON sintetasa). Neste modelo de infecção por *T. cruzi* da cepa Silvio, observa-se que o ON não é essencial para o controle parasitário, considerando a sobrevivência de todos os camundongos e ausência de parasitemia evidente na fase aguda e o baixo nível de patologia na análise histopatologica. Estes resultados não surpreendem, já que estudos prévios na infecção de trypanosoma cruzi em iNOS-KO mostram resultados conflitantes (MICHAILOWSKY, 2001; CUMMINGS, 2004; HOLSCHER, 1998) onde se encontra alta susceptibilidade a infecção, assim como resistência comparável a camundongos WT. Estes resultados

contraditórios devem ser pela diferença de cepa *T. cruzi* utilizada, assim como a eficiência relativa compensadora na ausência de ON no controle anti-*T. cruzi*. Desta forma, parece que o ON é mais importante durante a fase aguda da infecção, que é quando o organismo requer uma resposta do sistema imune inato de manera eficiente, que pode ser dispensável na fase crônica da doença (PETRAY, 1995). Além disso, a geração de linfócitos TCD8LL não esteve comprometida ao gerar células deste fenótipo em números semelhantes ao WT.

Na deficiência parcial de linfócitos TCD8 como acontece no IRF-1 observa-se que após o controle parasitário com benzonidazol os camundongos conseguem montar uma resposta efetiva adequada que permite ter uma sobreviva semelhante ao WT. Pode-se observar que o controle parasitário acontece por um aumento especifico de células antígenas experimentadas, entre estas, predominantemente, CD8HL e CD8LL, podendo indicar que apesar deste controle , ele é diferente ao do WT, tornando necessário novos experimentos para avaliar se a distribuição adotada das subpopulações é de caráter protetor ou de caráter progressivo, já que em outros modelos de infecções principalmente virais como HIV e HCV é possível diferenciar diferentes fenótipos com diferentes prognósticos. Do mesmo modo, ressalta-se que os linfócitos têm uma maior produção de INF-g, mas em números absolutos, têm o mesmo número de células produtoras de INF-g que o controle.

Em relação à deficiência de IL-12, mostra-se um comportamento parecido ao INF-g KO, mas de um modo mais brando. Isto acontece porque, em parte, as citocinas IL-12/23 não são essenciais para indução de INF-g, mas a deficiência de IL12/23 altera de forma negativa da resposta de linfócitos B na geração de IgG2a, que são as imunoglobulinas que garantem um controle dos parasitas no meio extracelular. A geração de linfócitos TCD8LL foi parcialmente comprometida, mas provavelmente a diminuição corresponda a um reflexo da

maior necessidade periférica de linfócitos TCD8. Por outro lado, a deficiência de IL12/23 se evidencia necessária para o controle do parasita a nível CNS, já que permite o desenvolvimento de um quadro neurológico.

A ausência de INF-gama compromete de forma importante o controle na fase aguda evidenciado por uma parasitemia patente mais lentamente progressiva, mas que chega a 100% de mortalidade na fase subaguda indicando que o INF-gama é um elemento crucial no controle da infecção por Silvio 10/4. Conclusões similares foram obtidas em trabalhos que utilizam a cepa Y (SARDINHA, 2006). O INF-gama está envolvido em vários aspectos do controle do *Trypanosoma cruzi*, entre estes, inclui um rol importante na ativação de macrófagos pela indução de mediadores antiparasitários como o ON e outras moléculas efetoras derivadas de macrófago, polarização de linfócitos TCD4, swich para IgG2a , produção de quimiocinas, aumento de TLR, etc. Entretanto, a morte dos camundongos de forma tardia indica que outros mecanismos imunológicos tentam segurar o processo infeccioso, mas são insuficientes na ausência do INF-gama. A geração de linfócitos TCD8LL se vê severamente comprometida devido ao fato de que seu número no baço está muito diminuído, indicando que esta molécula poderia ser necessária na diferenciação do fenótipo estudado, embora a possibilidade de uma maior necessidade periférica não pode ser descartada. Os camundongos INF-g quando tratados com benzonidazol no momento que apresentam parasitemia sobrevivem por mais tempo e tem um comportamento semelhante ao camundongo deficiente em IL-12 com desenvolvimento de um quadro neurológico.

Avaliando a ausência de linfócitos TCD4 e T CD8 na infecção murina por *T. cruzi* da cepa Silvio cepa 10/4 , no camundongo Nude a ausência de linfócitos T CD4 e CD8 tem um comprometimento ainda maior que o INF-g, identificado pelos níveis de parasitemia que foram maiores e rapidamente progressivos ainda maior que o INF-g e que levou a morte de todos os camundongos associada a um elevado

parasitismo tissular, especula-se que na ausência de linfócitos, além de ter uma sensível diminuição da produção de INF-g, não tem a geração de outros mediadores por parte dos linfócitos TCD4 que poderiam ajudar a controlar a fase aguda, como por exemplo, TNF. Desta forma, explica-se os efeitos drásticos, alem de ter que levar em conta que os camundongos Nude são de *background* BALB-C e que podem ter déficit adicionais, tais como um padrão de diferenciação basal de macrófagos M2 caracterizado por uma alta produção de TGF-b e uma inabilidade de produção de ON. (BASTOS, 2002) .

Em relação ao camundongo CD8-KO é mais difícil especular o controle parcial na ausência destas células, deficiencia que leva a uma diminuição da produção de INF-g, assim como a ausência de efeito citotóxico por parte destas células CD8. É importante frisar que há um aumento de susceptibilidade na ausência de granzima ou perforina na infecção por *Trypanosoma cruzi*, identificados por Kumar (1998) e Nickell (2000). Tarletom relata que os camumdongos morriam na fase aguda na ausência de TCD8, a sobrevida destes camundongos nosso modelo poderia ser explicado por que a infecção é por uma cepa menos virulenta, nesta infecção o nivel de ativação do sistema imune inato e a geração de citocinas inflamatórias embora em niveis deficientes, poderiam ser suficientes para o controle inicial da infecção, ainda que mais tardiamente poderia comprometer a sobrevida dos camundongos. Neste sentido, foi verificado que camundongos C57/B6 duplo knockout para granzimas A e B e para perforina apresentaram um grande aumento de parasitemia e mortalidade em comparação com camundongos selvagens infectados com *T. cruzi* da cepa Tulahuem (MÜLLER et al., 2003), indicando um papel importante da citotoxicidade no controle dos parasitas.

Relatos sobre a colonização do sistema nervoso central que acontece no camundongo deficiente em IL-12 na infecção por *Trypanosoma cruzi* da cepa

colombiana podem ser encontrados em MICHAILOWSKI (2001). Neste trabalho, o autor demonstra que a infecção por *Trypanosoma cruzi* da cepa Silvio 10/4 no camundongo IL-12-KO desenvolvem uma parasitemia tardia , e os sintomas neurológicos só aparecem quando há morte dos camundongos e evitada por tratamento com benzonidazol . Nosso modelo de infecção por Silvio 10/4 é interessante ressaltar que os camundongos deficientes em IL-12 desenvolvem o quadro neurológico sem tratamento e os camundongos INF-g quando tratados no início da parasitemia sobrevivem mais tempo e desenvolvem um quadro neurológico semelhante ao camundongo deficiente em IL-12. Nota-se que na fase aguda do INFg-KO quando este não é tratado, morre com uma intensa carga parasitaria na medula espinhal, mas não desenvolvem sintomas neurológicos. Apesar da intensa parasitemia da medula espinhal, esta dissociação nos evidencia que o dano neuronal ocasionado pelo processo inflamatório na medula é maior no IL-12 do que no INF-g, pois os neurônios são mais susceptíveis a morte por ON (ALMEIDA LEITE, 2006), e os camundongos IL-12 KO poderiam produzir mais INF-g e assim participar da geração de lessões no SNC em camundongos imunedeficientes infetados . O entendimento do processo imunológico em nível do SNC é de particular interesse pelas implicações do entendimento dos quadros de encefalites observados nos pacientes imune deprimidos por AIDS (SARTORI, 2002, ROCHA A DE MENESES, 1994)

Assim, este modelo de parasitismo da medula espinhal nos camundongos imunedeficientes em IL-12 e INFg nos permite avaliar *in vivo* a dinâmica da resposta imune avaliando *ex vivo* as células infiltrantes no processo inflamatório da medula espinhal. Estes experimentos nos permitiram compreender melhor o estado funcional dos linfócitos TCD8. Assim, avaliando o infiltrado celular na medula espinhal dos camundongos deficientes em INF-g e IL-12p40-KO infectados com *T cruzi* da cepa Sylvio X10/4 que desenvolvem o quadro

neurológico observa-se que, em ambos, acontece um processo inflamatório intenso com predomínio de células Mac1$^+$, e dentro destas as mais predominantes são os macrófagos (65% e 71%, respectivamente), seguido dos polimorfonucleares (PMN) (17,7% e 18,5%, respectivamente). Estes tipos celulares poderiam estar participando na lesão direta da medula espinhal mediante a geração de radicais livres e outros mediadores da resposta imune. A segunda população celular mais numerosa no infiltrado celular na medula espinhal foram os linfócitos T. A relação CD4/CD8 é de 1,3 no animal INFg-KO infetado e de 0,4 no animal IL12p40-KO. O significado da diferente relação CD4$^+$/CD8$^+$ no infiltrado da medula espinhal dos animais IFNg-KO e IL-12p40-KO infectados é desconhecido. Uma possível explicação poderia ser construída considerando que as células CD8$^+$ constituem a principal fonte de INFg na medula do camundongo IL-12p40-KO. Assim, na ausência desta citocina, as células CD4$^+$ tentariam uma compensação aumentando o seu número para produzir outras citocinas com atividade anti-*T. cruzi*, como o TNF-a. Comparando-se com as células infiltrantes recuperadas do músculo cardíaco ou do músculo esquelético onde foi observado um predomínio evidente de linfócitos e dentro destes os TCD8, além do número recuperado ser muito menor quando comparado por camundongo, nos indicaria que o processo inflamatório em estes órgãos é diferente e muito provavelmente, de uma menor intensidade.

Ao avaliar as subpopulações de linfócitos T CD8$^+$ isolados da medula espinhal dos camundongos IFNg-KO e IL-12p40-KO, que constituem em média 5,5% do total das células infiltrantes, a distribuição das sub-populações mostrou a presença de dois fenótipos estudados com um predomínio do fenótipo CD8HL, seguido do fenótipo CD8LL. Neste modelo podemos observar a migração *ex vivo* dos linfócitos TCD8 e suas subpopulações, evidenciando que a numero quase desprezível de CD8HH, é um dado que nos permite assegurar que são células naive e, portanto, não têm capacidade para migrar a tecidos periféricos

Além disso, este trabalho nos mostra in vivo um modelo com um processo inflamatório natural do SNC que a fenótipo do linfócito efetor terminalmente diferenciado e CD8HL é a diferença do que acontece em primatas e humanos, onde se observa uma reexpressão parcial do CD45RA. É possível evidenciar uma perda total da expressão do CD45RC podendo apreciar uma reexpressão da molécula coestimuladora CD8. Assim, pode-se deduzir que o predomínio de linfócitos TCD8 HL poderia ser devido à uma mudança de fenótipo dos linfócitos TCD8LL para o terminalmente diferenciado HL, sem descartar que poderia ter uma migração preferencial para o tecido de linfócitos TCD8HL, alem de isso, no baço encontra-se linfócitos HL até 9% no sangue tem um número menor.

Com base aos resultados obtidos considera-se que existe a possibilidade do último estágio de diferenciação do linfócito $CD8^+$ no tecido inflamado seja a re-expressão da molécula CD8 (e talvez também das moléculas CD3 e TCR) e a mudança para o fenótipo $CD8^{HIGH}CD8RC^{LOW}$. Por outro lado, as células com fenótipo $CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$ constituíram células antígeno-experimentadas do sangue e baço que estariam em um estado de diferenciação intermediária.

A atividade funcional dos linfócitos T $CD8^+$ que infiltram a medula do animal IL-12p40-KO é diferente daquela descrita para as células que infiltram o coração, e o músculo esquelético que para alguns autores se encontram em um estado não típico de anergia, mais também é diferente quando comparado com os linfócitos TCD8 do baço e do sangue. No modelo apresentado , os linfócitos TCD8 infiltrantes encontram-se num estado de maior ativação já que de forma espontânea tem elevados níveis de CD69. A expressão deste marcador é alta em todas as sub-populações de linfócitos $TCD8^+$, sendo maior na subpopulação CD8HL que chega a expressar 80%, e a subpopulação CD8LL 40% das células expressam CD69.

O fato de que os linfócitos T $CD8^+$ do camundongo deficiente em IL-12p40 e o camundongo deficiente em INF-g expressem quantidades elevadas de CD69, mostra que estas células estariam prontas, ate poderiam estar já mediando uma função efetora. Conciliando os resultados encontrados com aqueles de anergia acima citados, é provável que na medula do animal IL-12p40-KO infectado o ambiente inflamatório seja tão intenso que consiga reverter a sinalização negativa que leva ao estado disfuncional dos linfócitos T $CD8^+$. Alternativamente, pode ser que ainda seja cedo para a geração do fenótipo disfuncional.

Outra forma de avaliar o estado funcional é medindo a expressão de INF-gama, onde pode-se observar que os linfócitos T $CD8^+$ que infiltram a medula espinhal do camundongo IL-12p40-KO infectados produzem IFN-g não somente após estimulação *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 (51%), mas em forma espontânea (*ex vivo*) (16%). Estes resultados indicam que os linfócitos T $CD8^+$ que infiltram na medula dos animais IL-12p40-KO estão exercendo uma função efetora no tecido. A alto grau de ativação espontânea medido pela expressão espontânea de CD69 se correlaciona com a expressão espontânea de INF-gama, mais também chama a atenção que as células do baço do camundongo imune deficiente produzem muito pouco INF-gama quando comparado ao baço do camundongo WT (como se as células produtoras de INF-g tivessem diminuído de número). Além disso, numa análise mais detalhada, pode-se observar que as células com maior expressão de CD8 ($CD8^{high}$), são as que demonstram maior secreção de INF-gamma, evidenciando indiscutivelmente o padrão de diferenciação TC-1. O modelo apresentado avaliou in vivo a mudança tanto do fenótipo de células CD8LL quanto do fenótipo terminalmente diferenciado HL, bem como a evidência de que se o ambiente inflamatório é suficientemente intenso para poder ter uma função efetora normal.

Finalmente conclui-se abordando o fenômeno de diferenciação dos linfócitos TCD8 no modelo murino da Doença de Chagas de modo geral. Na fase aguda, provavelmente pela alta expressão antigênica e pela elevada carga parasitária, os linfócitos TCD8 diferenciam-se diretamente em linfócitos TCD8 efetores tendo uma continua expansão até iniciar o controle do processo parasitário. Neste momento, não e possível identificar a sub-população CD8LL no baço, mas na fase subaguda, considerada a partir do dia 20, até o inicio da fase crônica, considerada a partir do dia 60, tem o inicio do controle parasitário. Desta forma a diminuição da carga antigênica de forma progressiva permite um acúmulo progressivo de linfócitos TCD8LL e que no camundongo imune competente tem um predomínio de linfócitos de memória efetora que poderiam derivar da conversão direta de linfócitos TCD8HH ou dos linfócitos TCD8 efetores que ainda mantiveram algum grau de expressão de receptores de citocinas relacionadas a homeostasis (IL-7R, IL-15R). Sucessivamente, poderiam acumular-se progressivamente como linfócitos TCD8LL de memória efetora pois neste modelo não tem uma eliminação total do parasita e estes poderiam ter o estímulo necessário para que sejam geradas, ainda que em baixas quantidades. Os linfócitos CD8LL expressam variadas moléculas de superfície que podem ser moduladas perifericamente, tais como PD-1, receptores relacionados a NK e outros que podem modular de forma positiva ou negativa o grau de ativação destas células. Quando o ambiente inflamatório não é o suficientemente intenso como poderia ser no coração e músculo esquelético, os linfócitos infiltrantes (CD8LL ou CD8HL) poderiam ter sua capacidade de resposta modulada negativamente, e isto explicaria o porquê da maioria dos trabalhos encontrarem certo grau de disfunção destes linfócitos quando avaliados *ex vivo*. Mas quando o ambiente inflamatório é suficientemente intenso como no modelo apresentado, é possível observar uma ativação adequada cumprindo uma função efetora normal, indicando-nos que estes linfócitos

precisariam de um nível e qualidade de estimulação ideais para sua ativação, que só seria conseguido no tecido periférico infetado, pois os experimentos mostraram uma tendência à morte por AICD com estímulos inespecíficos ou inapropriados. Nota-se também que a diferenciação dos linfócitos T de memória efetora é linear ao dos linfócitos efetores.

6 CONCLUSÕES

- No Modelo Murino De Infecção Por *Trypanosoma Cruzi* Da Cepa Y ou Do Clone Silviox10/4 Se Evidencia Um Aumento De Linfócitos TCD8 No Baço No Inicio Da Fase Crônica.

- O aumento dos linfócitos TCD8 na fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi* se acompanha do aparecimento de uma sub-população que tem baixa expressão de CD8 e CD45RC. Na analise simultânea destas moléculas é possível diferenciar três sub-populações de células TCD8, uma que expressa níveis elevados de CD8 e CD45RC ($CD8^{HIGH}CD45RC^{HIGH}$, CD8HH) que tem características de células naive, outra que expressa níveis baixos de CD8 e CD45RC ($CD8^{LOW}CD45RC^{LOW}$, CD8LL) que são células antígeno experimentadas ou de memória, e uma terceira sub-população que expressa níveis elevados de CD8 e baixa expressão de CD45RC ($CD8^{HIGH}CD45RC^{LOW}$, CD8HL), presente no baço em números pequenos.

- Numa analise fenotípica mais detalhada das células TCD8 com CD62L e CD127, observamos que a sub-população de linfócitos TCD8HH corresponde na sua maioria a células naive, mas 10% das células apresentam um fenótipo provavelmente mais diferenciado. Em relação aos linfócitos TCD8LL, observamos que um 20% tem fenótipo de memória central (CM), 60% de memória efetora (EM), e 20% fenótipo intermediário.

- Os linfócitos TCD8LL expressam em maior quantidade PD-L1 e receptores da família NKG2, indicando que poderiam ter sua capacidade de ativação/efetora modulada nos tecidos periféricos.

- Nas primeiras 24h após desafio inespecífico com Poly-IC, evidenciamos uma diminuição da subpopulação CD8LL. Esta redução poderia ser devida a morte por AICD, migração para tecidos periféricos, ou mudança de fenótipo para CD8HL (e/ou pouco provavelmente para CD8HH).

- A estimulação *in vitro* da população CD8LL com anticorpos anti-CD3 resulta em intensa morte celular (ou diferenciação para outro fenótipo), evidenciado pelo menor número de células recuperadas e pela menor expressão de CD69. Já os linfócitos CD8HL a pesar de mostrarem maior expressão de anexina V, a estimulação *in vitro* por anti-CD3 não parece afetar a recuperação celular.

- Os linfócitos TCD8LL e CD8HL migram para a cavidade pleural no modelo de desafio intrapleural com antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Além disso, neste modelo se evidencia também uma migração inicial de PMN e mais tardiamente de células macrofágicas.

- As subpopulações de linfócitos TCD8 mostram diferente distribuição e estado de ativação dependendo do compartimento analisado. Assim, no sangue predominam os linfócitos TCD8LL e todas as subpopulações de linfócitos TCD8 têm baixa expressão de CD69. No baço há predomínio de linfócitos TCD8HH, mas a subpopulação CD8HL aparenta um estado de pré-ativação basal (40% das células expressam CD69). Já na cavidade pleural, se observa um maior grau de ativação de todas as sub-populações (por volta de 60% de expressão de CD69) e um predomínio de linfócitos T CD8HL e CD8LL.

- A apresentação antigênica num contexto diferente muda o perfil de migração de células à cavidade pleural no modelo de desafio intrapleural. Isto foi evidenciado no desafio com macrófagos infetados com *Trypanosoma cruzi*, modelo onde migram preferencialmente linfócitos TCD8.

- No modelo de infecção de camundongos deficientes de IL-12p40 ou INF por *T. cruzi* Sylvio X10/4, modelo onde há afetação da medula espinhal com desenvolvimento de um quadro neurológico, observamos que a resposta inflamatória local tem grande predomínio de macrófagos e PMN. Dentre os linfócitos TCD8, evidencia-se uma migração seletiva de linfócitos TCD8HL e em menor número de linfócitos TCD8LL, com ausência de linfócitos TCD8HH.

- Os linfócitos TCD8LL e TCD8HL que infiltram a medula espinhal dos animais descritos na conclusão anterior não se encontram em estado de anergia. Assim, uma fração significativa destas células produz espontaneamente INF a produção desta citocina aumentando sensivelmente após re-estimulação com anti-CD3.

- No animal IRF-1-KO infectado pelo *T. cruzi* e tratado com benzonidazol na fase aguda, observa-se uma diminuição marcada do número total de linfócitos TCD8 na fase crônica. No entanto, nestes animais há indução de linfócitos com fenótipos CD8HL e CD8LL e o número de linfócitos TCD8 produtores de INF está conservado. Contudo, no modelo de infecção de camundongos IRF-1-KO, células CD8LL são geradas, mas o fenótipo predominante é de linfócitos TCD8HL.

- A geração de células com fenótipo CD8LL no modelo de infecção por Sylvio X10/4 não depende de sinal coestimulatorio por CD28, ou da molécula iNOS, e independente de linfócitos TCD4, apesar de que estas últimas células poderiam participar na manutenção do fenótipo CD8LL em fases mais tardias da infecção. No animal IL-12p40-KO infectado se aprecia uma diminuição de linfócitos TCD8LL no baço, enquanto que no animal INF-KO infectado praticamente não há células CD8LL. Nestes dois últimos grupos de animais, podem não existir as condições necessárias para a geração das células CD8LL, ou acontecer uma maior migração das células CD8LL para os tecidos, em função de uma maior demanda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in Trypanosoma cruzi infection. **J. Immunol.,** v. 155, p. 3955-63, 1995.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10,Tnf, Ifn-Gamma, and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. **Exp. Parasitol**., v. 84, p. 231-44, 1996.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO M. A.; MARTINS G. A.; GAZZINELLI R. T., VIEIRA L. Q.; SILVA J. S. Interleukin-12 Mediates Resistance to Trypanosoma Cruzi in Mice and Is Produced by Murine Macrophages in Response to Live Trypomastigotes. **Infect. Immun.,** v. 64, p. 1961-7, 1996.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO F. S.; SOUTO J. T.; CAMPANELLI A. P.; TEIXEIRA M. M.; GAZZINELLI R. T.; SILVA J. S. Beta-Chemokines nhance Parasite Uptake and Promote Nitric Oxide-Dependent Microbiostatic Activity in Murine Inflammatory Macrophages Infected with Trypanosoma cruzi. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 4819-26, 1999.

ALVAREZ, J.M.; OSHIMA, A.; MOZER, V.;GUIMARAES, L.; MENEZES, H. Anemia in Trypanosoma cruzi chronically infected mice with the help of a cyclophosphamide amplification transfer assay. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 33, n.6, p. 509-14, 1991.

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. Early Ifn-Gamma Production Is Related to the Presence of Interleukin (IL)-18 and the Absence of Il-13 in Experimental Trypanosoma Cruzi Infections. **Immunol. Lett.,** v. 79, p. 189-96, 2001.

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

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referencias: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARBOSA DE OLIVEIRA, L. C.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; COLLET DE ARAUJO LIMA, G. M.; ABRAHAMSOHN, I. A. Antigen-Specific Il-4 and Il-10-Secreting Cd4+ Lymphocytes Increase in Vivo Susceptibility to Trypanosoma Cruzi Infection. **Cell. Immunol.,** v. 170, p. 41-53, 1996.

BELL, E.B.; SPARSHOTT, S.M. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo. **Nature,** v. 348, p. 163-6, 1990.

BIRKELAND, M. L., JOHNSON, P., TROWBRIDGE, I. S., PURE, E. Changes in Cd45 Isoform Expression Accompany Antigen-Induced Murine T-Cell Activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 86, p. 6734-8, 1989.

BRADLEY, L. M., DALTON, D. K., CROFT, M. A Direct Role for Ifn- Gamma in Regulation of Th1 Cell Development. **J. Immunol**., v. 157, p. 1350-8, 1996.

BRAWAND P.; BIASI G.; HORATH C.; CEROTTINI J.C.; MACDONALD H.R. Flow-microfluorometric monitoring of oligoclonal CD8+ T cell responses to an immunodominant Moloney leukemia virus-encoded epitope in vivo. **J. Immunol.,** v. 160, p. 1659-65, 1998.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Rev. Inst. Med. Trop.,** v. 4, p. 339-45, 1962.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1987. p. 6-10.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological Control of Trypanosoma Cruzi Infection and Pathogen esis of Chagas' Disease. **Int. Arch. Allergy. Immunol.** v. 114, p. 103-10, 1997.

BUCKNER, F. S.; WIPKEW, B. T.; VAN VOORHIS, C. Trypanosoma Cruzi Infection Does Not Impair Major Histocompatibility Complex Class I Presentation of Antigen to Cytotoxic T Lymphocytes. **Eur. J. Immunol**., v. 27, p. 2541-8, 1997.

CAI, Z.; KISHIMOTO, H.; BRUNMARK, A.; JACKSON, M. R.; PETERSON, P. A.; SPRENT, J. Requirements for Peptide-Induced T Cell Receptor Downregulation on Naive Cd8+ T Cells. **J. Exp. Med**., v. 185, p. 641-51, 1997.

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

CHAGAS, C Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, n. gen.n.sp., ajente etiolojico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 1, p. 159-218, 1909.

CHIU, B. C.; SHANG X. Z.; STOLBERG V. R.; KOMUNIECKIS E.; CHENSUE W. Population Analysis of Cd4+ T Cell Chemokine Receptor Transcript Expression During in Vivo Type-1 (Mycobacterial) and Type-2 (Schistosomal) Immune Responses. **J. Leukoc. Biol.,** v. 72, p. 363-72, 2002.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES B.; DE MESSIAS I.; STOLF N.; BELLOTI G.; PATARROYO M E.; PILLEGI F.; KALIL J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a 126 myosin-specific epitope cross-reactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 92, p. 3541-5, 1995.

CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R.E. Trypanosoma cruzi-induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to Tcell- dependent and -independent antigens. **J. Parasitol**., v. 66, p. 16-27, 1980.

DIANZANI, U.; LUQMAN, M.; ROJO, J.; YAGI, J.; BARON, J.L.; WOODS, A.; JANEWAY, C.A.JR.; BOTTOMLY, K. Molecular associations on the T cell surface correlate with immunological memory. **Eur. J. Immunol**., v. 20, p. 2249-57, 1990.

D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A.; KIPNIS, T.; EISEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. **Eur. J. Immunol**., v. 15, p. 201-3, 1985.

DOS SANTOS, P. V.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R. A.; MARINO, A. P.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. Prevalence of Cd8(+)Alpha Beta T Cells in Trypanosoma Cruzi- Elicited Myocarditis Is Associated with Acquisition of Cd62l(Low)Lfa- 1(High)Vla-4(High) Activation Phenotype and Expression of Ifn-Gamma- Inducible Adhesion and Chemoattractant Molecules. **Microbes Infect.,** v. 3, p. 971-84, 2001.

FERBER, I.; SCHÖNRICH, G.; SCHENKEL, J.; MELLOR, A.L.; HÄMMERLING, G.J.; ARNOLD, B. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. **Science,** v. 263, p. 674-6, 1994.

GAO, P., ZHOU, X. Y.; YASHIRO-OHTANI, Y.; YANG, Y. F.; SUGIMOTO, N.; ONO, S.,; NAKANISHI, T.; OBIKA, S.; IMANISHI, T.; EGAWA, T.; NAGASAWA, T.; FUJIWARA, T, HAMAOKA, H. The Unique Target Specificity of a 127 Nonpeptide Chemokine Receptor Antagonist: Selective Blockade of Two Th1 Chemokine Receptors Ccr5 and Cxcr3. **J. Leukoc. Biol.,** v. 73, p. 273-80, 2003.

GATELY, M. K.; DESAI, B. B.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; DWYER, C. M.; PODLASKI, F. J.; FAMILLETTI, P. C.; SINIGAGLIA, F.; CHIZONNITE, R.; GUBLER, U. Regulation of Human Lymphocyte Proliferation by a Heterodimeric Cytokine, Il-12 (Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor). **J. Immunol.**, v. 147, p. 874-82, 1991.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicial activity of interferon-γ treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxidemediated mechanism inhabitable by IL-10 and transforming growth factor- β. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2501-6, 1992.

GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Proliferation and Differentiation Potential of Human Cd8+ Memory T-Cell Subsets in Response to Antigen or Homeostatic Cytokines. **Blood.,** v.23, p. 123-30, 2003.

GERMANN, T.; MATTNER, F.; PARTENHEIMER, A.; SCHMITT, E.; RESKEKUNZ, A. B.; FISCHER, H. G.; RUDE, E. Different Accessory Function for Th1 Cells of Bone Marrow Derived Macrophages Cultured in Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor or Macrophage Colony Stimulating Factor. **Int. Immunol.,** v. 4, p. 755-64, 1992.

GRAY, J.D.; HIROKAWA, M.; OHTSUKA, K.; HORWITZ, D.A. Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. **J. Immunol.**, v. 160, p. 2248-54, 1998.

GRISOTTO, MARCOS **Expressão das isoformas da molécula CD45 pelos linfócitos esplênicos durante as fases aguda e crônica da Doença de Chagas**

experimental. Dissertação (Mestrado) - Programa de Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GRISOTTO, M. G.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; MARINHO, C. R.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A.; ALVAREZ, J. M. Most Parasite-Specific Cd8+ Cells in Trypanosoma Cruzi-Infected Chronic Mice Are Down- Regulated for T-Cell Receptor-Alphabeta and Cd8 Molecules. **Immunology,** v. 102, p. 209-217, 2001.

HENRIQUES-PONS, A.; OLIVEIRA, G. M.; PAIVA, M. M.; CORREA, A. F.; BATISTA, M. M.; BISAGGIO, R. C.; LIU, C. C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; COUTINHO, C. M.; PERSECHINI, P. M.; ARAUJO-JORGE, T. C. Evidence for a Perforin-Mediated Mechanism Controlling Cardiac Inflammation in Trypanosoma Cruzi Infection. **Int. J. Exp. Pathol**., v. 83, p. 67-79, 2002.

HIGUCHI, M.L.; SAMPAIO, G.P.; DEMARCHI, A.V.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: Comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.,** v. 423, p. 157-60, 1993.

HIGUCHI, M.L.; REIS, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 56, p. 485-9, 1997.

HOFT, D.F.; LYNCH, R.G.; KIRCHHOFF, L.V. Kinetic analysis of antigenspecific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with Trypanosoma cruzi. **J. Immunol.,** v. 151, p. 7038-47, 1993.

HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-Mediated Resistance to Trypanosoma Cruzi Is Dependent on Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon. **Infect. Immun.,** v. 64, p. 2381-6, 1996.

JACOBS, F.; CARLIER, C.; GOLDMAN, M. Administration of anti-CD3 monoclonal antibody during experimental Chagas' disease induces CD8+ celldependent lethal shock. **Clin. Exp. Immunol**., v. 103, p. 233-8, 1996.

JAMES, S.L.; KIPINS, T.L.; SHER, A.; HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon induce. **Infect. Immunity.,** v. 35, p. 588-93, 1982.

KIM, C. H.; KUNKEL E. J.; BOISVERT J.; JOHNSTON B.; CAMPBELL J. J.; GENOVESE M. C.; GREENBERGE H. B.; BUTCHER E. C. Bonzo/Cxcr6 Expression Defines Type 1-Polarized T-Cell Subsets with Extralymphoid Tissue Homing Potential. **J. Clin. Invest.,** v. 107, p. 595-601, 2001.

KUMAR, S.; TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi. **Parasite Immunol.,** v. 20, p. 207-16, 1998.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 but Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal Trypanosoma Cruzi Infection in Mice. **J. Immunol.,** v. 166, p. 4596-4603, 2001.

KURSAR, M.; BONHAGEN, K.; FENSTERLE, J.; KOHLER, A.; HURWITZ, R.; KAMRADT, T.; KAUFMANN, S.H.; MITTRUCKER, H.W. Regulatory 130 CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. **J. Exp. Med.,** v. 196, p. 1585-92, 2002.

LAURITSEN, J.P.H.; CHRISTENSEN, M.D.; DIETRICH, J.; KASTRUP, J.; ODUM, N.; GEISLER, C. Two distinct pathways exist for down-regulation of TCR. **J. Immunol.,** v. 161, p. 260-7, 1998.

LEAVEY, J. K.; TARLETON, R. L. Cutting Edge: Dysfunctional Cd8(+) T Cells Reside in Nonlymphoid Tissues During Chronic Trypanosoma Cruzi Infection. **J. Immunol.,**v. 170, p. 2264-8, 2003.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas Heart Disease. **Int. J. Parasitol.,** v. 31, p. 555-61, 2001.

LIMA, E. C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M. H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P. Evidence for a Protective Role of Tumor Necrosis Factor in the Acute Phase of Trypanosoma Cruzi Infection in Mice. **Infect. Immun.,** v. 65, p. 457-465, 1997.

LIMA, M. F.; ZHANG Y.; VILLALTA F. Beta-Chemokines That Inhibit Hiv-1 Infection of Human Macrophages Stimulate Uptake and Promote Destruction of

Trypanosoma Cruzi by Human Macrophages. **Cell. Mol. Biol.,** v. 43, p. 1067-76, 1997.

LOPES, M. F.; CUNHA, J. M.; BEZERRA, F. L.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E.; LAPA E SILVA, J. R.; GARCIA, E. S.; DOS REIS, G. A. Trypanosoma Cruzi: Both Chemically Induced and Triatomine-Derived Metacyclic Trypomastigotes Cause the Same Immunological Disturbances in the Infected Mammalian Host. **Exp. Parasitol.,** v. 80, p. 194-204, 1995.

LOPES, M.F.; DA VEIGA, V.F.; SANTOS, A.R.; FONSECA, M.E.; DOS REIS, G.A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J. Immunol.,** v. 154, p. 744-52, 1995.

LUSTER, A. D. Chemokines - Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **N. Engl. J. Med.,** v. 338, p. 436-45, 1998.

LUSTER, A. D. The Role of Chemokines in Linking Innate and Adaptive Immunity. **Curr. Opin. Immunol.,** v. 14, p. 129-35, 2002.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. Trypanosoma Cruzi-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. **Circulation,** v. 102, p. 3003-8, 2000.

MANNON, R., KOLZIN, B.L., NATARAJ, C., FERRI, K., ROPER, E., KURLANDER, R.J., COFFMAN, T.M. Downregulation of T cell receptor expression by CD8+ lymphocytes in kidney allografts. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 2517-27, 1998.

MARINHO, C.R.F.; D'IMPÉRIO, LIMA; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.,** v.67, p. 308-18, 1999.

MILEI, J.; STORINO, R.; FERNANDEZ ALONSO, G., BEIGELMAN, R.; VANZULLI; S.FERRANS, V. J. Endomyocardial Biopsies in Chronic Chagasic Cardiomyopathy. Immunohistochemical and Ultrastructural Findings. **Cardiology,** v. 80, p. 424-37, 1992.

MILLER, M. J.; WRIGHTSMAN, R. A.; MANNING, J. E. Trypanosoma Cruzi: Protective Immunity in Mice Immunized with Paraflagellar Rod Proteins Is

Associated with a T-Helper Type 1 Response. **Exp. Parasitol.,** v. 84, p. 156-167, 1996.

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of 132 parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. Rev.,** v. 112, p. 183-207, 1989.

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

MULLER, U., SOBEK, V., BALKOW, S., HOLSCHER, C., MULLBACHER, A., MUSETEANU, C.; MOSSMANN, H.; SIMON, M. M. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of Trypanosoma cruzi from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. **Eur. J. Immunol.,** v. 33, p. 70-8, 2003.

MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.,** v. 22, p. 301-7, 1992.

MURAKAMI, M.; SAKAMOTO, A.; BENDER, J.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. Cd25+Cd4+ T Cells Contribute to the Control of Memory Cd8+ T Cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 8832-7, 2002.

NAGATA, S., GOLSTEIN, P. The Fas Death Factor. **Science**, v. 267, p. 1449-56, 2002.

NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A.; ARÉVALO, C. Isolation from Trypanosoma cruzi-infected mice of CD8+ MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.,** v. 150, p. 1446-57, 1993.

NISHIMURA, M.; UMEHARA, H.; NAKAYAMA, T.; YONEDA, O.; HIESHIMA, K., KAKIZAKI, M.; DOHMAE, N.; YOSHIET O. IMAI. Dual Functions of Fractalkine/Cx3c Ligand 1 in Trafficking of Perforin+/Granzyme B+ 133 Cytotoxic Effector Lymphocytes That Are Defined by Cx3cr1 Expression. **J. Immunol.,** v. 168, p. 6173-80, 2002.

OLIVIERI, B. P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAUJO-JORGE, T. Benznidazole Treatment Following Acute Trypanosoma Cruzi Infection Triggers Cd8(+) T-Cell Expansion and Promotes Resistance to Reinfection. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 46, p. 3790-6, 2002.

OXENIUS, A.; GUNTHARD, H.F.; HIRSCHEL, B.; FIDLER, S.; WEBER, J.N.; EASTERBROOK, P.J.; BELL, J.I.; PHILLIPS, R.E.; PRICE, D.A. ; Direct ex vivo analysis reveals distinct phenotypic patterns of HIV-specific CD8(+) T lymphocyte activation in response to therapeutic manipulation of virus load. **Eur. J. Immunol.,** v. 31, p. 1115-21, 2001.

OZOREN, N.W.; EL-DEIRY S. Cell Surface Death Receptor Signaling in Normal and Cancer Cells. **Semin. Cancer Biol.,** v. 13, p. 135-147, 2003.

PLASMAN, N.; GUILLET J. G.; VRAY, B. Impaired Protein Catabolism in Trypanosoma Cruzi-Infected Macrophages: Possible Involvement in Antigen Presentation. **Immunology,** v. 86, p. 636-45, 1995.

PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to Trypanosoma cruzi: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann. Inst. Pasteur Immunol**., v. 138, p. 397-415, 1987.

PROUDFOOT, A. E. Chemokine Receptors: Multifaceted Therapeutic Targets. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 2, p. 106-15, 2002.

REED, S.G.; ROTERS, S.B.; GOIDL, E.A. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic Trypanosoma cruzi infection in mice. **J. Immunol.,** v.131, p. 1978-82, 1983.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K.; H.MORRISSEY, P. J. Il-10 Mediates Susceptibility to Trypanosoma cruzi Infection. **J. Immunol.,** v. 153, p. 3135-40, 1994.

REINHERZ, E.L.; MEUER, S.; FITZGERALD, K.A.; HUSSEY, R.E.; LEVINE, H.; SCHLOSSMAN, S.F. Antigen recognition by human T lymphocytesis linked to surface expression of the T3 molecular complex. **Cell,** v. 30, p. 735-43, 1982.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S., JR.; LOPES, E. R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.; G.MCCURLEY, T. L. Characterization of Inflammatory Infiltrates in

Chronic Chagasic Myocardial Lesions: Presence of Tumor Necrosis Factor-Alpha+ Cells and Dominance of Granzyme A+, CD8+ Lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 637-44, 1993.

REIS, M. M.; HIGUCHI M. L.; BENVENUTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in Situ Quantitative Immunohistochemical Study of Cytokines and Il-2r+ in Chronic Human Chagasic Myocarditis: Correlation with the Presence of Myocardial Trypanosoma Cruzi Antigens. **Clin. Immunol. Immunopathol.,** v. 83, p. 165-172, 1997.

REY, L. **Parasitologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991.

ROCHA, B; VON BOEHMER, H. Peripheral selection of the T cell repertoire. **Science,** v. 251, p. 1225-8, 1991.

RODRIGUES, M. M.; RIBEIRAO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.; RENIA, L.; COSTA, F. Predominance of Cd4 Th1 and Cd8 Tc1 Cells Revealed by Characterization of the Cellular Immune Response Generated by 135 Immunization with a DNA Vaccine Containing a Trypanosoma Cruzi Gene. **Infect. Immun.,** v. 67, p. 3855-63, 1999.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood,** v. 90, p. 909-28,1997.

ROTTENBERG, M.A.; RIARTE A.; SPORRONG L. ALTCHECH J.; PETRAY P.; RUIZ A.; WIGZELL H.; ÖRN A. Outcome of infection with different strains of T. cruzi in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol. Lett.,** v. 45, p. 53-60, 1995.

ROWLAND, E.C.; KUHN, R.E. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections. **Infect. Immun.,** v. 20, p. 393-7, 1978.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. Parasitic Load Increases and Myocardial Inflammation Decreases in Trypanosoma Cruzi-Infected Mice after Inactivation of Helper T Cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.,** v. 139, p. 225-236, 1988.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M.C.; MINOPRIO, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. The influence of T cell subsets on Trypanosoma cruzi multiplication in different organs. **Immunol. Lett.,** v. 49, p. 163-8, 1996.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.LANZAVECCHIA, A. Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions. **Nature,** v. 401, p. 708-12, 1999.

SATO, M.N.; YAMASHIRO, K.E.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M.L.; DUARTE, A.J. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among 136 spleen, blood and heart lymphocytes during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in rats. **Infect. Immun**., v. 60, p. 1024-1030, 1992.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of Lymphokine-Producing Phenotype by Cd4+ T Cells. **Annu. Rev. Immunol**., v. 12, p. 635-73, 1994.

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

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOLLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. Interleukin 10 and interferon-γ regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. **J. Exp. Med.,** v. 175, p. 169-74, 1992.

SPARSHOTT, S.M.; BELL, E.B.; SARAWAR, S.R. CD45R CD4 T cell subset-reconstituted nude rats: subset-dependent survival of recipients and bi-directional isoform switching. **Eur. J. Immunol.,** v. 21, p. 993-1000, 1991.

STERIN-BORDA, L.; PEREZ-LEIROS, C.; WALD, M.; CREMASCHI, G.; BORDA,E. Antibodies to beta 1 and beta 2 adrenoreceptors in Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol**., v. 74, p. 349-54, 1988.

SUN, J.; TARLETON, R.L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute Trypanosoma cruzi infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 48, p. 161-9, 1993.

TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. 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. **Immunol. Lett.,** v. 77, p. 31-8, 2001.

TAKEHARA, H. A.; DA SILVA, A. M.; BRODSKYN, C. I., MOTA, I. A. Comparative Study of Anti-Trypanosoma Cruzi Serum Obtained in Acute and Chronic Phase of Infection in Mice. **Immunol. Lett.,** v. 23, p. 81-5, 1989.

TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The Possible Mechanism of Action of IgG Antibodies and Platelets Protecting against Trypanosoma Cruzi Infection. **Braz. J. Med. Bio.l Res.,** v. 24, p. 759-65, 1991.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. **J. Immunol.**, v. 144, p. 717-24, 1990.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. **Nature,** v. 356, p. 338-40, 1992.

TARLETON, R. L; ZHANG, L. Chagas Disease Etiology: Autoimmunity for Parasite Persistence?. **Parasitol. Today,** v. 15, p. 94-99, 1999.

TARLETON, R. L. Parasite Persistence in the Aetiology of Chagas Disease. **Int. J. Parasitol.,** v. 31, p. 550-4, 2001.

TERNYNCK, T.; BLEUX, C.; GREGOIRE, J.; AVRAMEAS, S.; KANELLOPOULOSLANGEVIN,C. Comparison between autoantibodies arising duringTrypanosoma cruzi infection in mice and natural autoantibodies. **J. Immunol.,** v. 144, p. 1504-11, 1990.

TOWBIN, H.; ROSENFELDER, G.; WIESLANDER, J.; AVILA, J.L.; ROJAS, M.;SZARFMAN, A.; ESSER, K.; NOWACK, H.; TIMPL, R. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous138 leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl (alpha 1- 3) - galactose epitopes. **J. Exp. Med.,** v. 166, p. 419-32, 1987.

UMEKITA, L. F.; CARNEIRO, S. M.; SESSO, A.; MOTA, I. One Fate of Bloodstream Trypomastigote Forms of Trypanosoma Cruzi after Immune Clearance: An Ultrastructural Study. **J. Parasitol.,** v. 85, p. 867-72, 1999.

VALITUTTI, S.; MÜLLER, S.; CELLA, M.; PADOVAN, E.; LANZAVECCHIA, A. Serial triggering of many T cell receptors by a few peptide-MHC complexes. **Nature,** v. 375, p. 145-51, 1995.

VALITUTTI, S.; MÜLLER, S.; DESSING, M.; LANZAVECCHIA, A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. **J. Exp. Med.,** v. 183, p. 1917-21, 1996.

VAN PARIJS, L.; BIUCKIANS, A.; ABBAS, A. K. Functional Roles of Fas and Bcl-2-Regulated Apoptosis of T Lymphocytes. **J. Immunol.,** v. 160, p. 2065-71, 1998.

VILLALTA, F.; ZHANG Y.; BIBB K. E.; KAPPESM J. C.; LIMA F. The Cysteine-Cysteine Family of Chemokines Rantes, Mip-1alpha, and Mip-1beta Induce Trypanocidal Activity in Human Macrophages Via Nitric Oxide. **Infect. Immun.,** v. 66, p. 4690-5, 1998.

VIOLA, A.; LANZAVECCHIA, A. T Cell Activation Determined by T Cell Receptor Number and Tunable Thresholds. **Science,** v. 273, p. 104-6, 1996.

VIOLA, A.; SALIO, M.; TUOSTO, L.; LINKERT, S.; ACUTO, O.; LANZAVECCHIA, A. Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. **J. Exp. Med.,** v. 186, p. 1775-9, 1997.

WALKER, P.R.; OHTEKI, T.; LOPEZ, J.A.; MACDONALD, H.R.; MARYANSKI, J.L. Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at 139 different stages of an in vivo immune response. **J. Immunol.,** v. 155, p. 3443- 52, 1995.

WENINGER, W.;CROWLEY, M. A.; MANJUNATH, N.; VON ANDRIAN, U. H. Migratory Properties of Naive, Effector, and Memory Cd8(+) T Cells. **J. Exp. Med.,** v. 194, p. 953-66, 2001.

WHERRY, E. J.; TEICHGRABER, V.; BECKER, T. C.; MASOPUST, D.; KAECH, S. M.; ANTIA, R.; VON ANDRIAN, U. H.; AHMED, R. Lineage Relationship and Protective Immunity of Memory Cd8 T Cell Subsets. **Nat. Immunol.,** v. 4,p. 225-34, 2003.

WIZEL, B.; NUNES, M.; TARLETON, R.L. Identification of Trypanosoma cruzi trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ Tcl responses. **J. Immunol.,** v. 159, p. 6120-8, 1997.

WIZEL, B.; PALMIERI, M.; MENDOZA, C.; ARANA, B.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; TARLETON, R. Human Infection with Trypanosoma Cruzi Induces Parasite

Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses. **J. Clin. Invest.,** v. 102, p. 1062-71, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. Falta Local: WHO, 2000. v. 75, p. 9-16.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur. J. Immunol**., v. 26, p. 102-9, 1996.

ZHANG, X.; SUN, S.; HWANG, I.; TOUGH, D. F.; SPRENT, J. Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype Cd8+ T Cells in Vivo by Il-15. **Immunity**, v. 8, p. 591-9, 1998.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo