

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS POR FORMAS
TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS OU SANGUÍNEAS DO
*TRYPANOSOMA CRUZI***

PAULA MELO DE ABREU VIEIRA

OURO PRETO – 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULA MELO DE ABREU VIEIRA

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS POR FORMAS
TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS OU SANGUÍNEAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Prof^a Cláudia Martins Carneiro

Dedico este trabalho aos meus pais, José Eduardo e Laura, e ao meu noivo Bruno, que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Agradeço por sonharem comigo os meus sonhos e por me concederem o amor e os ensinamentos que foram necessários para que eu os realizasse.

A elaboração e conclusão deste trabalho não seriam possíveis se não fossem as pessoas que em algum momento surgiram em meu caminho e colaboraram de alguma maneira. Pessoas essas que me ensinaram muito. Aprendi que de todas as situações sempre se é possível obter resultados positivos. Agradeço a Deus por ter me presenteado sempre com pessoas especiais...

À Professora Cláudia Martins Carneiro por ter me recebido em seu laboratório e transformado uma bióloga recém formada em uma pesquisadora. Foi graças a sua paciência, empenho e dedicação que nós chegamos aqui! O meu agradecimento por toda a confiança depositada em mim, pelas conversas, pelo exemplo de ética e profissionalismo. Serei sempre uma eterna admiradora.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre (...)”.

Ao Professor Evandro Marques Menezes pelo auxílio na obtenção das formas metacíclicas e por todo o apoio ao longo da execução desta tese.

À minha amiga-irmã “Mandinha” por ter compartilhado não só as aflições, mas as pequenas alegrias do dia-a-dia, por ter escutado as minhas lamurias e me apoiado sempre. Obrigada por todo o apoio e compreensão minha amiga!

À Jú e Nádinha pela valiosa amizade e constante carinho. Obrigada pelo apoio e por sempre estar por perto compartilhar momentos de tristezas e grandes alegrias, com muitas gargalhadas.

À Carol e Kátia não só pela imensa ajuda na execução desse trabalho, mas também pela amizade sincera e pelo carinho. O incentivo de vocês foi essencial!

À Luísa, Flávia e Thaís, pois esse trabalho não seria possível sem a participação de vocês. Sempre prontas para trabalhar e me ajudar. Sinto-me honrada por ter colaborado com a formação científica de vocês.

Ao Professor Alexandre Barbosa Reis pela colaboração, pelas críticas e sugestões tão importantes.

Aos professores Rodolfo Giunchetti e Sandra Moura por estarem sempre acessíveis para tirar minhas dúvidas.

À todos os colegas do Laboratório de Imunopatologia: Lucilene, Caroline, Caio, Rodrigo, Kelvinson, Micheline, Gleiciane, Henrique, Samuel, Sheler, Wendel, Lígia, Liliane, Fernando, Larissa, Jamile e Levi pela ótima convivência e colaboração em todos os momentos.

À Maria Chaves pelos ensinamentos das técnicas histológicas e pela amizade. E à Tânia e o Filipe pela prestatividade e auxílio sempre que possível.

À Cida pela prestatividade e disposição em resolver nossos problemas, o anjo da guarda de todos os alunos do NUPEB.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal, em especial a Cristina e Érica, pela disponibilidade em resolverem os nossos problemas.

Aos meus pais por permitirem que eu fizesse minhas escolhas estando sempre presentes. Sigo firme meu caminho por que sei que quando precisar terei em vocês um porto seguro. As minhas irmãs, Júlia e Eduarda, fontes inesgotáveis de carinho, amor e apoio. Eu amo muito a todos vocês!

Ao meu noivo, Bruno, o maior presente que Ouro Preto me deu. Um companheiro que sempre esteve ao meu lado seja nos momentos alegres ou tristes, a sua paciência foi essencial. Neste momento eu me alegro em dizer que esta conquista é nossa!

As formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* são funcionais em relação à interação parasito-hospedeiro e/ou invasão de células-alvo, entretanto elas diferem nas moléculas presentes na superfície. Assim, aspectos relacionados à variabilidade com que as formas infectivas do *T. cruzi* interagem com as células do hospedeiro podem levar a implicações fundamentais na resposta imune contra o parasito e, conseqüentemente, na evolução clínica da doença de Chagas. O recente aumento no número de imigrantes chagásicos em países não-endêmicos, podendo ocorrer a contaminação por transfusão sanguínea, torna importante a realização de estudos sobre o impacto da infecção por formas sanguíneas no curso da doença. Dessa maneira, o estudo da infecção pelas diferentes formas infectivas do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da doença de Chagas. Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações relacionadas aos parâmetros imunológicos celulares durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais do grupo TS apresentaram níveis mais precoces e elevados de parasitemia em relação aos animais do grupo TM durante os 42 dias de avaliados. A análise dos leucócitos do sangue periférico demonstrou um que a infecção por formas sanguíneas ocasiona em um perfil bimodal, com aumento dos leucócitos no 7^o e 42^o dia após a infecção, enquanto que a infecção por formas metacíclicas leva a um perfil unimodal, com aumento nessas células ocorrendo mais tardiamente, no 28^o e 42^o dia após a infecção. A avaliação na produção de citocinas intracitoplasmáticas por esplenócitos demonstrou que na infecção por forma TS ocorre uma produção precoce de TNF- α acompanhada por uma produção mais tardia de IFN- γ , quando a parasitemia já esta sob controle. Diferente do observado na infecção por formas metacíclicas, a qual apresenta uma produção precoce de IFN- γ . Além disso, nos animais do grupo TS não ocorre uma inversão de um perfil inflamatório para um perfil imunomodulado, mesmo quando a parasitemia já esta sob controle, sendo que nos animais infectados por formas metacíclicas este evento é observado. Esses dados corroboram com a quantificação do infiltrado inflamatório cardíaco, no qual os animais do grupo TS apresentaram uma inflamação precoce (7^o dia após a infecção) que se manteve elevado até o 42^o dia após a infecção, demonstrando assim que nesses animais ocorre uma exacerbação do processo inflamatório. Nos animais do grupo TM foi observada uma redução no processo inflamatório cardíaco do 28^o para o 42^o dia após a infecção, confirmando assim que na infecção por formas metacíclicas ocorre um controle da inflamação. A análise das alterações histológicas esplênicas, também demonstrou maior severidade nas mesmas nos animais do grupo TS. Portanto, a interação inicial entre formas tripomastigotas metacíclicas e o hospedeiro vertebrado induz um perfil de resposta imunológica diferente daquela observada na infecção com formas tripomastigotas sanguíneas. Dessa maneira, observa-se que a infecção por formas tripomastigotas metacíclicas ocorre de forma mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz não só de controlar o número de parasitos durante a fase aguda da infecção como também de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando assim o desenvolvimento das lesões associadas à doença de Chagas. Entretanto, a infecção por formas tripomastigotas sanguíneas ocorre de uma maneira mais alarmante e apesar de haver o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando assim há uma inflamação persistente.

The metacyclic and blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* are fully functional in relation to the parasite-host interaction and / or invasion of target cells, though they differ in the molecules present on their surfaces. Thus, issues related to variability in how the infective forms of *T. cruzi* interacts with host cells may lead to fundamental implications in the immune response against the parasite and, consequently, the clinical evolution of Chagas disease. The recent increase in the number of chagasic immigrants in non-endemic countries makes important to know what is the impact of infection by blood forms in the course of the disease. Thus, the study of infection by different infective forms of *T. cruzi* during the acute phase of infection, leads to a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of Chagas disease. Based on this, the goal of this work was to evaluate changes related to cellular immune parameters during acute experimental infection of mice by metacyclic trypomastigotes (TM) or blood (BT) of *Trypanosoma cruzi* Berenice-78 strain. The animals in the BT group showed an earlier and higher levels of parasitemia when compared with the group MT during the 42 days evaluated. Analysis of peripheral blood leukocytes demonstrated that infection by a BT forms leads to a bimodal profile, with an increase of leukocytes in the 7th and 42nd days after the infection, while infection by MT forms leads to a unimodal profile, with an increase in these cells occurring later in the 28th and 42nd days after infection. The assessment on intracytoplasmic cytokine production by splenocytes demonstrated that in the infection with BT forms occurs an early production of TNF- α accompanied by a later production of IFN- γ , when the parasitemia is already under control. A different profile was seen in infection by MT forms, which presents an early production of IFN- γ . Moreover, in the BT group does not occur a reversal of the inflammatory profile to an immunomodulator profile, even when the parasitemia is already under control, which happens in animals infected with metacyclic forms. These data corroborate with the quantification of cardiac inflammatory infiltration, in which the animals in the BT group showed an earlier inflammation (day 7 after infection) which remained high until the 42nd day after infection, demonstrating that in these animals there is an exacerbation of inflammatory process. In the animals of MT group was observed a reduction in cardiac inflammation at the 42nd day after infection, thus confirming that the infection by MT forms can control inflammation. The histological analysis of spleen, also showed greater severity in the BT group. Therefore, the initial interaction between metacyclic trypomastigotes and vertebrate host induces an immune response profile different from that observed in infections with blood trypomastigotes. Thus, it is observed that infection by metacyclic trypomastigotes occurs more quietly, promoting an immune response capable of controlling not only the number of parasites during the acute phase of infection but also to establish an immunoregulatory response at the end of the acute phase, thus limiting the development of lesions associated with Chagas disease. However, infection with blood trypomastigotes occurs in a more alarming and in spite of control of parasitemia, the establishment of an effective immunoregulatory response does not occur, thus leading to persistent inflammation is present.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares. 22

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em populações leucocitárias..... 25

Figura 1: Estrutura do baço	15
Figura 2: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células NK, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺ ..	26
Figura 3: Análise do controle de isotipo.....	26
Figura 4: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células Mac-3 ⁺	27
Figura 5: Médias das curvas de parasitemia dos camundongos pertencentes ao grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	31
Figura 6: Cinética dos valores absolutos do leucograma de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM; ) ou sanguíneas (TS; ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 7: Percentual médio das células NK (CD49b ⁺) e Mac-3 ⁺ no sangue periférico e no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 8: Percentual médio de linfócitos B (CD19 ⁺) e células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no sangue periférico e no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 9: Percentual de células NK ⁺ TNF- α ⁺ , IFN- γ ⁺ ou IL-10 ⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
Figura 10: Percentual de células Mac-3 ⁺ TNF- α ⁺ ou IL-10 ⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Figura 11: Percentual de células B ⁺ TNF- α ⁺ , IFN- γ ⁺ ou IL-10 ⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Figura 12: Percentual de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ TNF- α ⁺ , IFN- γ ⁺ e IL-10 ⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ) ou sanguíneas (TS, ) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
Figura 13: Análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em células NK no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Figura 14: Análise do perfil das citocinas TNF- α e IL-10 nas células Mac-3 ⁺ no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	47

- Figura 15: Análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 dos Linfócitos B no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 49
- Figura 16: Gráficos de dispersão utilizados para identificar os camundongos com perfil de baixo produtor (\square), alto produtor de citocinas inflamatórias (\blacksquare) e alto produtor de citocina reguladora (\square).. 51
- Figura 17: Perfil de citocinas produzidas pelas células CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 53
- Figura 18: Quantificação de núcleos celulares no músculo cardíaco de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, \square) ou sanguíneas (TS, \blacksquare) da cepa Be-78 do *T. cruzi*..... 54
- Figura 19: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos antes e 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *T. cruzi* 55
- Figura 20: Hiperplasia da polpa branca do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. 56
- Figura 21: Inflamação trabecular no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. 57
- Figura 22: Inflamação e espessamento capsular do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 58

BFA	Brefeldina A
DAI	Dia após a infecção
EDTA	Ácido etilendiminotetraácetico sal dissódico
GIPLs	Glicoinositolfosfolídeos
Gp 82	Glicoproteína 82
Gp 85	Glicoproteína 85
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-12	Interleucina - 12
IL-1 β	Interleucina- 1beta
IL-6	Interleucina – 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
MHC I e II	Complexo de histocompatibilidade principal I e II
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PALS	Bainha linfóide periarteriolar
PIP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5 – Fosfato
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína tirosina kinase
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TLR	Receptor do tipo TOLL
TM	Tripomastigota metacíclica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TS	Tripomastigota sanguínea

1.0 - Introdução	1
2.0 - Revisão Bibliográfica	6
2.1 - Aspectos gerais da doença de Chagas	7
2.2 - Imunopatologia da doença de Chagas	9
2.3 - Participação do baço na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	14
3.0 - Objetivos	16
3.1 - Objetivo Geral	17
3.2 - Objetivos Específicos	17
4.0 - Materiais e Métodos	18
4.1 - Animais.....	19
4.2 - Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	19
4.3 - Curvas de parasitemia.....	20
4.4 - Taxa de mortalidade	20
4.5 - Coleta de sangue	21
4.5.1 - Hemograma	21
4.5.2 - Imunofenotipagem do sangue periférico	22
4.6 - Avaliação fenotípica de células esplênicas de camundongos in vitro	23
4.6.1 - Cultura de células esplênicas	23
4.6.2 - Análise da produção de citocinas por linfócitos	25
4.6.3 - Análise da produção de citocinas por macrófagos	27
4.7 - Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica... 27	
4.7.1 - Avaliações histopatológicas	28
4.8 - Análise estatística	29
5.0 - Resultados	30
5.1 - Curvas de parasitemia e taxa de mortalidade	31
5.2 - Hemograma	32
5.3 - Análise do perfil fenotípico leucocitário do sangue periférico e do baço	33
5.3.1 - Células NK e monócitos/macrófagos	33
5.3.2 - Células B, CD4 ⁺ e CD8 ⁺	35
5.4 - Citocinas produzidas pelas células mononucleares esplênicas.....	37
5.4.1 - Resposta imune inata.....	37
5.4.2 - Resposta imune adquirida	40
5.5 - Análise do balanço entre as citocinas	43
5.5.1 - Resposta imune inata.....	44
5.5.2 - Resposta imune adquirida	48
5.6 - Alterações histopatológicas cardíacas	54
5.7 - Alterações histopatológicas esplênicas.....	56
6.0 - Discussão	59
7.0 - Conclusão	71
8.0 - Referências Bibliográficas	73

1.0 Introdução

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma protozoonose observada em quase todos os países da América Latina. Embora tenha ocorrido um decréscimo substancial em sua incidência na América Latina após a implantação de medidas de controle da transmissão vetorial e transfusional (Moncayo, 2006), ainda é estimado que 15 milhões de pessoas estejam infectadas, e que 90 milhões, aproximadamente 25% da população da América Latina, correm risco de adquirir essa doença (Coura & Dias, 2009).

O principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas é pelo contato das fezes e/ou urina dos triatomíneos contaminados pelo *T. cruzi* com a pele ou mucosa do hospedeiro. As formas tripomastigotas metacíclicas (TM) encontradas no vetor são capazes de penetrar através da membrana mucosa, especialmente a ocular, ou de microlesões na pele. Trabalhos sobre os mecanismos de transmissão mostram que além da transmissão vetorial citada acima, casos alternativos de transmissão, como a via transfusional (Young *et al.*, 2007), congênita (Dorn *et al.*, 2007; Gurtler *et al.*, 2003), por transplantes de órgãos (Centers For Disease Control And Prevention, 2006) e acidentes laboratoriais podem ser identificados.

A infecção por transfusão sanguínea é uma importante via de disseminação da doença, pois formas tripomastigotas sanguíneas (TS) presentes no sangue permanecem viáveis em hemoderivados estocados nos bancos de sangue. Além disso, na ausência de transmissão vetorial, a transmissão por transfusão sanguínea e congênita ganham mais importância, principalmente em regiões não endêmicas, como Estados Unidos e Europa onde há um grande número de imigrantes Latino Americanos. Nesses países o controle do banco de sangue para a doença de Chagas não é realizado, tendo sido relatados casos recentes de transmissão sanguínea e por transplante de órgãos (Leiby *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2007; Gascon *et al.*, 2010).

Embora tenha sido demonstrado que as formas TM e TS sejam funcionais em relação à interação parasito-hospedeiro e/ou invasão da célula-alvo (Ramirez *et al.*, 1993) elas diferem quanto as moléculas presentes na sua superfície.

As glicoproteínas tipo mucinas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI mucinas) purificadas das formas tripomastigotas sanguíneas, mas não aquelas das formas epimastigotas ou metacíclicas, iniciam potencialmente a resposta pró-inflamatória via citocinas e óxido nítrico (NO), sendo 100-1000 vezes mais reativas na indução de citocinas pró-inflamatórias Interleucina-12 (IL-12), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e NO por macrófagos (Camargo *et al.*, 1997a; Camargo *et al.*,

1997b; Almeida *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que alguns glico-inositol-fosfolipídios (GIPLs), extraídos da membrana celular de formas epimastigotas e metacíclicas do *T. cruzi*, exercem função supressiva na ativação de macrófagos e células dendríticas, inibindo a secreção de TNF- α e IL-12 (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Assim, as formas sanguíneas diferem das metacíclicas, uma vez que as últimas, aparentemente, não estão envolvidas no início do processo inflamatório, provavelmente devido à diferenciação na composição gênica. Este fato sugere que as formas metacíclicas poderiam infectar células dos hospedeiros vertebrados de forma mais silenciosa que as sanguíneas.

Estudos referentes ao processo de interação das formas sanguíneas do *T. cruzi* com as células hospedeiras indicam que essas utilizam uma glicoproteína (70 – 200kDA), membro da família das trans-sialidases, que leva à mobilização de Ca^{2+} intracitoplasmático participando assim do processo de internalização do parasito. A glicoproteína 85 (gp85), uma molécula também pertencente à família das trans-sialidases, possui ligantes para laminina e fibronectina e apresenta uma íntima relação com PI-3K, sendo que tratamentos que visam bloquear esta interação diminuem drasticamente o processo de penetração do *T. cruzi* na célula hospedeira (Todorov *et al.*, 2000; Yoshida, 2006).

As formas TM do *T. cruzi*, que apresentam elevada capacidade infectiva, ligam-se à superfície da célula hospedeira por meio de moléculas, como as gp82; oligopeptidase B, trans-sialidases e cruzipaina. Essas moléculas de superfície induzem a ativação de proteínas tirosina kinases (PTK), acionando mecanismos de sinalização celular envolvendo a ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, a geração de fosfatidilinositol 1,4,5-Fosfato (PIP₃). Estes eventos culminam na mobilização de Ca^{2+} dos seus estoques intracelulares, provavelmente do retículo endoplasmático, com um papel chave no processo de recrutamento de lisossomos e sua fusão na membrana celular. Além disso, gp82 induz o desagrupamento da actina auxiliando o processo de internalização muito importante para algumas células não fagocíticas (Burleigh & Andrews., 1995; Burleigh *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000; Yoshida, 2006; Ferreira, 2006).

Aspectos relacionados à variabilidade com que as formas do *T. cruzi* interagem com as células hospedeiras podem ocasionar implicações fundamentais na resposta imune contra este parasito e, conseqüentemente, na evolução clínica da doença de Chagas.

Os mecanismos específicos envolvidos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são complexos. Ainda não é possível explicar como alguns indivíduos desenvolvem formas graves da doença bem como a heterogeneidade das manifestações clínicas presentes nos mesmos. Acredita-se que as manifestações patológicas tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da doença sejam consequência de mecanismos multifatoriais relacionados ao parasito e ao hospedeiro.

Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram que a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o número de parasitos inoculados são aspectos relevantes (Vago, 2000). Em relação ao hospedeiro, é importante ressaltar o estado nutricional, a faixa etária, o sexo e, especialmente, as características genéticas e imunológicas (Dias, 2000; Arantes *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2004).

A resposta imune durante a infecção inicial pelo *T. cruzi* não é completamente compreendida, apesar da sua função crucial no direcionamento das diferentes formas clínicas da doença crônica. Fatores celulares e moleculares inerentes ao hospedeiro estão envolvidos na resistência à infecção pelo *T. cruzi* seja *in vivo* ou *in vitro*, destacando-se a produção de quimiocinas, citocinas e NO (Vespa *et al.*, 1994; Villalta *et al.*, 1998; Scianni, 2001). A ativação precoce do sistema imune inato está envolvida, aparentemente, na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. A estimulação da síntese de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativam as células *natural killers* (NK) que passam a produzir Interferon-gama (IFN- γ), favorecendo a diferenciação dos linfócitos T no fenótipo Th1, que consiste na principal população celular produtora de IFN- γ . Os macrófagos ativados pelo IFN- γ e TNF- α irão produzir NO, um dos principais responsáveis pelo controle da replicação do parasito na fase aguda da doença (Holscher *et al.*, 1998; Kumar & Tarleton, 2001; Michailowsky *et al.*, 2001).

No contexto da imunomodulação, diferentes citocinas são importantes para determinar a morbidade da doença de Chagas. Trabalhos sugerem uma correlação entre a produção de IFN- γ e o desenvolvimento de doença cardíaca grave e o papel da IL-10 no controle da imunopatologia (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003).

Diante do exposto acima, observa-se que diferentes mecanismos relacionados à resposta imune têm sido propostos e apresentados como elos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas na fase crônica da doença de Chagas. Além disso, as diferentes formas infectantes do *T. cruzi* apresentam

características peculiares que implicam em respostas imunes diferenciadas em análises *in vitro*.

Nesse sentido, o estudo da infecção de camundongos por diferentes formas infectantes da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* no decorrer da fase aguda da infecção, irá possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da doença de Chagas. Além disso, devido ao fato de que a infecção transfusional e congênita em países não-endêmicos é reconhecido como um sério problema, é importante saber qual o impacto da infecção por formas sanguíneas no curso da doença. Portanto, neste trabalho serão avaliados parâmetros relacionados às alterações imunológicas que ocorrem no sangue periférico bem como a investigação do panorama de citocinas intracitoplasmáticas de esplenócitos, simulando a transmissão vetorial (infecção pelas formas TM) e transfusional (infecção pelas formas TS ou qualquer mecanismo de transmissão que envolva essas formas). Espera-se com isso obter uma melhor compreensão de como a fonte do inóculo poderá interferir na interação inicial *T. cruzi*/hospedeiro e, conseqüentemente, direcionar o desenvolvimento das diferentes formas clínicas observadas na doença de Chagas.

2.0 Revisão Bibliográfica

2.1 - Aspectos gerais da doença de Chagas

No Brasil, a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias, ocorrendo em uma área de três milhões de quilômetros quadrados. Aproximadamente 2.450 municípios estão envolvidos, abrangendo uma população de mais de 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação e uma população de cinco milhões de indivíduos infectados (Dias *et al.*, 1997). Nos últimos anos foram notificados mais de 470 casos de infecção aguda, quase 90% deles ocorreram na Amazônia Legal, sendo 75% no Pará (Brasil, s.d.). Historicamente caracterizada como uma doença dos pobres e de populações rurais as recentes migrações disseminaram a infecção pelo *T. cruzi* para as cidades da América Latina e outros países não latinos (Gurtler *et al.*, 2003; Gascon, 2005).

A principal forma de controle da doença faz-se através de ações de combate químico sistemático aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. No final do último século, ficou comprovado que medidas sistemáticas de controle e vigilância epidemiológica, em áreas endêmicas, podem levar à eliminação da maioria das populações de vetores domésticos, contribuindo para a interrupção da transmissão da doença. O impacto social do controle da doença pode agora ser demonstrado pela redução ou até mesmo o desaparecimento de casos agudos e de novas infecções em indivíduos mais jovens no Brasil (Dias *et al.*, 2002).

O *T. cruzi* apresenta três estágios morfológicos distintos. O primeiro estágio morfológico se encontra no hospedeiro invertebrado onde as formas epimastigotas e TM podem ser observadas. Os dois estágios finais do parasito podem ser vistos no hospedeiro vertebrado, onde as formas TS e amastigotas podem ser visualizadas. Ao se alimentar do sangue de mamíferos infectados pelo *T. cruzi*, o triatomíneo pode ingerir a forma TS do parasito. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas se transformam nas formas epimastigotas (não-infectivas) e seguem para o intestino onde se reproduzem extracelularmente por divisão binária simples. Uma vez alcançado o reto, as formas epimastigotas se diferenciam em formas TM que são eliminadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Essas formas apresentam distintas maneiras de infecção podendo penetrar pelo local da picada ou pela mucosa, infectando as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). As formas metacíclicas infectam as células hospedeiras e se transformam em amastigotas, dando início a uma série de replicações.

Após vários ciclos de multiplicação as formas amastigotas se diferenciam em TS, que são liberadas no interstício e na corrente sanguínea prontas para infectar outras células hospedeiras e dar início a novas replicações, disseminando a infecção para diferentes tecidos e órgãos (Andrade & Andrews, 2005; Stuart *et al.*, 2008). Sendo esse o mecanismo de transmissão vetorial.

A doença de Chagas humana é caracterizada por duas fases distintas. A fase aguda, que dura aproximadamente de dois a quatro meses, é geralmente assintomática, entretanto, os sinais e sintomas quando presentes são mais freqüentemente relacionados ao estado imunológico do hospedeiro. Essa fase é caracterizada por elevada parasitemia e parasitismo tecidual, processo inflamatório intenso, quadro toxêmico febril e clínico fugaz (Golgher & Gazzinelli, 2004). Nessa fase, as principais lesões ocorrem no tecido cardíaco e a intensidade dessas lesões está diretamente relacionada aos níveis de parasitemia e a carga parasitária tecidual (Parada *et al.*, 1997).

Após a fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença, que se perpetua por toda a vida do hospedeiro. A evolução da fase aguda para a fase crônica, que pode durar de poucas semanas a meses, é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas, diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe Imunoglobulina G (IgG). Nessa fase os níveis de parasitemia tornam-se subpatentes, devido ao controle da proliferação do parasito pelo sistema imune. Entretanto, as seqüelas das lesões desenvolvidas na fase aguda podem ter conseqüências patofisiológicas na fase crônica da doença (Andrade, 1991). A maioria dos indivíduos (70%) permanece na forma indeterminada da doença caracterizada pela ausência de alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen. Porém, alguns indivíduos, cerca de 20 a 30%, desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo cardíaco (forma cardíaca), esôfago e/ou cólon (forma digestiva), sendo essas as formas clínicas da doença de Chagas (Moncayo, 2003).

Dentre as formas sintomáticas, a cardiomiopatia, caracterizada por fibrose miocárdica e cardiomegalia, é a manifestação clínica mais comum, com elevados índices de mortalidade decorrente de insuficiência cardíaca congestiva ou arritmia (Higuchi *et al.*, 2003). Alguns pacientes chagásicos podem apresentar, associado ou não à forma cardíaca, uma destruição dos gânglios do sistema nervoso entérico caracterizando os "megas", que apresentam uma diversidade de sintomas clínicos, variando desde uma leve dificuldade durante a deglutição (mega-esôfago) a severas dilatações das estruturas intestinais (mega-cólon). Embora grande parte dos casos

crônicos apresente uma evolução lenta e benigna, uma parcela significativa de indivíduos vêm a óbito devido a problemas cardiovasculares (Rocha *et al.*, 2007). Na América Latina, a doença de Chagas representa a primeira causa de lesão cardíaca em jovens e adultos em idade economicamente produtiva (Moncayo, 2003). Fatores como a cepa do parasito, o tropismo tecidual, a carga parasitária, o tempo de infecção, a natureza da resposta imune e a genética do hospedeiro são fatores diretamente envolvidos na evolução dessa doença.

2.2 - Imunopatologia da doença de Chagas

Os aspectos anatomopatológicos das fases da doença de Chagas são conhecidos e estudados, mas ainda não se sabe como ocorre a mudança de uma fase para outra, o que leva a crer que essa mudança é caracterizada por um processo patológico complexo e pouco entendido.

Logo após a entrada do parasito no tecido inicia-se o recrutamento dos leucócitos para o local da infecção. A migração dessas células depende da produção local de citocinas e quimiocinas, do aumento da expressão dos seus receptores e das moléculas de adesão.

Os eosinófilos são células presentes em grande número no sangue e tecidos de pacientes chagásicos da fase crônica. No miocárdio de pacientes chagásicos, Molina & Kierszenbaum demonstraram a presença de depósitos de uma neurotoxina derivada de eosinófilos bem como a presença de eosinófilos ativados. Esses mesmos autores também observaram uma correlação entre os níveis de eosinófilos e a severidade das lesões inflamatórias no miocárdio e musculatura esquelética. O papel desse granulócito na lesão de cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* foi também sugerido a partir de estudos *in vitro*, com co-cultura de cardiomiócitos e eosinófilos (Molina & Kierszenbaum, 1988a; Molina & Kierszenbaum, 1988b; Molina & Kierszenbaum, 1989a; Molina & Kierszenbaum, 1989b).

Os macrófagos têm papel essencial no controle da infecção. Essas células secretam uma variedade de mediadores químicos e citocinas que regulam diferentes compartimentos do sistema imunológico. Eles capturam, processam e apresentam antígenos para as células T e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação destas células. Entretanto, elas podem desempenhar um papel duplo na infecção pelo *T. cruzi*, ora servindo como células efetoras da resposta imune frente ao

parasito, ora como células hospedeiras responsáveis pela multiplicação e diferenciação do mesmo (Nogueira *et al.*, 1982). A ativação dos macrófagos representa um evento relevante da imunidade inata na resistência à infecção pelo *T. cruzi*. O processo de fagocitose mediado por macrófagos é capaz de ativar a produção de uma série de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α , que contribuem para produção de IFN- γ por células NK. A produção de IFN- γ leva a redução da parasitemia e mortalidade, promovendo a estimulação de macrófagos e a produção de metabólitos tóxicos para o parasito (Holscher *et al.*, 1998). Além disso, a regulação da expressão de quimiocinas e de IFN- γ associados ao decréscimo do parasitismo nos tecidos pode ser responsável pelo controle da inflamação e imunopatogenia observados nos tecidos cardíacos na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Talvani *et al.*, 2000).

As células NK parecem ter um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, tendo sido demonstrado que durante a infecção ocorre um aumento precoce e significativo na atividade dessas células (Hatcher & Kuhn, 1982). Cardillo *et al.* (1996) observaram que nos estágios iniciais da infecção, as células NK, através da produção de IFN- γ , promoveriam a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do parasito. Assim, as células NK seriam as principais produtoras de IFN- γ nesta fase da infecção (Galvão da Silva & De Almeida Abrahamson, 2001). Além disso, as células NK representam uma importante ponte entre a imunidade inata, que opera com limitada especificidade e eficiência, e a imunidade inata, caracterizada pela expansão de linfócitos específicos para os antígenos de *T. cruzi*.

Além de tipos celulares clássicos da imunidade inata, vários autores relatam que os cardiomiócitos estão ativamente integrados na resposta inflamatória durante a infecção pelo *T. cruzi*, liberando NO, citocinas e quimiocinas, que, por sua vez, poderiam atrair os leucócitos inflamatórios para o controle local da replicação intracelular do parasito. Foi demonstrado que o tecido cardíaco de ratos infectados pelo *T. cruzi* expressam IL-6, IL-1 β , TNF- α e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Chandrasekar *et al.*, 1998). Corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi* também apresentaram mRNA da enzima iNOS e de citocinas pró-inflamatórias (Zhang e Tarleton, 1996).

O papel das subpopulações de linfócitos T é extremamente discutido, tanto nos mecanismos imunorregulatórios quanto na gênese das lesões resultantes da infecção experimental ou humana pelo *T. cruzi*. O papel fundamental dos linfócitos T CD8⁺ no

controle da infecção já foi observado por vários estudos que demonstraram que camundongos nocautes para as células CD8⁺ não foram capazes de sobreviver à infecção (Tarleton *et al.*, 1994). Células T CD8⁺ constituem a população celular presente em maior número no coração de pacientes chagásicos crônicos com cardiomiopatia (Higuchi *et al.*, 1997). A reação inflamatória depende de linfócitos T sensibilizados tendo em vista que em camundongos atímicos infectados pelo *T. cruzi*, a despeito de um intenso parasitismo tecidual, não apresentam resposta inflamatória cardíaca (Gonçalves-da-Costa *et al.*, 1984). Baseado nessas observações sugere-se que mesmo a miocardite da fase aguda é dependente de linfócitos T sensibilizados contra antígenos do *T. cruzi* (Ribeiro dos Santos & Rossi, 1985). Considerando o papel funcional dos linfócitos T CD8⁺ no infiltrado inflamatório cardíaco, há uma correlação positiva entre o número de células expressando IFN- γ e as células T CD8⁺ em pacientes chagásicos que apresentaram sucesso no controle do parasitismo (Reis *et al.*, 1997). Além disso, o papel das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no controle da infecção pelo *T. cruzi* tem sido demonstrado em modelos experimentais (Martin & Tarleton, 2004; Tzelepis *et al.*, 2007).

Silverio *et al.* (2010) demonstraram que camundongos nocautes para linfócitos T CD8⁺ expressando perforina tiveram menores lesões e disfunções cardíacas. Além disso, outros autores também observaram que células T CD8⁺ de lesões cardíacas e digestivas expressam moléculas citolíticas, como a Granzima A (Higuchi *et al.*, 1997; da Silveira *et al.*, 2007). Deste modo, essas células também seriam responsáveis por dano aos cardiomiócitos, favorecendo o desenvolvimento de lesões nesse tecido.

Células T CD8⁺ específicas para o *T. cruzi* proliferam na ausência de células T CD4⁺ e desempenham função similar a elas, porém os linfócitos CD8⁺ falham em conter a parasitemia e o parasitismo tecidual (Padilla *et al.*, 2007). Alguns estudos têm confirmado que a deficiência de células CD4⁺ leva a uma redução global da resposta imunológica do hospedeiro e conseqüente aumento de parasitismo tecidual, provavelmente porque linfócitos T CD4⁺ promovem a ativação de macrófagos e a proliferação de linfócitos T CD8⁺ e B (Rottenberg *et al.*, 1995; Gonçalves da Costa *et al.*, 2002).

Evidências experimentais indicam que durante a infecção pelo *T. cruzi*, existe uma redução da resposta proliferativa de linfócitos, relacionada ao aumento da taxa de apoptose de linfócitos T CD4⁺ (Lopes *et al.*, 1999). A possibilidade de que o *T. cruzi* utilize a ativação preferencial da resposta Th2 como mecanismo de escape já foi

sugerida, contribuindo desta forma para um desequilíbrio das subpopulações de linfócitos T auxiliares (Cunha-Neto *et al.*, 1995).

A infecção de camundongos pelo *T. cruzi*, resulta na ativação policlonal de células B durante a fase aguda da infecção (Minoprio *et al.*, 1989) e essas células parecem ter papel importante na ativação de linfócitos T. Cardillo *et al.*, (2007) demonstraram a participação dos linfócitos B na regulação do padrão da resposta imune por células T durante a infecção pelo *T. cruzi*. Os autores observaram que camundongos nocautes para células B apresentavam menores quantidades de citocinas inflamatórias e menores porcentagens de células T CD8⁺ ativadas e de memória no infiltrado inflamatório cardíaco em relação a camundongos selvagens. A ausência de células B está ainda associada a menor capacidade de mobilização de células inflamatórias para os tecidos infectados, provavelmente resultando no aumento do parasitismo tecidual, sugerindo deste modo que as células B modulam os linfócitos T para uma resposta do tipo 1 durante a fase aguda da infecção.

As citocinas possuem importante papel no controle da replicação do parasito e na resposta imune em animais infectados. Na doença de Chagas, dados da literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas em níveis elevados na fase crônica, possivelmente pela exposição ao parasito por um longo período (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003). As citocinas IFN- γ e IL-10 foram dosadas em animais susceptíveis e resistentes à infecção com as cepas Tulahuen, CL e Brasil, sendo observado que a produção de IFN- γ foi similar entre às linhagens resistentes e susceptíveis. No entanto, a produção de IL-10 foi maior nos animais susceptíveis, infectados com as cepas Tulahuen e CL (Reed *et al.*, 1994; Minoprio *et al.*, 1993) e nos animais resistentes infectados com a cepa Brasil (Zhang e Tarleton, 1996). Estes estudos mostraram que nos animais infectados com o *T. cruzi*, não ocorre uma resposta polarizada, com padrão de produção de citocinas do tipo Th1 ou Th2. Sugerindo um mecanismo alternativo de regulação, a IL-10 bloqueia a estimulação das células NK, e a diferenciação do Th0 para Th1, ocorrendo a predominância da resposta Th2. O TNF- α age sinergicamente com IFN- γ controlando o crescimento do parasito.

O IFN- γ é uma citocina que tem sido citada em diferentes modelos experimentais como um dos principais fatores na destruição do parasito. Em modelo experimental utilizando C57BL/6 foi observada a presença de IFN- γ no início da infecção, sendo a

citocina predominante do décimo quinto ao trigésimo dia, enquanto que, em 60 dias, o balanço entre Th1 e Th2 foi invertido em favor de Th2 com a produção de IL-4 e IL-10. Animais resistentes à infecção utilizam-se inicialmente das citocinas do perfil Th1, mas as citocinas do perfil Th2 aparecem em um momento mais tardio (Talvani *et al.*, 2000).

Existe também uma variação na produção de IFN- γ em diferentes modelos murinos relacionada a resistência que estes animais apresentam a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos BALB/c infectados com cepa Talahuén do *T. cruzi* apresentam uma parasitemia precoce. As células do baço destes animais liberam IFN- γ na segunda semana de infecção, enquanto que camundongos C3H/He, resistentes à infecção, produzem IFN- γ dois dias após serem infectados (Antúnez & Cardoni, 2001).

Alguns trabalhos demonstraram que a alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ e TNF- α , está associada com a progressão da severidade da lesão cardíaca (Gomes *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004). Entretanto, estudos realizados por Laucella *et al.* (2004) indicaram uma correlação negativa entre a expressão de IFN- γ e a cardiomiopatia. Deste modo, a participação do IFN- γ no desenvolvimento da lesão cardíaca ainda é controversa. Por outro lado, dados recentes da literatura demonstram que monócitos de pacientes com a forma indeterminada apresentam maior expressão da citocina IL-10 após exposição ao parasito, enquanto que monócitos de pacientes da forma cardíaca submetidos ao mesmo tratamento expressam, preferencialmente, TNF- α (Souza *et al.*, 2004). Outros autores também observaram a alta expressão de IL-10 por células de pacientes da forma indeterminada (Gomes *et al.*, 2003). Assim, pode-se especular que indivíduos que permanecem assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitos no início da infecção, regulando a resposta imune e limitando o desenvolvimento das lesões. Por outro lado, indivíduos que desenvolverão a forma cardíaca, apesar de conseguirem controlar o parasitismo, não são capazes de produzir uma resposta imunoreguladora, o que possibilita o estabelecimento de uma inflamação persistente.

Cardiomiócitos de ratos neonatos expressam Toll Like Receptor 2 (TLR2), TLR3, TLR4 e TLR6 (Frantz *et al.*, 1999). O TLR2 é responsável pelo reconhecimento das âncoras de glicofosfatidilinositol derivadas de *T. cruzi*, sendo sua dimerização com TLR6 ou TLR1 fundamental para sua ativação (Ozinsky *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2001). A ligação com TLR 2 dispara a cascata de transdução sinal que promoverá a ativação do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e, conseqüentemente, a resposta

celular pró-inflamatória. A ativação de NF- κ B promove transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-12, IL-1 β (Interleucina 1 β), IL-6 (Interleucina 6) e da enzima iNOS, responsável pela produção de NO (Campos *et al.*, 2001). Oliveira *et al.* (2004), ao estudarem a função de TLR-4 na doença de Chagas, constataram que camundongos deficientes para este receptor são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, apresentando elevada parasitemia e taxa de mortalidade. Isso se deve à falha na interação de GPIs do parasito com os receptores TLR-4 presentes em monócitos, indicando sua importância na ativação da resposta imune protetora.

2.3 - Participação do baço na infecção pelo *T. cruzi*

Localizado no abdômen, diretamente abaixo do diafragma e conectado ao estômago, o baço é o maior filtro de sangue do corpo humano, composto por dois compartimentos distintos morfológica e funcionalmente, a polpa vermelha e a polpa branca (Steininger & Barth, 2000).

A polpa vermelha é um filtro de sangue que remove material estranho e danificado. Também é local para estoque de ferro, eritrócitos e plaquetas. A estrutura especializada do sistema venoso da polpa vermelha dá a esta área sua capacidade única de filtrar o sangue e remover velhos eritrócitos.

A função linfóide é exercida na polpa branca. Esta é subdividida em bainha linfóide periarteriolar (PALS), folículos e zona marginal, composta de linfócitos, macrófagos, células dendríticas e plasmócitos. A correta organização e manutenção da polpa branca é controlada por quimiocinas específicas que atraem as células T e B aos seus respectivos domínios, estabelecendo zonas específicas dentro da polpa branca. As PALS são as zonas de células T, nesta região os linfócitos T interagem com as células dendríticas e sofrem estimulação antigênica. Os folículos são as regiões das células B que estão interligados às PALS e são tipicamente encontrados em regiões de bifurcação das arteríolas centrais. Além disso, eles podem conter centros germinais, que se formam após estimulação antigênica.

A organização e imunofisiologia da polpa branca é extremamente similar à estrutura e função dos linfonodos. Uma importante diferença é a maneira pela qual os linfócitos entram nos dois órgãos linfóides. Nos linfonodos, a maioria dos linfócitos tem

acesso pelas veias endoteliais altas e vasos linfáticos aferentes enquanto que o acesso ao baço se dá pela zona marginal (Mebius & Kraal, 2005).

Os folículos estão cercados por uma borda de linfócitos e macrófagos, chamados de zona marginal. Esta zona possui a função de escanear a circulação sistêmica a procura de antígenos e patógenos atuando efetivamente no processamento antigênico. Nessa área há um grupo único de macrófagos denominados metalofílicos importantes na eliminação de microorganismos e vírus.

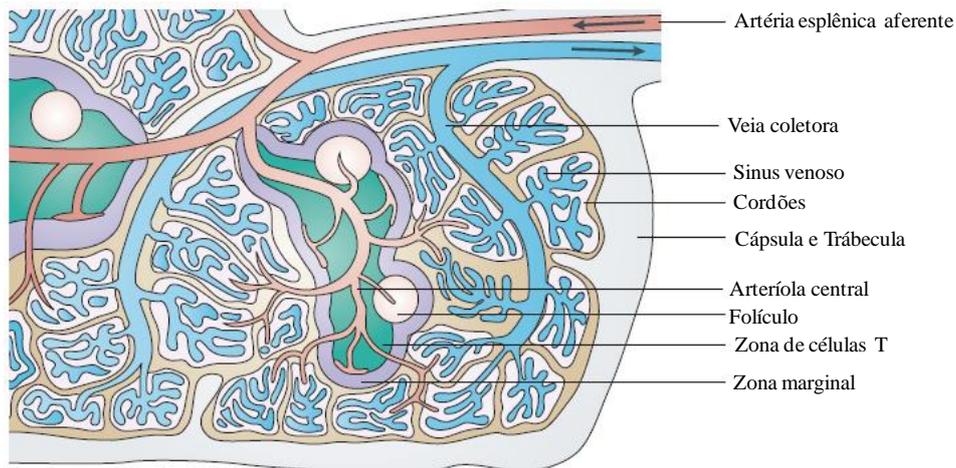


Figura 1: Estrutura do baço (Mebius & Kraal, 2005)

Diversas alterações do sistema imune são observadas durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Nos órgãos linfóides secundários, alguns autores têm relatado esplenomegalia e linfadenopatia, com ativação policlonal persistente de linfócitos T e B (Minoprio, 2001; Brener & Gazinelli, 1997). Além disso, linfócitos T ativados de baço de camundongos infectados pelo *T. cruzi* secretam IFN- γ , IL-4 e IL-10, sugerindo um perfil misto (Th1 e Th2) de produção de citocinas neste órgão (Silva *et al.*, 2005).

3.0 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar as alterações relacionadas aos parâmetros imunológicos celulares durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

3.2 - Objetivos Específicos

3.2.1. Determinar a curva de parasitemia, período pré-patente, período patente e a taxa de mortalidade;

3.2.2. Investigar o perfil hematológico;

3.2.3. Identificar o fenótipo das células mononucleares do sangue periférico;

3.2.4. Analisar o perfil fenotípico das células mononucleares do baço;

3.2.5. Avaliar o padrão de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) produzidas *in vitro* por células do baço;

3.2.6. Avaliar as alterações histopatológicas cardíacas e esplênicas.

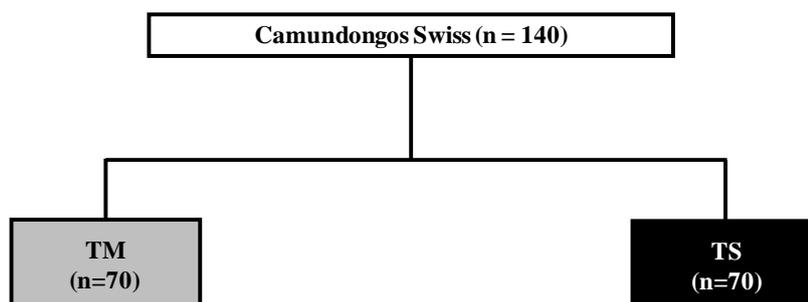
4.0 Materiais e Métodos

4.1 - Animais

Foram utilizados 140 camundongos *Swiss*, 30 dias de idade, machos, nascidos na Maternidade do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA – UFOP).

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: infectado com formas TM e infectado com formas TS. O Fluxograma 1 apresenta a distribuição dos animais nos dois grupos experimentais descritos acima. Outros fluxogramas derivados desse irão ser mostrados ao longo da descrição da metodologia e explicitam o número de camundongos em cada grupo, para cada etapa do trabalho, levando em conta a metodologia aplicada em cada momento.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2008/12).



Fluxograma 1 - Distribuição dos animais nos dois grupos experimentais TM: infectado com formas tripomastigotas metacíclicas e TS: infectado com formas tripomastigotas sanguíneas.

4.2 - Infecção pelo *T. cruzi*

Os animais foram inoculados com 5×10^3 formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, pela via intraperitoneal. As formas sanguíneas foram obtidas de camundongos infectados pela cepa Be-78 (*T. cruzi* II), por via intraperitoneal. Essa cepa é mantida por nosso laboratório através de passagens quinzenais em camundongos *Swiss*. As formas metacíclicas desta mesma cepa foram obtidas de ninfas de *Triatoma infestans* provenientes da colônia de triatomíneos do

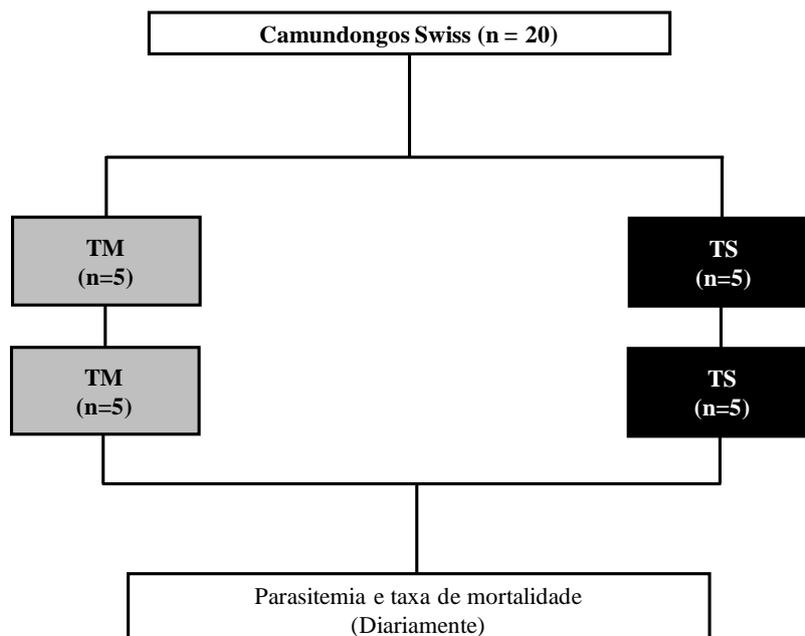
Laboratório de Doença de Chagas (UFOP), alimentadas em camundongos infectados pela mesma cepa.

4.3 - Curvas de parasitemia

Para determinação da parasitemia os camundongos foram avaliados diariamente a partir do 4^o dia após a infecção (DAI) até a negatização do exame, por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia de Brener (1962), sendo realizado um experimento em duplicata da mesma com cinco animais em cada grupo (Fluxograma II). Cinco μL de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada nos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneos por 0,1mL de sangue. O período pré-patente, período patente e o pico máximo de parasitemia foram determinados.

4.4 - Taxa de mortalidade

Os animais utilizados para a determinação da curva de parasitemia foram acompanhados diariamente até o 42^o DAI sendo a mortalidade registrada e expressa em porcentagem cumulativa (Fluxograma II).



Fluxograma 2 - Animais utilizados para determinação da curva de parasitemia e taxa de mortalidade. Experimentos realizados em duplicata.

4.5 - Coleta de sangue

Trezentos microlitros de sangue de cada animal de cada grupo foram coletados do plexo orbital no período que antecedeu a infecção (0) e aos sete, 14, 28 e 42 DAI para a realização do hemograma (150µl) e imunofenotipagem (150µl), tendo sido realizado um experimento em duplicata de toda essa etapa (Fluxograma III).

4.5.1 - Hemograma

O perfil hematológico do sangue dos camundongos foi determinado no período que antecedeu a infecção (0) e aos sete, 14, 28 e 42 DAI utilizando-se o contador hematológico veterinário automático (BC-2800VET, Mindray). Foram avaliadas as séries vermelha (hemácias, hemoglobina e plaquetas) e branca (linfócitos, monócitos e granulócitos).

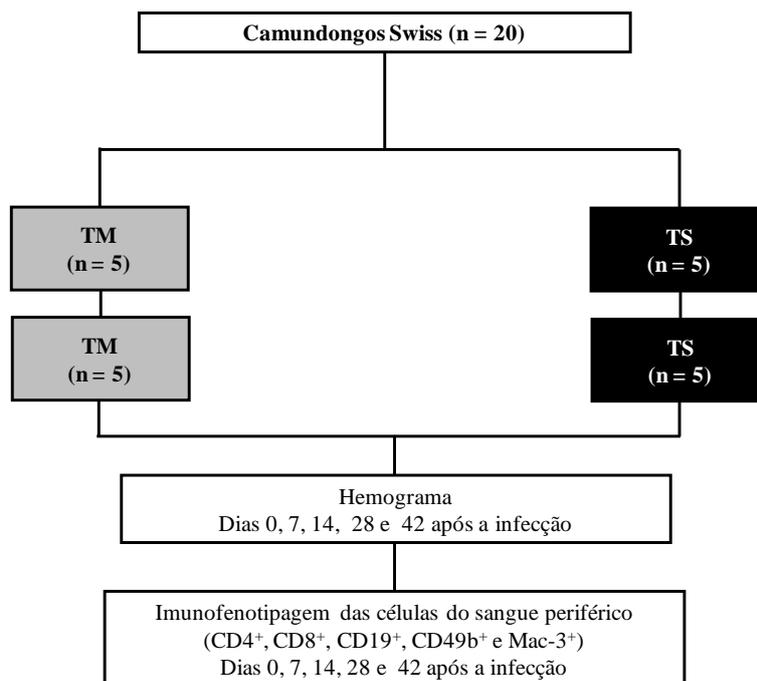
4.5.2 - Imunofenotipagem do sangue periférico

Dentre os parâmetros imunológicos avaliados, foi realizada a caracterização do perfil fenotípico das células do sangue periférico. Em tubos de poliestireno 12x75mm, foram adicionados 2µL do anticorpo.

Foi utilizado o anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo (Tabela 1). Para cada tubo com anticorpo monoclonal, foram adicionados 25µL de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado, os leucócitos foram lavados com 3mL de PBS (pH7,4), e centrifugados como descrito anteriormente. Finalmente, os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	FITC	Caltag	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Caltag	5H10	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	FITC	Caltag	6D5	Linfócitos B
Anti-CD49b	FITC	Pharmlingen	DX5	Células NK
Anti-Mac-3	FITC	Pharmlingen	M3/84	Monócitos/Macrófagos
Anti-IgG2a	FITC	Caltag	-	Controle de isotipo



Fluxograma 3 – Avaliações realizadas no período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção para determinação cinética do hemograma e imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico. Experimentos realizados em duplicata (n=5 em cada grupo).

4.6 - Avaliação fenotípica de células esplênicas de camundongos *in vitro*

Cinco animais de cada grupo foram eutanaziados por deslocamento cervical, no período que antecedeu a infecção (0) e no 7^o, 14^o, 28^o e 42^o DAI para a coleta do baço para a realização da cultura dos esplenócitos (Fluxograma 4).

4.6.1 - Cultura de células esplênicas

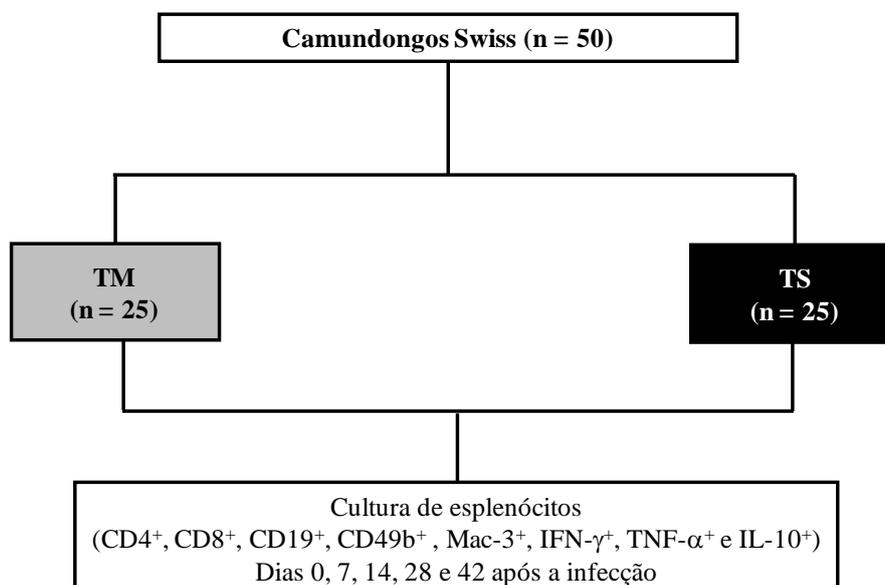
As suspensões de células do baço foram preparadas de acordo com o método descrito por Taylor *et al.* (1987). O órgão foi retirado e colocado em um macerador de tecido de vidro com 10 ml de RPMI. Posteriormente, após a retirada dos *debris*, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 ml e centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos.

Alíquotas de células esplênicas (1×10^7 /mL) foram incubadas na presença apenas de meio de cultura RPMI por 12 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C.

Após a retirada dos tubos da estufa, adicionou-se Brefeldina A (BFA) (10 µg/ml, Sigma) com posterior incubação por 4 horas. Utilizou-se a BFA para inibir a secreção da citocina, mantendo-a no interior do complexo de Golgi. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200µl ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Sigma), numa concentração final de 20mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. O EDTA bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 3 mL de tampão de lavagem – PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1% de azida sódica), e centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos a 18°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-moléculas de superfície (CD4, CD8, CD19, CD49b e Mac-3 – Tabela 1) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e à fixação dos leucócitos pelo tratamento com 2mL de solução de lise diluída 10 x em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a fixação, a suspensão de leucócitos foi centrifugada a 1200 rpm durante 7 minutos a 18°C, o sobrenadante descartado e as células permeabilizadas com 2mL de solução permeabilizante – PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina – Sigma), por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as suspensões de leucócitos foram centrifugadas a 1200 rpm durante 7 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 3mL de PBS-W. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-W. Após a ressuspensão das células, procedeu-se à marcação das citocinas intracitoplasmáticas em placas de 96 poços e fundo em “U”. Para isso, alíquotas de 30µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz na presença de 20µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE (anti-TNF-α, anti-IFN-γ e anti-IL-10, - Tabela 2) e previamente diluídos a 1:50 em PBS-P estéril com 10% de soro normal de rato. Após a incubação, as células foram lavadas com 100µl de PBS-P e, em seguida, com 200µl de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200µl de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz até a sua leitura no citômetro de fluxo em 24 horas.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em populações leucocitárias.

Anticorpos	Fabricante	Clone	Concentração
Anti TNF- α PE	Caltag	MP6-XT22	50 μ g/0,5ml
Anti IL-10 PE	Caltag	JES5-2A5	50 μ g/0,5ml
Anti IFN- γ PE	Serotec	XMG1.2	0,1mg/ml
Anti IgG1 - PE	Caltag	-	



Fluxograma 4 – Necropsias realizadas no período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 após a infecção para a realização da cultura de esplenócitos (n=5 em cada tempo).

4.6.2 - Análise da produção de citocinas por linfócitos

A análise da produção de citocinas por células NK, linfócitos T e B foi realizada através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 2A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares produtoras de citocinas, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL2 versus FL1 (Figura 2B).

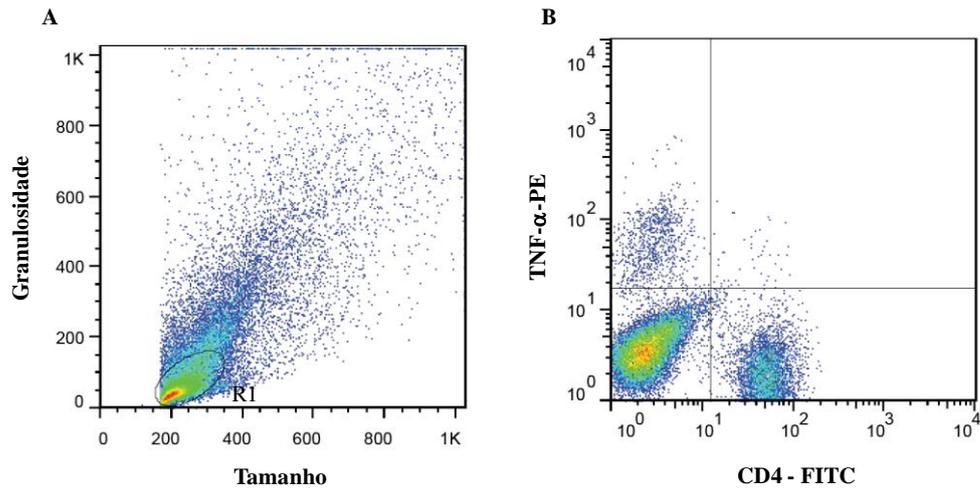


Figura 2: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células NK, CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.

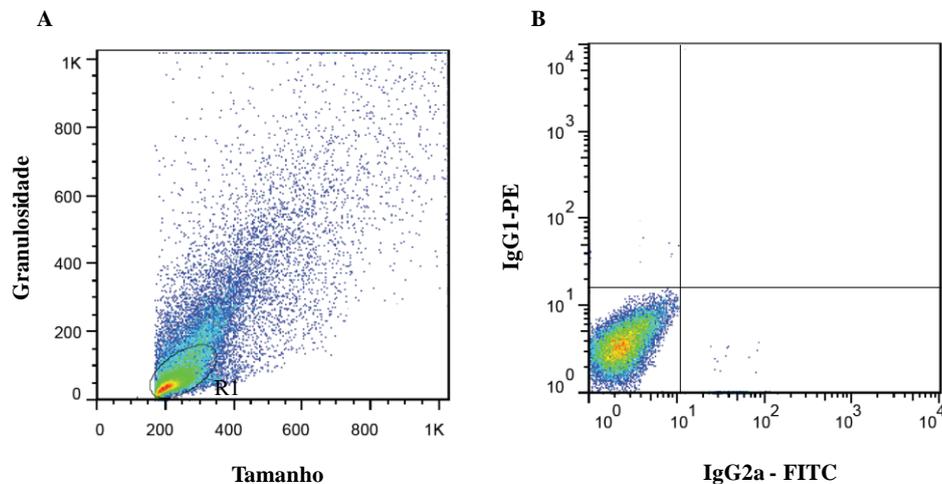


Figura 3- Análise do controle de isotipo. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.

4.6.3 - Análise da produção de citocinas por macrófagos

A análise da produção de citocinas por macrófagos foi feita a partir da construção de gráficos de fluorescência FL1/anti-Mac-3 FITC versus granulocidade (SSC) e, os macrófagos discriminados como células SSC Mac-3high (Figura 4A). Já a análise da expressão de citocinas por estas células foi determinada em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL1/anti-Mac-3 FITC versus FL2/anti-citocinas (Figura 4B).

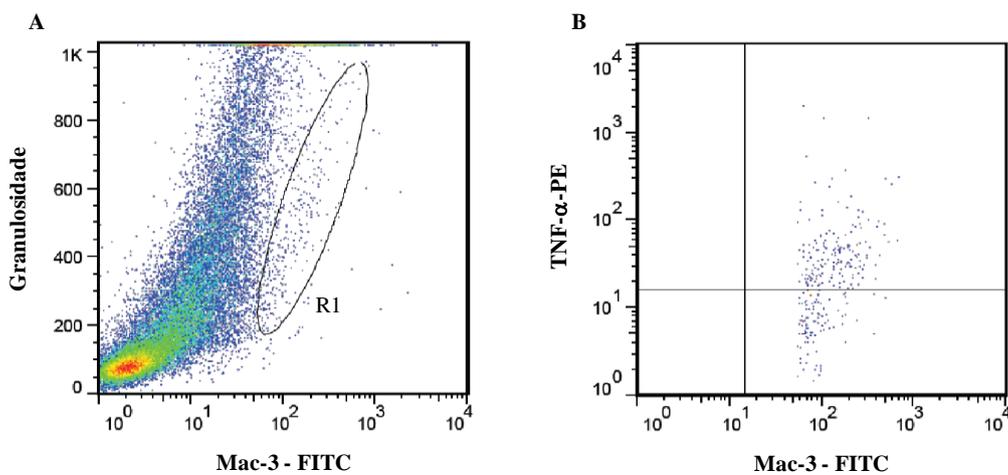


Figura 4: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células Mac-3. (A) Gráfico de distribuição pontual FL1/anti-Mac-3 FITC versus SSC utilizado para a seleção da população de macrófagos – R1. **(B)** Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.

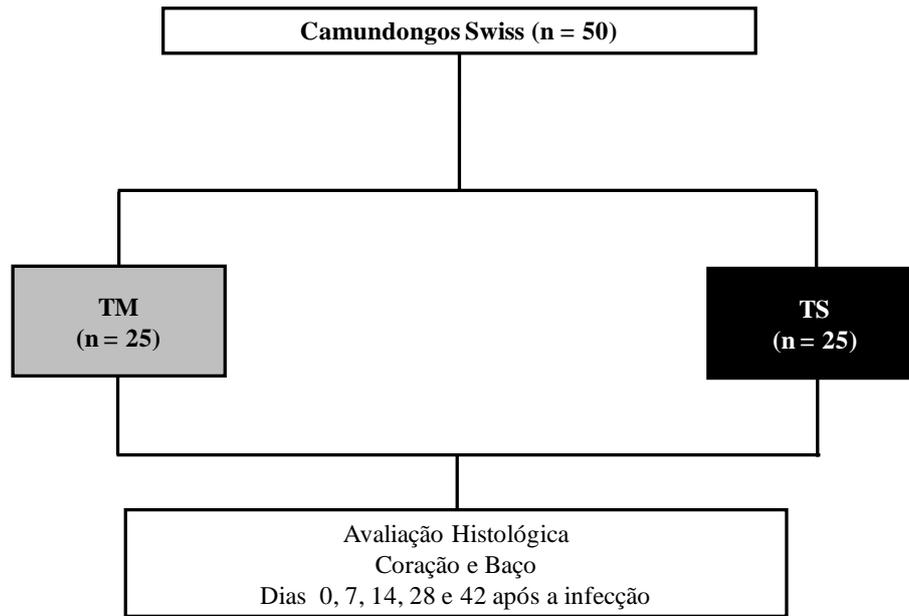
4.7 - Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica

Cinco animais de cada grupo foram eutanaziados, por deslocamento cervical, no período que antecedeu a infecção (0) e no 7^o, 14^o, 28^o e 42^o DAI para a realização da necropsia (Fluxograma 5). Durante esse procedimento foram coletados o coração e baço *in totum* que foram fixados em formol a 10% tamponado (pH 7.2). Fragmentos desses órgãos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de quatro μm . Foram confeccionadas lâminas dos blocos parafinizados do coração e baço

para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise rotineira das alterações histopatológicas.

4.7.1 – Avaliações histopatológicas

Foi realizada a análise qualitativa do coração e baço. Sendo avaliada no baço a presença de hiperplasia da polpa branca, inflamação capsular e trabecular. Todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva 40x foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuário do NUPEB. Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3. O processo inflamatório foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados \pm desvio padrão ($n = 25$), os animais infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.



Fluxograma 5 – Necropsias realizadas no período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 após a infecção para a realização das análises histológicas no coração e baço.

4.8 - Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental dos softwares Minitab 13.20 para Windows (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) e GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Para comparação longitudinal foi realizada análise de variância (ANOVA one-way). Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias.

Para a análise da área sobre a curva de parasitemia foi utilizado teste T de Student pareado.

5.0 Resultados

5.1 - Curvas de parasitemia e taxa de mortalidade

A taxa de infectividade entre os animais inoculados com as formas TM ou TS foi de 100%, enquanto a taxa de mortalidade foi de 0% ao longo dos 42 dias de avaliação em ambos os grupos. Na Figura 5 observam-se as médias das curvas de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos TM e TS. No grupo TM constatou-se período pré-patente de 8 dias, patente de 30 dias e pico de parasitemia no 27^o DPI (152.250 tripomastigotas/0,1 ml de sangue). Já no grupo TS o período pré-patente foi menor (5 dias), com período de patência de 33 dias e pico de parasitemia precoce, no 15^o DPI (197.875 tripomastigotas/0,1 ml de sangue). Os animais do grupo TS apresentaram a área sobre a curva significativamente maior ($p = 0,001$) quando comparados aos animais do grupo TM.

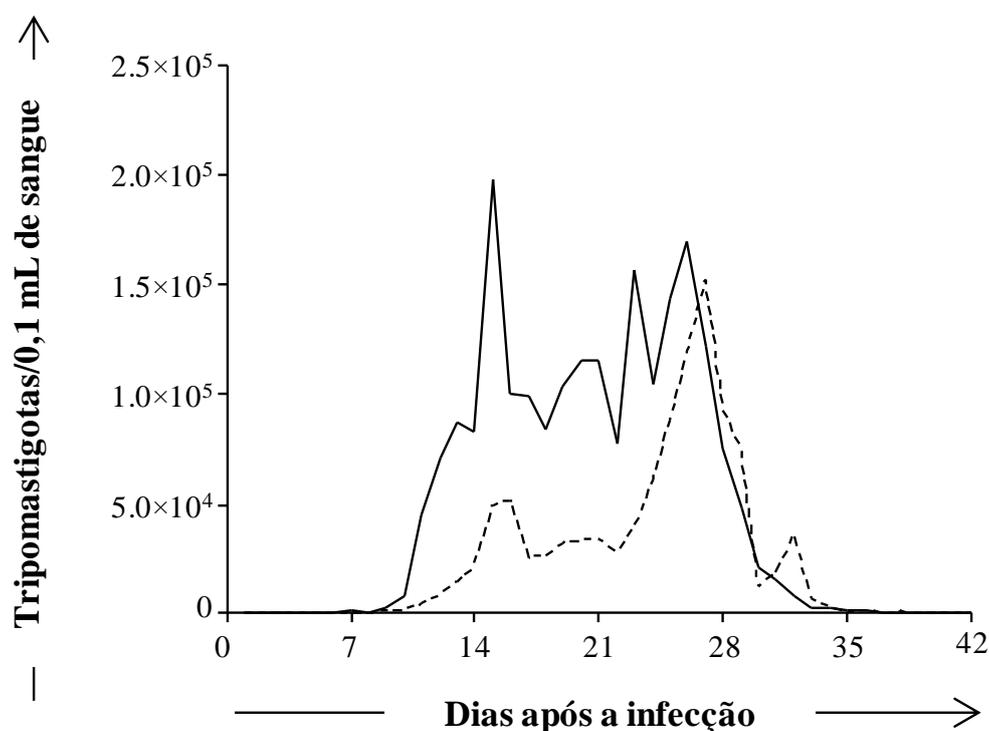


Figura 5: Médias das curvas de parasitemia dos camundongos pertencentes ao grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, ---) ou sanguíneas (TS, —) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com cinco animais em cada grupo. As curvas plotadas representam a média de 10 animais por grupo.

5.2 - Hemograma

Com o objetivo de investigar se a infecção por formas TM ou TS interfere no número de leucócitos circulantes, foi realizada a contagem diferencial dessas células e os resultados estão apresentados na Figura 6.

A infecção pelas duas formas infectantes promoveu um aumento nos números de leucócitos totais, monócitos e linfócitos, no 28^o e 42^o DAI, para o grupo TM, e no 7^o e 42^o DAI para o grupo TS. Para neutrófilos, houve um aumento no 42^o DAI nos animais infectados por formas TM, entretanto para os animais infectados por formas TS esse aumento ocorreu precocemente (7^o DAI) sendo observado novamente no 42^o DAI. Os animais do grupo TM apresentaram eosinofilia no 28^o DAI, enquanto que em TS não foi observados eosinófilos.

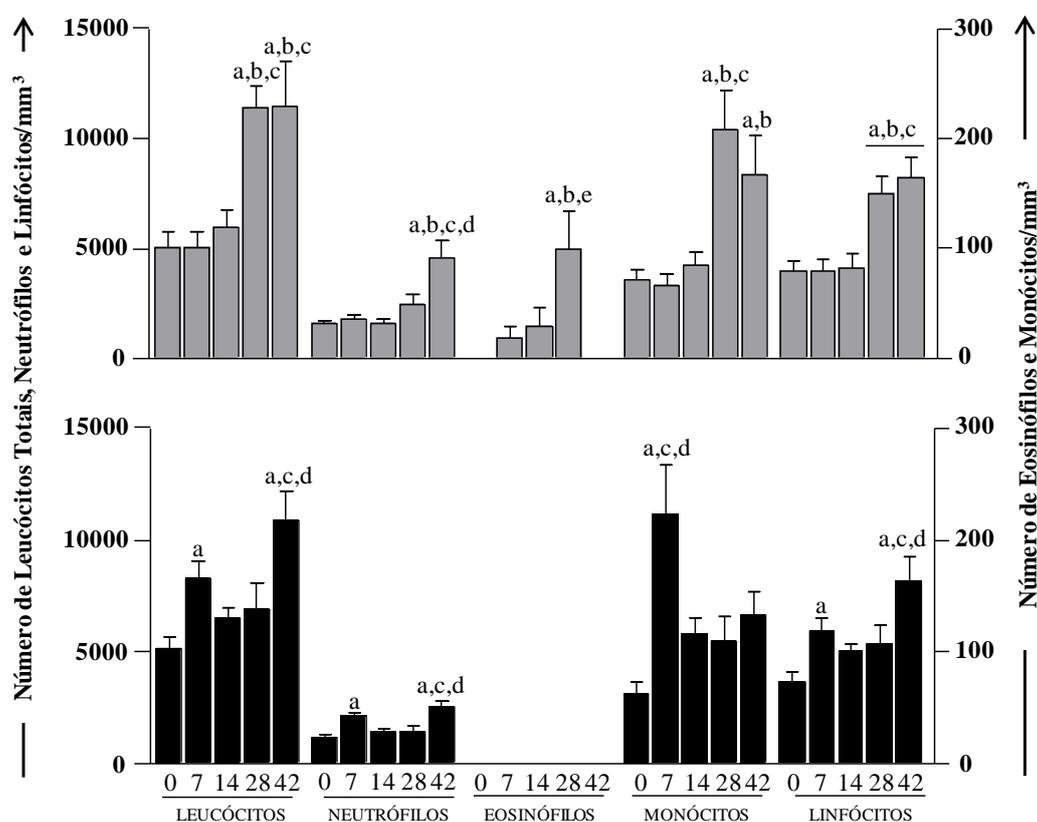


Figura 6: Cinética dos valores absolutos do leucograma de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM; □) ou sanguíneas (TS; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados ao longo da fase aguda infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos distintos, com cinco animais em cada grupo, representando a média de 10 animais por grupo.

5.3 - Análise do perfil fenotípico leucocitário do sangue periférico e do baço

5.3.1 - Células NK e monócitos/macrófagos

Com o objetivo de caracterizar o efeito da infecção por formas TM ou TS sobre a resposta imune inata ao longo da fase aguda foi realizada uma análise fenotípica das células NK⁺ e Mac-3⁺ (Monócitos/Células dendríticas) no sangue periférico e no baço. Na Figura 7 estão representados os perfis fenotípicos das células da imunidade inata no sangue e no baço dos diferentes grupos experimentais apresentadas como células NK⁺ e Mac-3⁺.

A infecção por formas TM não promoveu alteração no percentual dessas células no sangue periférico ao longo dos 42 dias avaliados. Por outro lado, no 7^o DAI, os animais infectados por formas TS apresentaram um aumento no percentual de células Mac-3⁺ circulantes em relação aos outros dias avaliados.

A análise dessas células no baço demonstrou que ocorreu uma diminuição das células NK nesse órgão ao longo da infecção por formas TM ou TS, porém essa redução acontece apenas ao final da fase aguda (42^o DAI) para os animais do grupo TM, enquanto nos animais do grupo TS esse evento ocorre mais precocemente a partir do 14^o DAI. Além disso, observou-se também que a infecção pelo *T. cruzi*, independente da forma infectante utilizada, promove um aumento nos valores percentuais de macrófagos no baço desses animais ao longo da fase aguda.

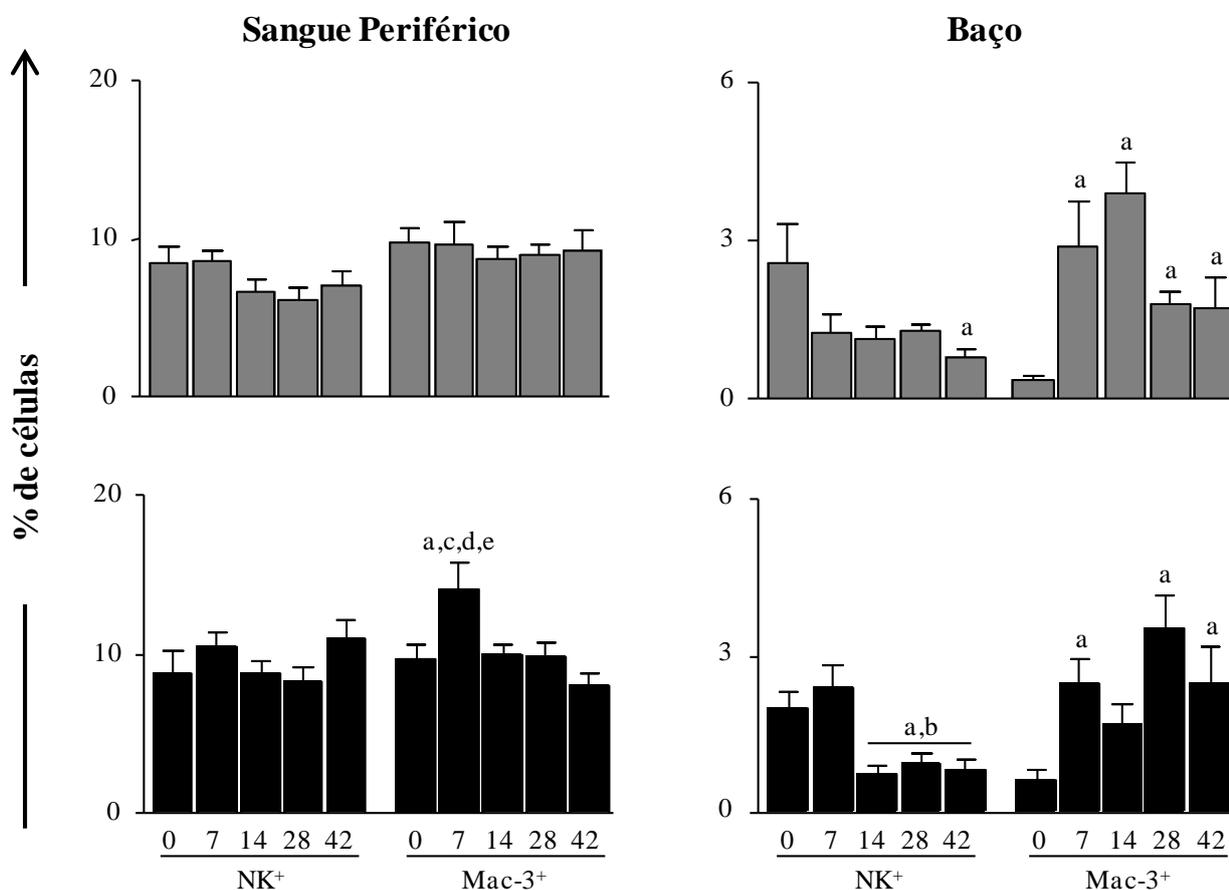


Figura 7: Percentual médio das células NK (CD49b⁺) e Mac-3⁺ no sangue periférico e no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, □) ou sanguíneas (TS, ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos distintos, com cinco animais em cada grupo, representando a média de 10 animais por grupo.

5.3.2 - Células B, CD4⁺ e CD8⁺

Para melhor caracterizar o efeito da infecção por formas TM ou TS na resposta imune adquirida ao longo da fase aguda foi realizada uma análise fenotípica dos linfócitos B e das células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico e no baço. Na Figura 8 estão representados os perfis fenotípicos das populações de linfócitos no sangue e no baço dos diferentes grupos experimentais sendo apresentadas como células B (CD19⁺) e células CD4⁺ e CD8⁺.

No sangue periférico a infecção por formas TM promoveu uma diminuição no percentual de células B circulantes no 28^o DAI não sendo observada alteração nas células CD4⁺ e CD8⁺. Por outro lado, no sétimo DAI, os animais infectados por formas TS já apresentaram uma diminuição no percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ circulantes em relação ao dia 0 e, diferentemente do observado no grupo TM, não houve alteração no percentual de células B.

No baço, na infecção por formas TM foi observado um aumento no percentual de células B no 7^o DAI acompanhado por uma redução no percentual dessas células no 14^o e 42^o DAI. No entanto, os animais do grupo TS apresentaram uma diminuição significativa no percentual dessas células apenas no 42^o DAI em relação aos dias 0, 7 e 14. A infecção por ambas as formas não alterou a porcentagem de células CD4⁺ ao longo da fase aguda, no entanto, promoveu um aumento significativo na porcentagem de células CD8⁺ esplênicas mais tardiamente, no 28^o e 42^o DAI.

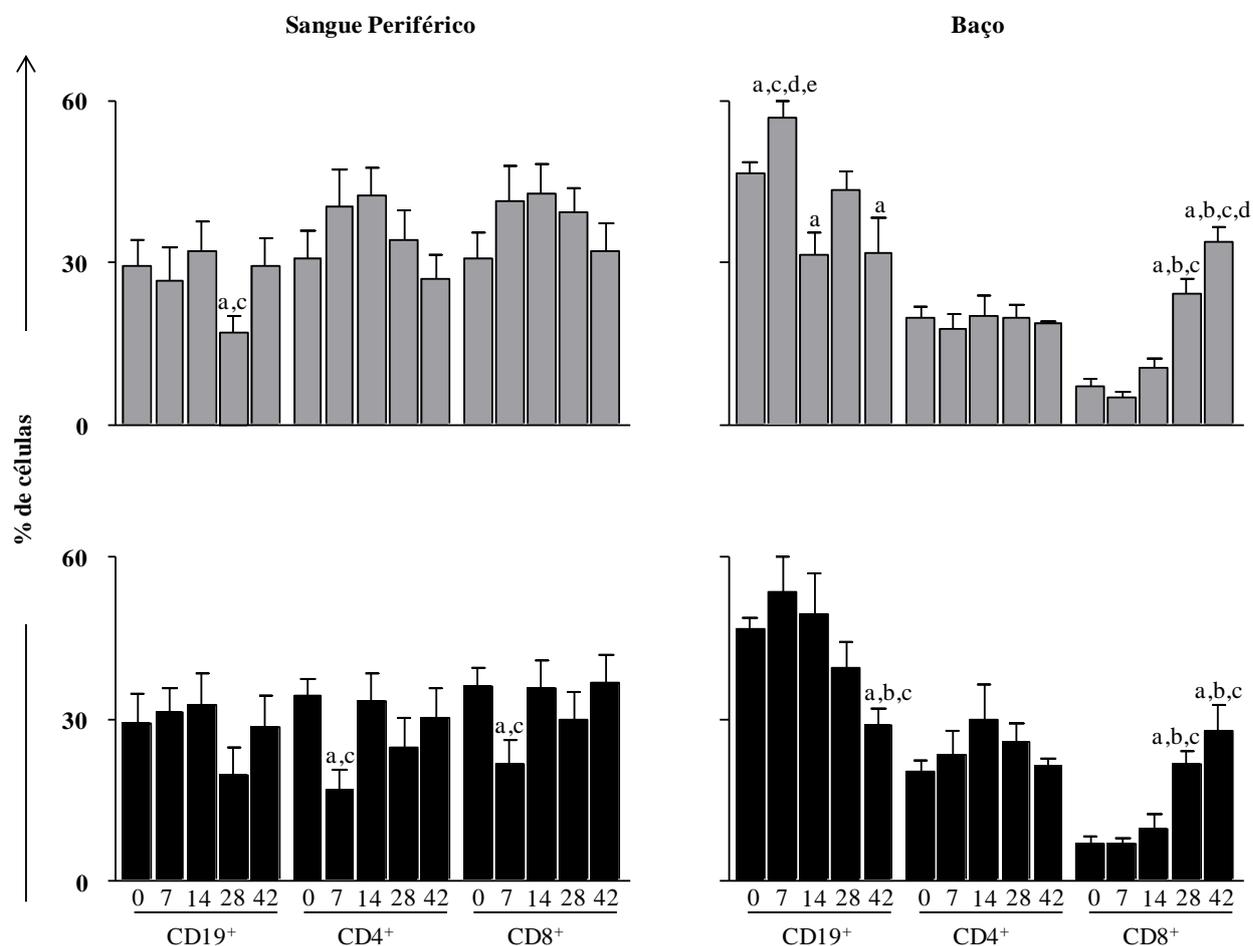


Figura 8: Percentual médio de linfócitos B (CD19⁺) e células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico e no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, □) ou sanguíneas (TS, ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos distintos, com cinco animais em cada grupo, representando a média de 10 animais por grupo.

5.4 - Citocinas produzidas pelas células mononucleares esplênicas

5.4.1 - Resposta imune inata

Com o objetivo de verificar o impacto da infecção por formas TM ou TS sobre o padrão de citocinas produzidas por células da imunidade inata e adaptativa, foi caracterizada a frequência de cada uma dessas células produtoras de $\text{TNF-}\alpha^+$, $\text{IFN-}\gamma^+$ e IL-10^+ no baço.

a) Células NK

A Figura 9 apresenta os resultados percentuais de células NK $\text{TNF-}\alpha^+$, $\text{IFN-}\gamma^+$ e IL-10^+ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Os animais infectados por formas TM apresentaram um aumento no percentual de células $\text{NK}^+\text{TNF-}\alpha^+$ no 14^o e 28^o DAI, retornando a produção basal dessa citocina no 42^o dia. Para os animais do grupo TS o aumento da percentagem de células $\text{NK}^+\text{TNF-}\alpha^+$ ocorreu precocemente (7^o DAI).

As duas formas infectantes utilizadas neste trabalho causaram uma redução significativa no percentual de células $\text{NK}^+\text{IFN-}\gamma^+$ no dia 7 após a infecção. No entanto, os animais do grupo TM apresentam um aumento percentual dessas células no 14^o DAI, enquanto que os animais do grupo TS mantiveram o percentual de células $\text{NK}^+\text{IFN-}\gamma^+$ reduzido, sendo restabelecido apenas no 28^o DAI.

Não houve alteração no percentual de células $\text{NK}^+\text{IL-10}^+$ no grupo TM. No grupo TS ocorreu uma redução no percentual de células $\text{NK}^+\text{IL-10}^+$ desta citocina nos dias 7 e 14 após a infecção.

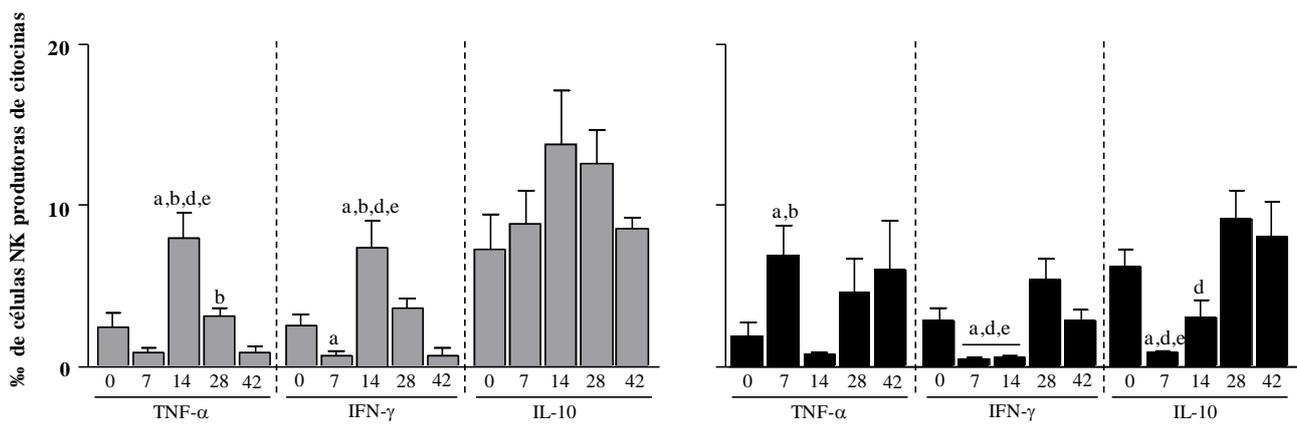


Figura 9: Percentual de células NK⁺ TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, \square) ou sanguíneas (TS, \blacksquare) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo.

b) Macrófagos

A Figura 10 apresenta os resultados percentuais de células Mac-3⁺ TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Os dois grupos experimentais apresentaram uma redução de células Mac-3⁺TNF- α ⁺ precocemente no baço, entretanto no 28^o DAI os animais do grupo TM apresentaram um aumento significativo no percentual de células Mac-3⁺TNF- α ⁺, que voltou a diminuir no 42^o DAI. Para os animais do grupo TS esse aumento significativo da percentagem de células Mac-3⁺ TNF- α ⁺ ocorreu no 28^o e 42^o DAI, o que sugere que o controle da produção dessa citocina não ocorreu nesse grupo.

O percentual de células Mac-3⁺IL-10⁺ acompanhou o mesmo padrão observado para a citocina TNF- α nessas células. Uma diminuição precoce na frequência de células Mac-3⁺IL-10⁺, com um aumento no 28^o DAI que se manteve no 42^o DAI para os animais do grupo TS.

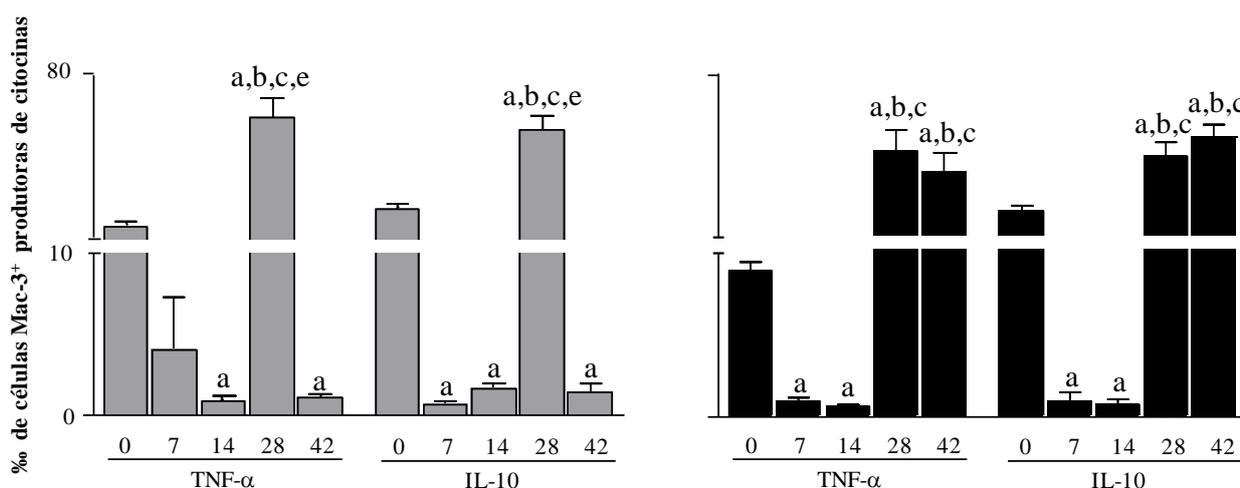


Figura 10: Percentual de células Mac-3⁺ TNF- α ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, \square) ou sanguíneas (TS, \blacksquare) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo.

5.4.2 - Resposta imune adquirida

a) Linfócitos B

A Figura 11 apresenta os resultados percentuais de células B (CD19⁺) TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Não houve alteração no percentual de células B⁺ TNF- α ⁺ por nos animais infectados por formas TM ao longo dos dias avaliados. Por outro lado, os animais infectados por formas TS apresentaram um aumento significativo no percentual de células B⁺ TNF- α ⁺ a partir do 28^o DAI.

Para a citocina IFN- γ os animais do grupo TM apresentaram um aumento significativo no percentual de células B⁺ IFN- γ ⁺ apenas no 42^o DAI. Entretanto, nos animais do grupo TS esse aumento no percentual dessas células começou no 28^o dia e manteve-se no 42^o DAI.

Em relação à citocina IL-10, ambos os grupos experimentais apresentaram um aumento no percentual de células B⁺ IL-10⁺ no 28^o DAI, porém apenas nos animais do grupo TS esse aumento se manteve no 42^o dia.

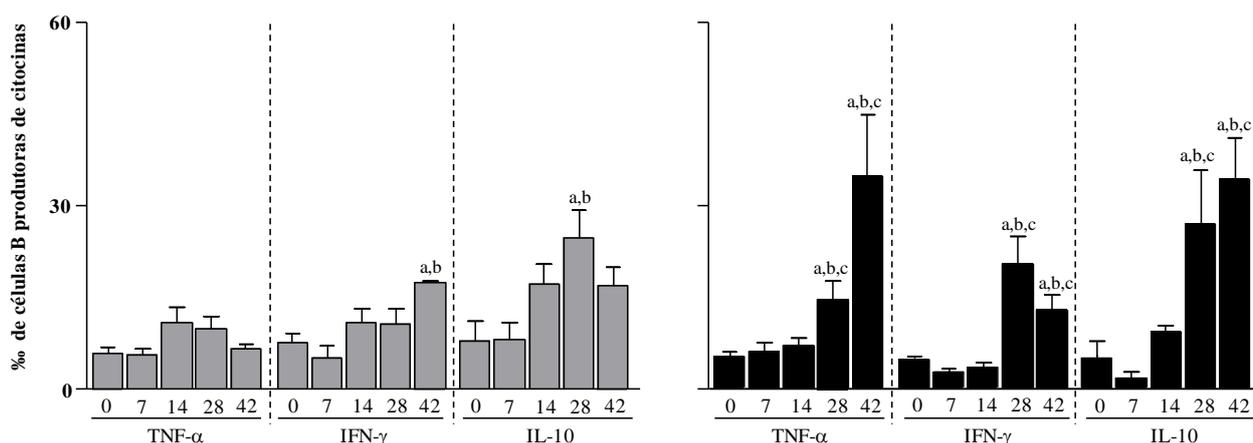


Figura 11: Percentual de células B⁺ TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, □) ou sanguíneas (TS, ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo.

b) Células CD4⁺ e CD8⁺

A Figura 12 apresenta os resultados percentuais de células CD4⁺ e CD8⁺ TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Ao avaliar o percentual das células CD4⁺ e CD8⁺ TNF- α ⁺ na infecção por formas TM ou TS verificou-se perfis distintos. No grupo TM foi observado um aumento no 14^o, 28^o e 42^o DAI de células CD8⁺TNF- α ⁺ e no 28^o DAI de células CD4⁺TNF- α ⁺. Ao contrário do observado anteriormente para as células NK, verificou-se um aumento de células T TNF- α ⁺ nos animais do grupo TS no 7^o DAI, sendo mantido esse aumento para células CD8⁺TNF- α ⁺ no 28^o e 42^o DAI, demonstrando deste modo, que na infecção por formas TS há um aumento preferencial de TNF- α por células CD8⁺.

Não foram observadas alterações no percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ nos animais do grupo TM, porém para os animais do grupo TS ocorreu uma diminuição na percentual de células CD4⁺IFN- γ ⁺ no 7^o DAI. Foi observado um aumento significativo no percentual de células CD8⁺IFN- γ ⁺ no 14^o e 28^o DAI para o grupo TM, e apenas no 28^o e 42^o DAI para o grupo TS, demonstrando assim um aumento precoce de células de CD8⁺IFN- γ ⁺ nos animais infectados por formas TM.

Em relação à citocina imunomoduladora IL-10 observou-se percentual elevado de células CD4⁺ e CD8⁺ IL-10⁺ em ambos os grupos. No grupo TM este aumento ocorreu no 28^o e 42^o DAI para as células CD4⁺ e no 14^o, 28^o e 42^o DAI para as células CD8⁺. Entretanto, nos animais do grupo TS houve uma redução no percentual de células CD4⁺IL-10⁺ no 7^o DAI, ocorrendo um aumento no percentual dessas células apenas a partir do 28^o DAI. Também foi observada uma diminuição no percentual de células CD8⁺IL-10⁺ no 7^o DAI nos animais desse grupo, porém já a partir do 14^o houve um aumento no percentual de células CD8⁺ IL-10⁺ nesse mesmo grupo.

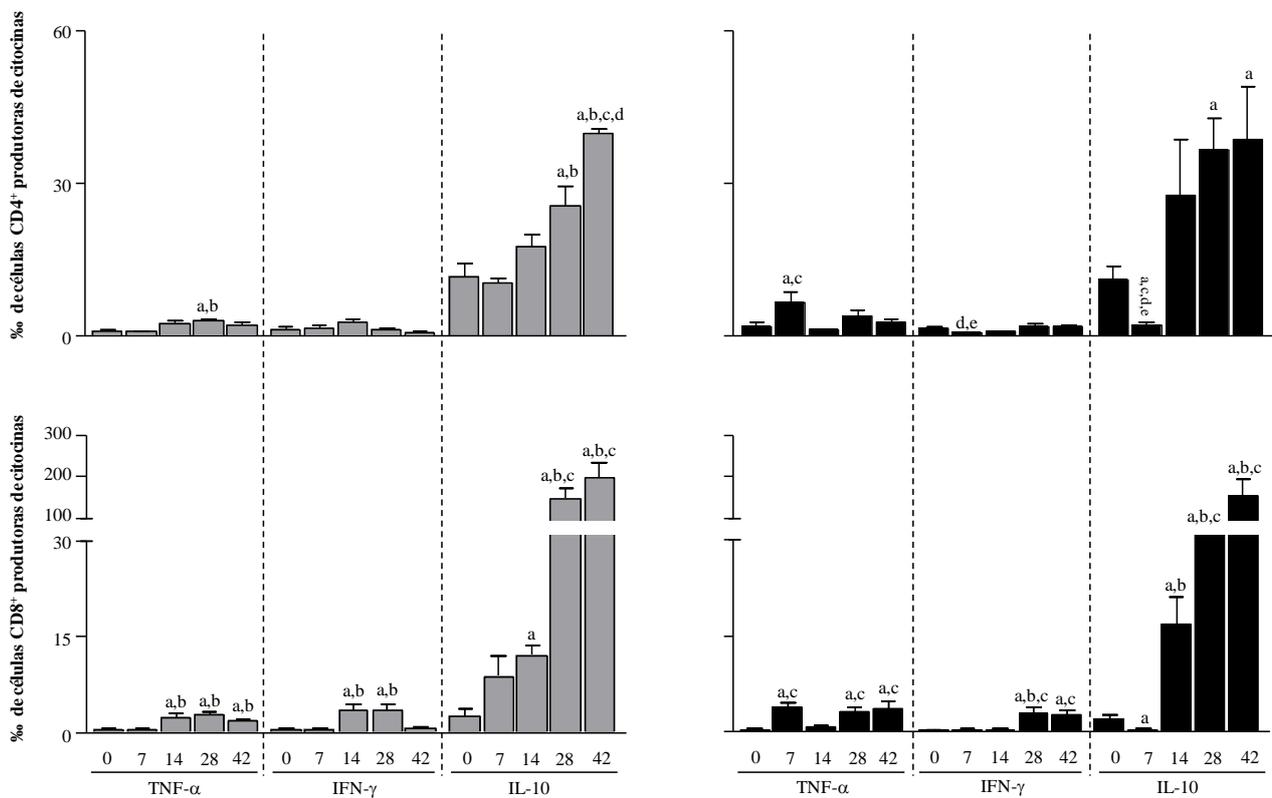


Figura 12: Percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ TNF-α⁺, IFN-γ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, □) ou sanguíneas (TS, ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa (p < 0,05) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo.

5.5 - Análise do balanço entre as citocinas

Considerando a hipótese geral de que um bom equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e IL-10 é mais relevante do que uma mudança em direção a um padrão polarizado de citocinas Th1 ou Th2, foi realizada a caracterização do equilíbrio geral de citocinas pró-inflamatórias e IL-10 produzidas por células mononucleares do baço em cada animal infectado por formas TM ou TS. Esta estratégia permite a caracterização do perfil de citocinas resultantes dessas células durante a infecção por diferentes formas infectantes. Para estabelecer os dados de citocinas⁺, os resultados foram transformados, como proposto por Vitelli-Avelar *et al.* (2008). Essa estratégia consiste em uma plataforma de 4 etapas, que inclui: (i) estabelecimento de animais com perfil "baixo" ou "alto" produtor de citocinas, sendo considerado para cada população de células citocinas⁺ todo o conjunto de valores obtidos para os grupos experimentais (TM e TS) inseridos no estudo para calcular a mediana global, sendo esta utilizada como o ponto de corte para identificar animais com perfil baixo (< mediana global) ou alto (\geq mediana global) produtor de citocinas (Figuras 13A, 14A, 15A e 16); (ii) a construção de diagramas de cor com os dados referentes as categorias supracitadas, empregando cores específicas para designar baixo produtor (\square), alto produtor de citocinas inflamatórias (\blacksquare) e alto produtor de citocinas reguladoras (\square) para cada população leucocitária avaliada para cada grupo experimental (TM e TS) (Figuras 13B, 14B, 15B e 17); (iii) elaboração do "balanço de citocinas", os dados obtidos nos diagramas de cor foram empregados para definir o balanço de citocinas para cada população celular, definindo quatro categorias de acordo com o predomínio de animais com perfil baixo produtor, alto produtor de citocinas inflamatórias, alto produtor de citocinas reguladoras e perfil misto (\blacksquare) em situações de equivalência entre alto produtor de citocinas inflamatórias e reguladoras, e (iv) a montagem do balanço global de citocinas calculado para a população total de leucócitos o perfil global de citocinas representando a proporção do balanço de citocinas predominantes compilando os perfis individuais inflamatórios, regulatórios ou mistos de todas as populações avaliadas (Figuras 13B, 14B, 15B e 17).

5.5.1- Resposta imune inata

a) Células NK

A análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 nas populações de células NK está representada na Figura 13. Essa análise demonstrou que há um predomínio de um perfil alto produtor de citocinas inflamatórias por células NK no 14^o e 28^o DAI nos animais do grupo TM. Entretanto, para a citocina IL-10 há um predomínio de animais com perfil de células NK com alta produção desta citocina ao longo da fase aguda. Nos animais do grupo TS foi observado uma prevalência de animais com perfil de alto produtor precoce da citocina TNF- α no 7^o DAI, porém o mesmo perfil não foi observado para a citocina IFN- γ , demonstrando que só ocorre alta produção de IFN- γ mais tardiamente nos animais desse grupo (Figura 13A).

No balanço das citocinas TNF- α /IL-10 foi observado um perfil misto para os animais do grupo TM do 7^o ao 28^o DAI, transformando-se em um perfil modulado no 42^o dia. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o DAI observou-se um perfil 100% inflamado nesses animais, havendo uma mudança para um perfil de baixo produtor destas citocinas por células NK no 14^o DAI, período próximo ao pico máximo de parasitemia. No 28^o e 42^o dia esses animais apresentaram um perfil predominantemente misto (Figura 13B).

Ao se realizar o balanço das citocinas IFN- γ /IL-10, os animais do grupo TM apresentaram um perfil semelhante ao observado no balanço de TNF- α /IL-10, com um perfil misto no 14^o e 28^o DAI e no 42^o dia com um perfil imunomodulado. Entretanto, para os animais do grupo TS no 7^o e 14^o DAI há uma baixa produção de ambas as citocinas IFN- γ e IL-10, caracterizando um perfil inflamado apenas a partir do 28^o DAI o que confirma a produção tardia de IFN- γ nesse grupo (Figura 13B).

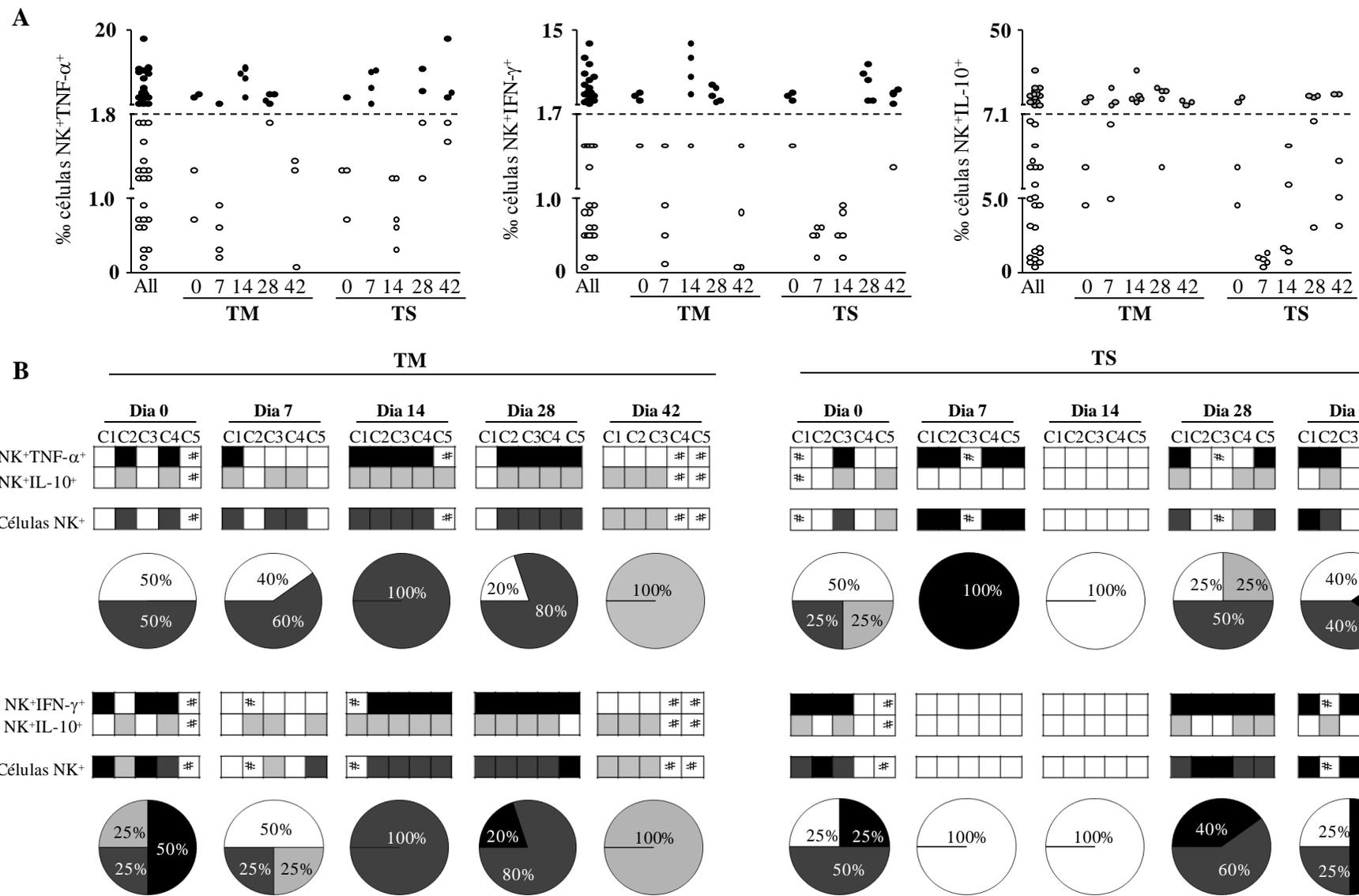


Figura 13: Análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em células NK no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. A) Gráficos de dispersão utilizados para identificar o camundongo com perfil de baixo produtor (□), alto produtor de citocinas inflamatórias (■) e alto produtor de citocina reguladora (□). Essas graduações foram definidas com base na mediana global de citocinas (---) obtidas para toda a população estudada. B) Esquemas de cores foram usados para representar o perfil de citocinas e do balanço de citocinas produzidas pelas células NK, além do equilíbrio global de citocinas, com destaque para o predomínio de perfil baixo produtor de citocinas (□); alto produtor de citocinas γ (■); alto produtor de IL-10 (□) ou perfil misto de citocinas (■). Os gráficos de pizza representam a percentagem de animais que apresentaram determinado perfil. C1 a C5 = número do camundongo. # = não detectado.

b) Macrófagos

A análise do perfil das citocinas TNF- α e IL-10 nas populações de células Mac-3⁺ está representada na Figura 14. Essa análise demonstrou que há um predomínio de um perfil alto produtor da citocina TNF- α por células Mac-3⁺ no 28^o DAI nos animais do grupo TM. O mesmo padrão foi observado para a citocina IL-10 nos animais desse grupo. Nos animais do grupo TS foi observado uma prevalência de um perfil alto produtor das citocinas TNF- α e IL-10 por células Mac-3⁺ no 28^o e 42^o DAI (Figura 14 A).

No balanço das citocinas TNF- α /IL-10 foi observado um perfil baixo produtor para os animais do grupo TM do 7^o e 14^o DAI, transformando-se em um perfil misto no 28^o dia, sendo que no 42^o DAI a maioria dos animais apresentaram novamente um perfil de baixo produtor dessas citocinas. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o DAI observou-se um perfil com 100% dos animais apresentando um perfil de baixo produtor de citocinas, havendo uma mudança para um perfil misto destas citocinas no 14^o, 28^o e 42^o DAI (Figura 14B).

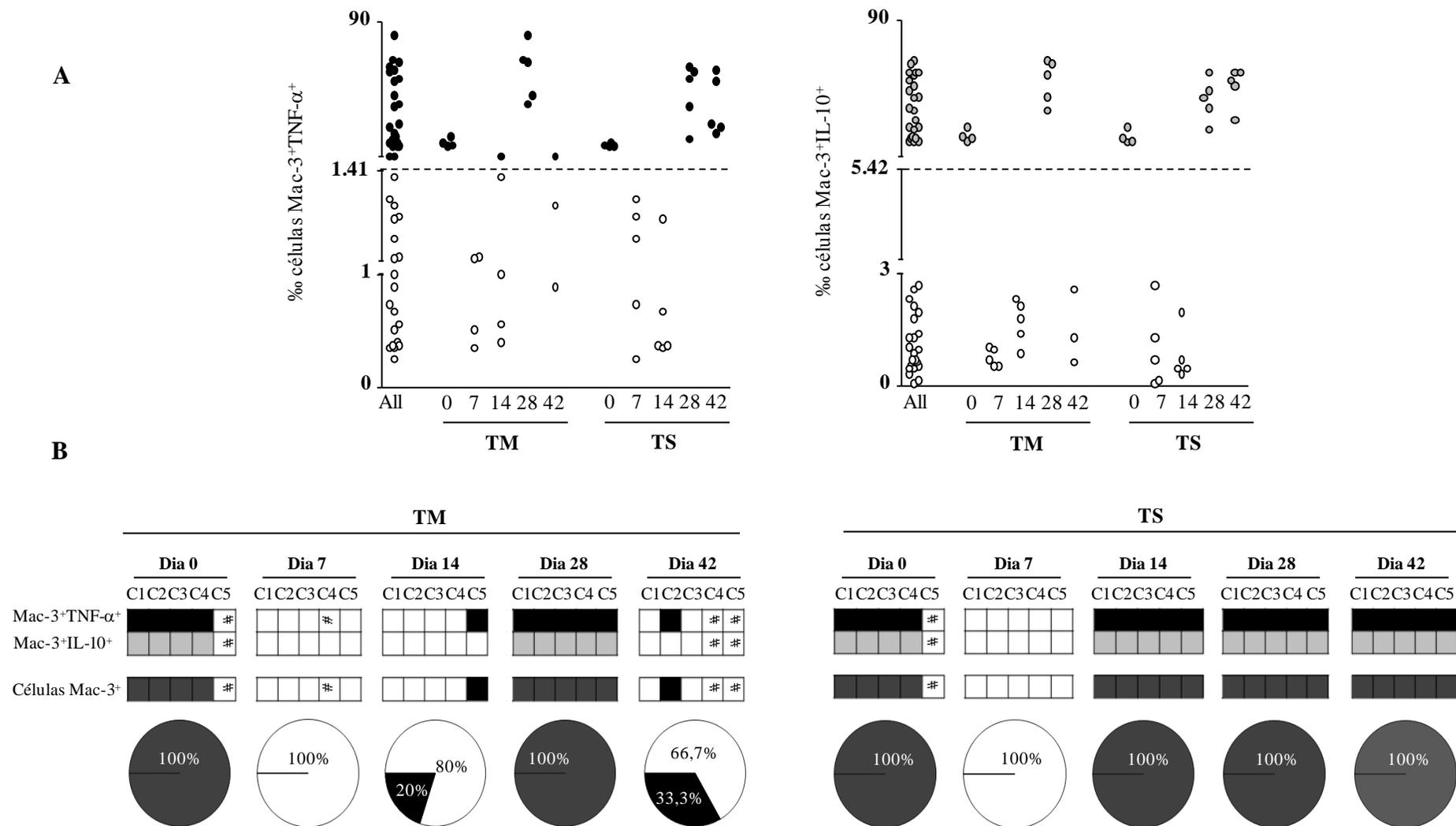


Figura 14: Análise do perfil das citocinas TNF- α e IL-10 nas células Mac-3⁺ no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. A) Gráficos de dispersão utilizados para identificar camundongo com perfil baixo produtor (\square), alto produtor de citocinas inflamatórias (\blacksquare) e alto produtor de citocina reguladora (\square). Essas graduações foram definidas com base na mediana global de citocinas (- - -) obtidas para toda a população estudada. B) Esquemas de cores foram usados para representar o perfil de citocinas e do balanço de citocinas produzidas pelas células B, além do equilíbrio global de citocinas, com destaque para o predomínio de perfil baixo produtor de citocinas (\square); alto produtor de citocinas inflamatórias (\blacksquare); alto produtor de IL-10 (\square) ou perfil misto de citocinas (\blacksquare). Os gráficos de pizza representam a porcentagem de animais que apresentaram determinado perfil. C1 a C5 = número do camundongo. # = não detectado.

5.5.2 - Resposta imune adquirida

a) Linfócitos B

A análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 na população de linfócitos B está representada na Figura 15. Foi observado um predomínio de um perfil alto produtor da citocina TNF- α no 14^o e 28^o DAI nos animais do grupo TM. Observou-se o mesmo padrão ao se analisar as citocinas IFN- γ e IL-10, com um predomínio de um perfil alto produtor dessa citocina por células B no 14^o, 28^o e 42^o DAI. Por outro lado, nos animais do grupo TS observou-se uma prevalência de células com perfil alto produtor das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 apenas no 28^o e 42^o DAI, demonstrando que só ocorre alta produção dessas citocinas por células B mais tardiamente nos animais desse grupo, ao contrário do que foi observado pelas células da resposta imune inata (Figura 15A).

No balanço das citocinas TNF- α /IL-10 foi observado um predomínio do perfil misto para os animais do grupo TM no 14^o e 28^o DAI, transformando-se em um perfil predominantemente modulado no 42^o dia. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o e 14^o DAI observou-se que 60% dos animais apresentaram um perfil de baixo produtor de citocinas, estando os outros 40% com perfil inflamatório, demonstrando assim uma tendência ao desenvolvimento do perfil inflamatório nesses animais. No 28^o e 42^o dia esses animais apresentaram um perfil predominantemente misto (Figura 15B).

No balanço das citocinas IFN- γ /IL-10 foi observado uma predominância do perfil misto para os animais do grupo TM no 14^o, 28^o e 42^o DAI. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o e 14^o DAI observou-se 100% e 60% dos animais com um perfil de baixo produtor de citocinas, respectivamente. No 28^o e 42^o dia esses animais apresentaram um perfil predominantemente misto (Figura 15B).

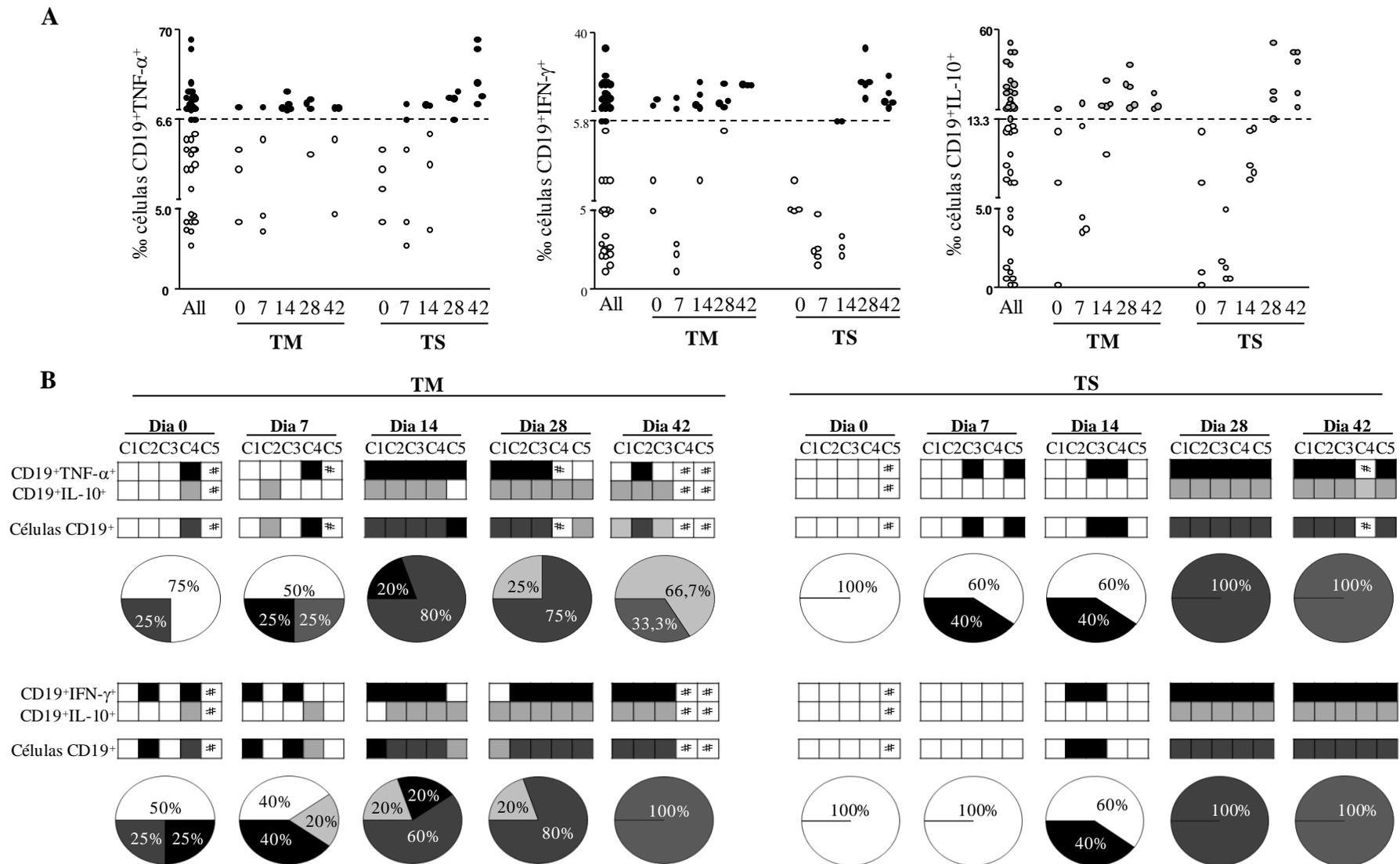


Figura 15: Análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 dos Linfócitos B no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. A) Gráficos de dispersão utilizados para identificar camundongo com perfil baixo produtor (\square), alto produtor de citocina inflamatória (\blacksquare) e alto produtor de citocina reguladora (\square). Essas graduações foram definidas com base na mediana global de citocinas (- -) obtidas para toda a população estudada. B) Esquemas de cores foram usados para representar o perfil de citocinas e do balanço de citocinas produzidas pelas células B, além do equilíbrio global de citocinas, com destaque para o predomínio de perfil baixo produtor de citocinas (\square); alto produtor de citocina inflamatória (\blacksquare); alto produtor de IL-10 (\square) ou perfil misto de citocinas (\blacksquare). Os gráficos de pizza representam a percentagem de animais que apresentaram determinado perfil. C1 a C5 = número do camundongo. # = não detectado.

b) Células CD4⁺ e CD8⁺

A análise do perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 nas células CD4⁺ e CD8⁺ está apresentada na Figura 16. A análise demonstrou que há um predomínio de animais com um perfil alto produtor da citocina TNF- α no 14^o, 28^o e 42^o DAI nos animais do grupo TM, o mesmo padrão observado para os linfócitos B. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o DAI observou-se um padrão com 100% dos animais com perfil de alto produtor de TNF- α , havendo uma troca para um perfil de baixo produtor dessa citocina no 14^o DAI, período próximo ao pico máximo de parasitemia. No 28^o e 42^o DAI esses animais apresentam novamente um perfil alto produtor dessa citocina por ambas as células CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 16A).

Ao realizar a mesma análise para a citocina IFN- γ nos animais do grupo TM observou-se uma prevalência de células CD4⁺ e CD8⁺ com perfil de alto dessa citocina no 14^o e 28^o DAI, entretanto ao contrário do observado para a citocina TNF- α , no 42^o DAI esses animais apresentam um perfil de baixo produtor de citocina IFN- γ . Nos animais do grupo TS o perfil de alto produtor de IFN- γ só aconteceu a partir do 28^o DAI, reforçando o que foi encontrado na análise das células da resposta imune inata onde a produção dessa citocina também é tardia (Figura 16B).

Em relação à citocina IL-10, em ambos os grupos experimentais é observado um perfil de alto produtor a partir do 14^o DAI por células CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 16C).

No balanço das citocinas TNF- α /IL-10 foi observado uma predominância do perfil misto para os animais do grupo TM no 14^o, 28^o e 42^o DAI. Perfil distinto foi observado nos animais do grupo TS, onde no 7^o DAI observou-se um perfil com 100% dos animais com perfil inflamatório, demonstrando assim uma tendência a inflamar precocemente nesses animais. Porém, no 14^o dia a infecção por formas TS ocasiona um perfil de alta produção para IL-10, com 100% dos animais apresentando um perfil imunomodulado. No 28^o dia esses animais apresentaram um perfil de predominantemente misto, sendo que no 42^o, 66,7% desses animais apresentam novamente uma alta produção de IL-10 (Figura 17).

A análise do balanço das citocinas IFN- γ /IL-10 mostrou que os animais do grupo TS apresentam uma baixa produção dessas citocinas no 7^o DAI, transformando-se em um perfil misto no fim da fase aguda. Enquanto que os animais do grupo TM apresentaram um perfil de alta produção de IL-10 no 42^o DAI.

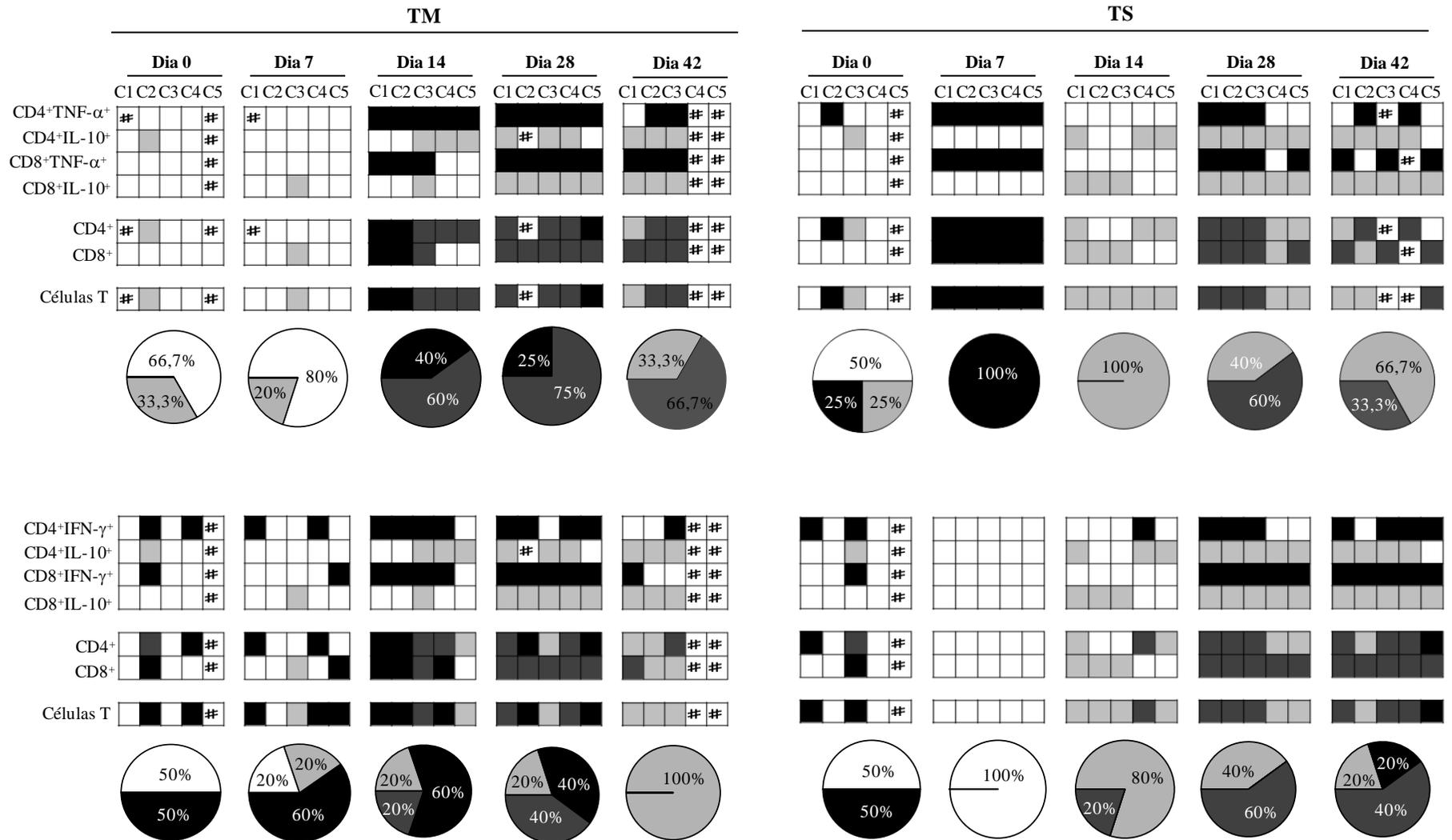


Figura 17: Perfil de citocinas produzidas pelas células CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. Esquemas de cores foram usados para representar o perfil de citocinas e do balanço de citocinas na população de células T, além do equilíbrio global de citocinas com células T, com destaque para o predomínio de perfil baixo produtor de citocinas (□); alto produtor de TNF- α e IFN- γ (■); alto produtor de IL-10 (□) ou perfil misto de citocinas (■). Os gráficos de pizza representam a percentagem de animais que apresentam determinado perfil para as células T. C1 a C5 = número do camundongo. # = não detectado.

5.6 - Alterações histopatológicas cardíacas

O impacto da infecção por formas TM ou TS também foi verificado sobre as alterações histopatológicas cardíacas durante a fase aguda da doença de Chagas e os resultados quantitativos e qualitativos estão apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

A análise morfométrica mostrou um aumento precoce no número de núcleos celulares no 7^o DAI no grupo TS. No 28^o e 42^o DAI, ambos os grupos apresentaram um aumento no número de núcleos celulares, entretanto observou-se uma redução do 28^o para o 42^o DAI no grupo TM (Figura 18).

Em todos os animais infectados, o infiltrado inflamatório foi predominantemente constituído de células mononucleadas (Figura 19), a maioria com morfologia de linfócitos. A partir do 28^o DAI foi possível observar uma maior destruição do tecido cardíaco, caracterizado por aumento do espaçamento entre as fibras musculares, em ambos os grupos experimentais.

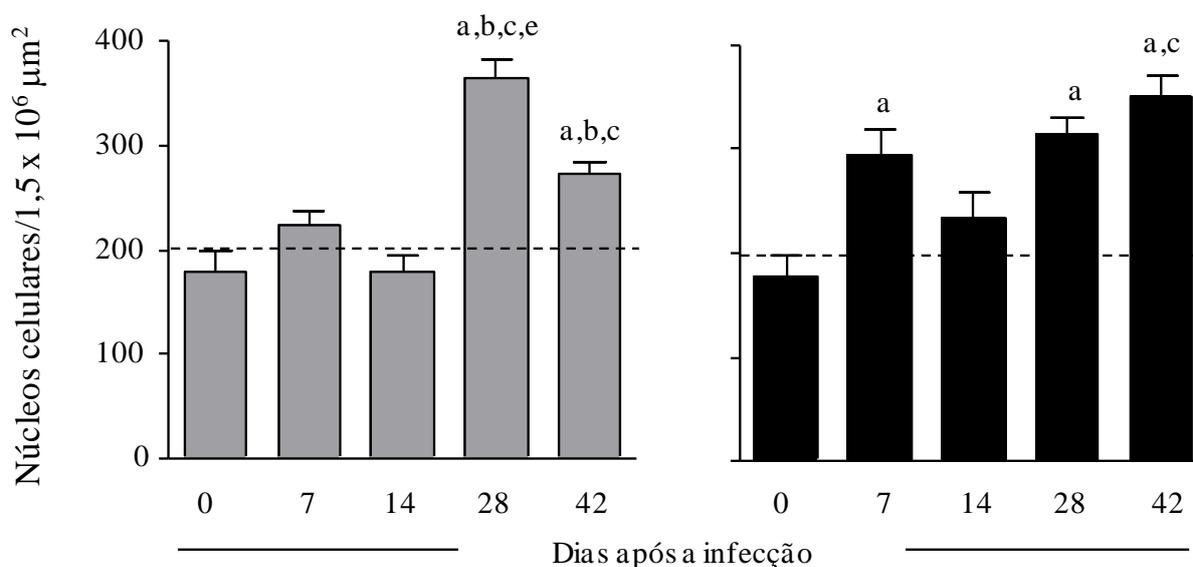


Figura 18: Quantificação de núcleos celulares no músculo cardíaco de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, □) ou sanguíneas (TS, ■) da cepa Be-78 do *T. cruzi* avaliados ao longo da fase aguda da infecção. “a”, “b”, “c”, “d” e “e” representam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao período que antecedeu a infecção (0) e aos 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados ($n=25$).

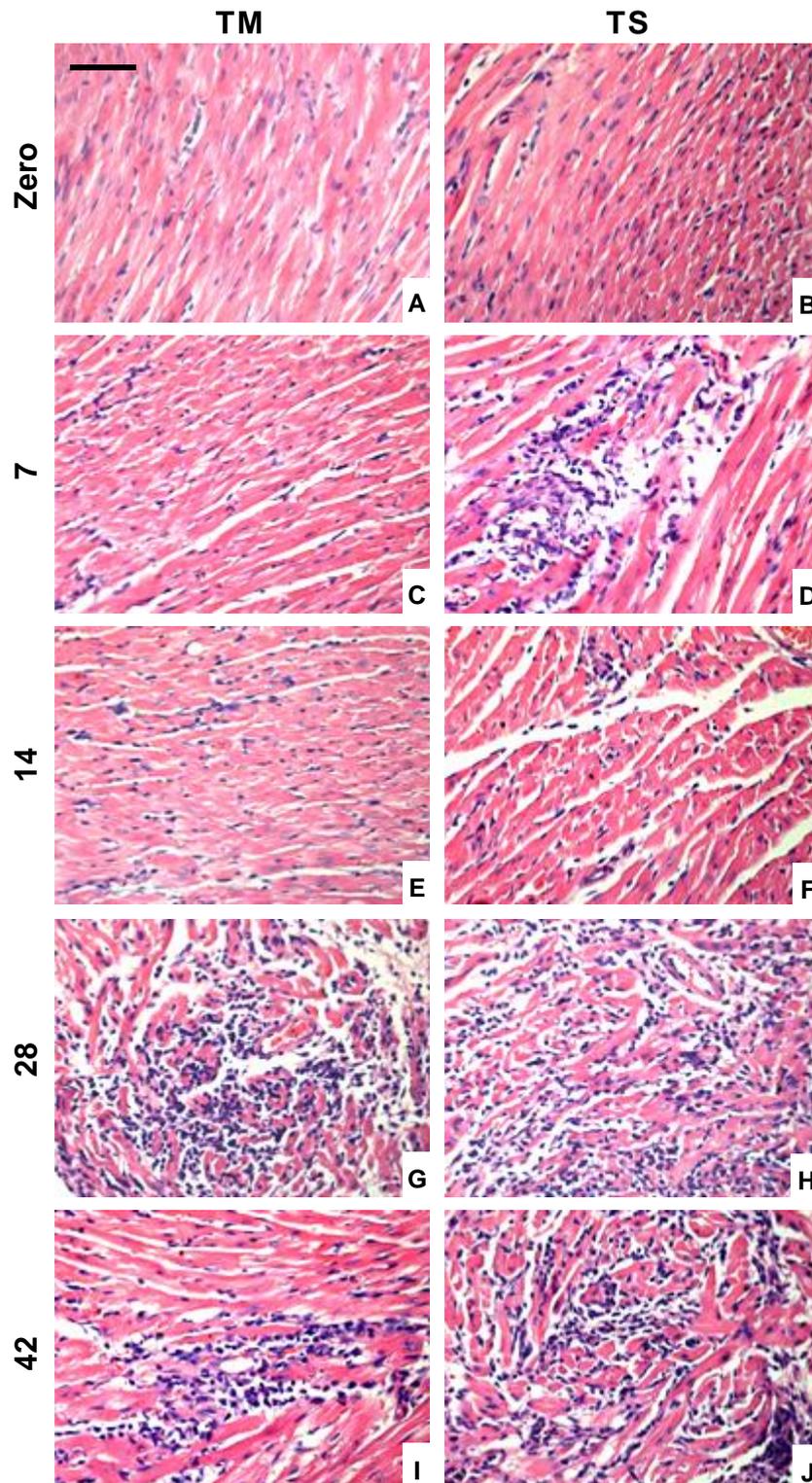


Figura 19: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos antes e 7, 14, 28 e 42 dias após a infecção com formas tripomastigostas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. (A e B) aspecto histológico cardíaco normal em animais não-infectados (dia zero); aspecto histológico normal ao 7 (C) e 14 (E), infiltrado inflamatório intenso em 28 (G) e moderado em 42 dias após a infecção (I) no grupo TM; infiltrado inflamatório moderado aos 7 (D), discreto aos 14 (F) e intenso aos 28 (H) e 42 (J) dias após a infecção no grupo TS. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm.

5.7 - Alterações histopatológicas esplênicas

As alterações histopatológicas esplênicas durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos por formas TM ou TS do *T. cruzi* estão apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22.

A análise da polpa branca demonstrou que os dois grupos experimentais não apresentaram nenhuma alteração nesta região no 7^o DAI. Entretanto, no 14^o DAI os animais do grupo TM apresentaram hiperplasia moderada da polpa branca que se manteve em 80% e 100% dos animais no 28^o e 42^o DAI, respectivamente. Os animais do grupo TS apresentaram uma intensa hiperplasia da polpa branca em 40% e 100% no 28^o e 42^o DAI, respectivamente.

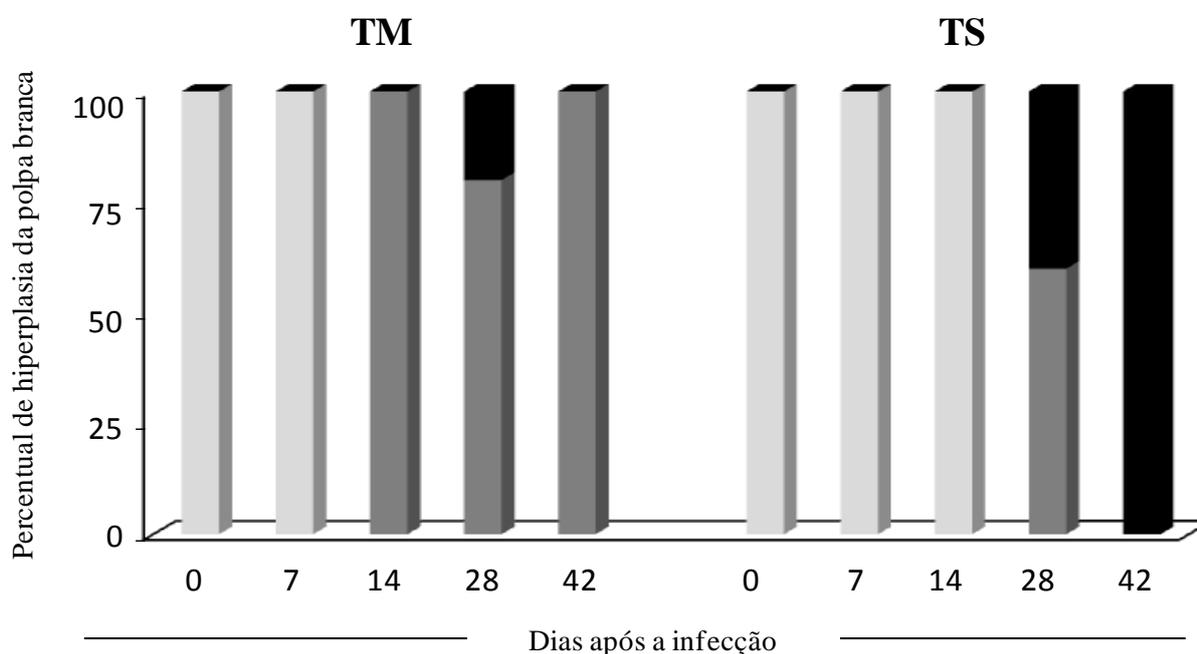


Figura 20: Hiperplasia da polpa branca do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados ao longo da fase aguda da infecção (0, 7, 14, 28 e 42 dias). □ = Polpa branca normal; ■ = polpa branca com moderada hiperplasia; ■ = polpa branca com intensa hiperplasia. Valores estão expressos em porcentagem (n = 5 cinco camundongos por grupo em cada tempo).

A análise de células inflamatórias na trabécula demonstrou que os animais do grupo TM não apresentaram alteração nessa região até o 28^o DAI. Entretanto, no 42^o dia 60% dos animais desse grupo apresentaram inflamação trabecular. Já os animais do grupo TS, apresentaram 60% de inflamação na trabécula no 7^o dia. No 14^o dia não ocorre inflamação desse tipo em nenhum dos animais avaliados nesse grupo. Porém, no 28^o e 42^o DAI a inflamação trabecular foi detectada em 20% e 80% dos animais, respectivamente.

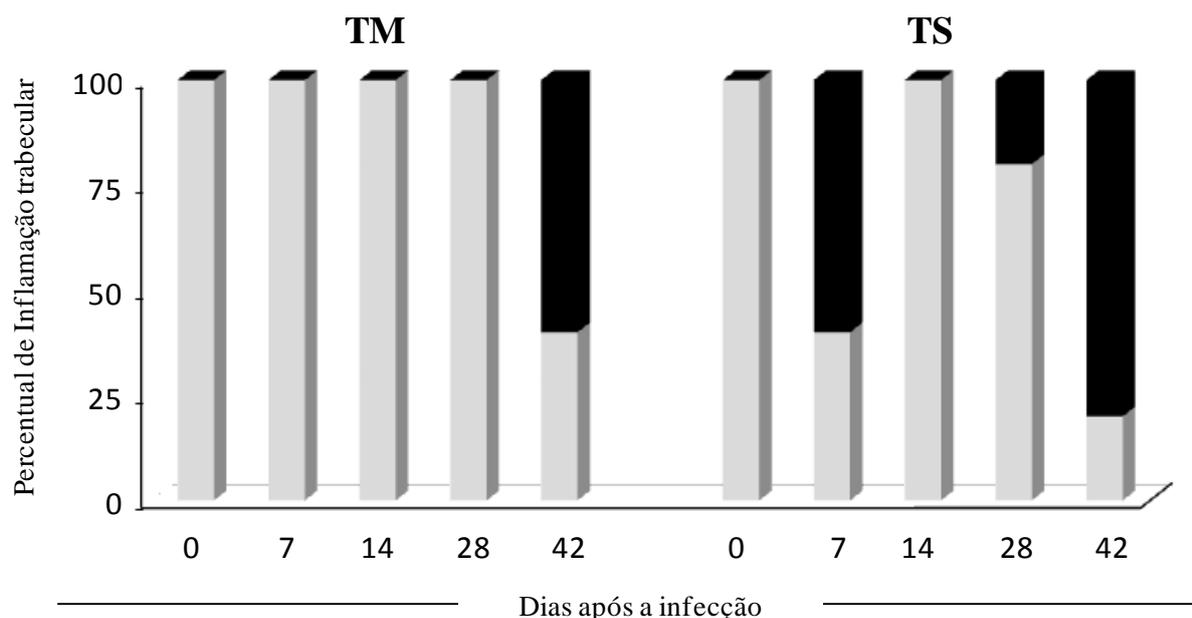


Figura 21: Inflamação trabecular no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados ao longo da fase aguda da infecção (0, 7, 14, 28 e 42 dias). □ = trabécula normal e ■ = trabécula inflamada. Valores estão expressos em porcentagem. Valores estão expressos em porcentagem (n = 5 cinco camundongos por grupo em cada tempo).

A análise da cápsula esplênica demonstrou que os animais do grupo TM não apresentaram alteração nesta região até o 14^o DAI. Entretanto, no 28^o DAI, 40% dos animais apresentaram um espessamento da mesma e 20% apresentaram espessamento e inflamação na cápsula. No 42^o DAI 100% dos animais do grupo TM apresentaram espessamento e inflamação capsular. Nos animais do grupo TS foram observadas alterações no 7^o dia, sendo que 20% apresentaram apenas espessamento e 40% espessamento com inflamação. No 14^o DAI, assim como observado na trabécula, não ocorreu nenhuma alteração na cápsula dos baços dos animais no grupo TS, sendo observado um aumento progressivo no espessamento e inflamação dessa região no 28^o e 42^o DAI.

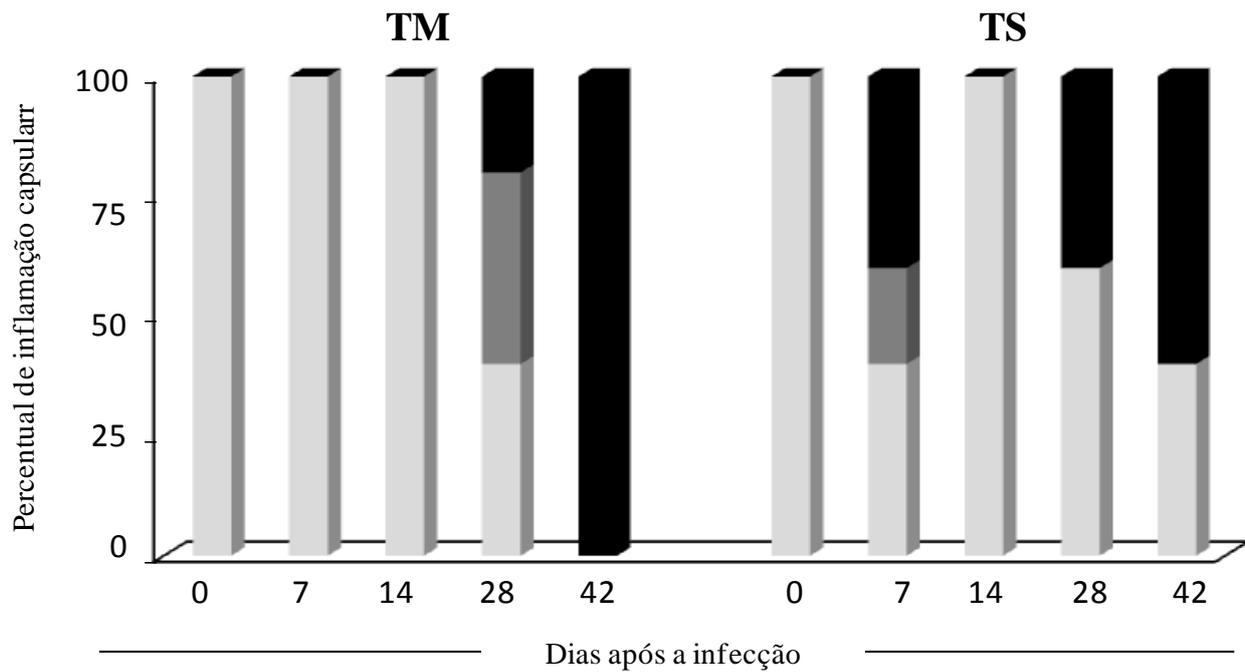


Figura 22: Inflamação e espessamento capsular do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados ao longo da fase aguda da infecção (0, 7, 14, 28 e 42 dias). □ = Cápsula normal; ■ = Cápsula com espessamento; ■ = Cápsula com espessamento e inflamação. Valores estão expressos em porcentagem (n = 5 cinco camundongos por grupo em cada tempo).

6.0 Discussão

Este trabalho relata uma investigação cinética das principais alterações na resposta imunológica em camundongos infectados experimentalmente por formas metacíclicas ou sanguíneas do *T. cruzi*. As duas formas infectantes do parasito são conhecidas por apresentarem características distintas que induzem diferentes respostas imunológicas *in vitro* (Brenner e Gazzinelli, 1997). A infecção mediada por formas TM pode, em parte, simular aquela causada por vetores. Por outro lado, a infecção *in vivo* com formas TS simula as formas de transmissão sanguínea ou até mesmo acidentes de laboratório. Vale ressaltar que a maioria das infecções experimentais são realizadas utilizando formas tripomastigotas sanguíneas, porque estas são de obtenção e manutenção mais fácil em laboratório. Além disso, o recente aumento nos casos de transmissão sanguínea em países não endêmicos torna relevante a compreensão da interação parasito-hospedeiro nestas condições, comparativamente a infecção por TM.

A cepa escolhida para execução dos experimentos foi a cepa Berenice-78, constituída predominantemente por formas largas. Essa cepa persiste por um tempo maior no sangue periférico, sendo, portanto, mais resistente aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e apresenta tropismo por células musculares (Brenner, 1969).

A parasitemia e a mortalidade foram avaliadas em camundongos infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* ao longo da fase aguda. Embora, em ambos os grupos tenha sido observado 0% de mortalidade, verificou-se maior período pré-patente, pico de parasitemia mais tardio bem como menores níveis de parasitemia nos animais do grupo TM em relação aos animais do grupo TS. Estes dados sugerem que a interação parasito/célula hospedeira ocorre de forma distinta, dependendo da fonte do inóculo, semelhante ao observado anteriormente por nosso grupo em cães também infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi* (Carneiro *et al.*, 2007). Portanto, independente do modelo utilizado, a fonte do inóculo mostra-se como um fator relevante a ser considerado no curso da infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo um impacto diferencial da fonte do inóculo no desenvolvimento da fase aguda da doença de Chagas

Florencio-Martinez *et al.* (2010) demonstraram que após infecção *in vitro* de fibroblastos com formas TS, amastigotas e epimastigotas, o ciclo replicativo do parasito ocorre de forma mais rápida na infecção realizada com TS e epimastigotas. Neste trabalho, os níveis de parasitemia maiores e mais precoces observados no grupo TS podem estar relacionados ao fato de que as formas sanguíneas, mas não as metacíclicas, apresentam normalmente associadas à sua membrana imunoglobulinas anti-*T. cruzi*, o que poderia

favorecer a entrada dessa forma infectiva em um número maior de células alvo levando a uma interação mais precoce parasito-hospedeiro, permitindo sua liberação mais rapidamente na circulação do hospedeiro vertebrado.

A infecção aguda de camundongos pelo *T. cruzi* leva a uma forte ativação da resposta imune inata e adaptativa, representando um exemplo bem documentado de um processo infeccioso sistêmico. O conhecimento das populações celulares presentes no sangue periférico constitui uma das melhores formas de avaliação da resposta imune, por que permite acompanhar, ao longo do tempo, a evolução da doença. No caso da doença de Chagas, este acompanhamento permite compreender os múltiplos fatores relacionados ao curso da doença, possibilitando a elaboração de hipóteses que expliquem os mecanismos envolvidos na amplificação/manutenção de determinadas lesões.

No presente estudo, foram realizados o hemograma e imunofenotipagem das células do sangue periférico para avaliar as diferentes mudanças nesse compartimento, causadas pela infecção por formas metacíclicas ou sanguíneas ao longo da fase aguda da doença. Verificou-se um aumento tardio dos leucócitos no sangue periférico dos animais do grupo TM, enquanto que em animais infectados por formas sanguíneas este aumento foi precoce (7^o DAI), sendo também observado no 42^o DAI. Esses dados mostram perfis distintos entre as duas infecções sendo esta unimodal em TM e bimodal em TS, sugerindo que as formas metacíclicas infectam as células do hospedeiro de uma forma silenciosa, e por isso o aumento no número de leucócitos só ocorre tardiamente, quando a infecção já está devidamente estabelecida. Por outro lado, as formas sanguíneas imediatamente infectam as células do hospedeiro e, conseqüentemente, levam a uma multiplicação do parasito mais precoce, como constatado na curva de parasitemia, bem como alterações sanguíneas mais precoces.

Curiosamente, apenas os animais do grupo TM apresentaram um aumento de eosinófilos ao longo da fase aguda. Nakle *et al.* (1989) observaram que camundongos suscetíveis infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, apresentaram uma diminuição de eosinófilos na medula óssea e no sangue periférico. Por outro lado, em camundongos resistentes a infecção, o mesmo fenômeno não foi observado, sugerindo uma maior capacidade de eosinopoiese após a infecção nesses camundongos, o que poderia contribuir para sua maior resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, Rowland & Sibley-Phillips (1988) constataram que o maior número de eosinófilos na medula óssea de camundongos resistentes coincide com o pico de parasitemia (28^o DAI). Com base nestes resultados, pode-se inferir que a menor parasitemia encontrada em animais infectados com as formas TM poderia também estar relacionada ao aumento de eosinófilos no sangue periférico coincidente com o

pico de parasitemia neste grupo, o que ajudaria na atividade tripanomicida. Vale ressaltar que no grupo TS não foram encontrados eosinófilos ao longo da fase aguda semelhante ao verificado em animais não infectados também acompanhados pelo mesmo período (dados não mostrados).

Apesar da importância dos eosinófilos ter sido demonstrada nos anos 80, existem poucos estudos recentes envolvendo a participação dessas células na doença de Chagas. Nascentes *et al.* (2010) ao avaliarem a participação dos eosinófilos no dano tecidual em camundongos infectados pelas cepas VIC e JG do *T. cruzi*, também observaram um maior número de eosinófilos coincidente com o pico de parasitemia em ambas as cepas utilizadas. Além disso, o número de eosinófilos no tecido cardíaco foi menor em relação ao tecido muscular esquelético. No presente estudo, embora tenha sido observado um aumento de eosinófilos circulantes no grupo TM, estas células não foram observadas no infiltrado inflamatório cardíaco desses animais. Portanto, aparentemente, estas células estão relacionadas ao controle da parasitemia. Posteriormente, será avaliado o infiltrado inflamatório muscular esquelético, bem como o parasitismo tecidual cardíaco e esquelético.

Na análise fenotípica das células mononucleares do sangue periférico, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que houve uma redução nas células CD4⁺ e CD8⁺ no 7^o DAI nos animais infectados pelas formas TS. Provavelmente, essa queda reflete o recrutamento dessas células para coração, o que é corroborado pelos resultados da avaliação inflamatória nesse órgão que mostrou uma migração precoce de células mononucleares com padrão predominantemente linfocitário. Padilla *et al.* (2009) relataram que a infecção inicial pelo *T. cruzi* é silenciosa e que o desencadeamento da resposta imune inata e, posteriormente, da adaptativa só ocorre após a primeira rodada de replicação do parasito com invasão de novas células (4-5 DAI). Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados de Padilla *et al.* (2009) no que diz respeito ao grupo TS. No entanto, no grupo TM, o processo ocorre de forma distinta, com alterações tardias tanto no sangue periférico quanto no coração.

A infecção pelo *T. cruzi* promove esplenomegalia em camundongos e humanos, tanto durante a fase aguda quanto crônica, e os esplenócitos são células importantes envolvidas na resposta imune do hospedeiro. A realização da esplenectomia previamente à infecção aumenta a susceptibilidade de camundongos a infecção pelo *T. cruzi*, com diminuição na produção de IFN- γ e TNF- α acompanhada de uma redução nos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* ao longo da infecção (Maioli, 2008; de Meis *et al.*, 2009). Além disso, Sathler-Avelar *et al.* (2003) e Kroll Palhares *et al.* (2008) relataram que a doença de Chagas induz em

humanos e em modelos experimentais alterações importantes na resposta imune celular do hospedeiro que refletem grandes alterações fenotípicas, não apenas no que diz respeito a imunidade inata, mas também no contexto da imunidade adaptativa. Com base nestes fatos, foi realizado um estudo de análise fenotípica das células da resposta inata e adaptativa no baço.

Considerando que durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, a participação dos macrófagos é fundamental, avaliou-se, no sangue periférico o percentual de monócitos, com o objetivo de verificar possíveis alterações que pudessem sugerir algum mecanismo capaz de aumentar o número ou migração dessas células. Melo & Machado (2001) observaram aumento no percentual de monócitos no 12^o DAI em ratos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Nos animais infectados por formas TS foi observado um aumento precoce (7^o DAI), o que corrobora com os resultados descritos acima, sugerindo que, durante a fase aguda recente da infecção por formas sanguíneas, ocorre a indução rápida da produção, maturação e ativação dessas células, provavelmente devido ao fato dessas formas já se encontrarem cobertas de imunoglobulinas, o que facilitaria a sua opsonização. Fato esse que não é observado na infecção por formas metacíclicas, onde o aumento de monócitos no sangue periférico só ocorre mais tardiamente. Pode-se inferir também que essas células devem migrar para o coração nos animais desse grupo, pois no 7^o DAI já é observada a presença de infiltrado inflamatório cardíaco nesses animais, sendo as primeiras células a migrarem para o órgão parasitado.

A importância das células NK na resistência observada durante a fase aguda da doença de Chagas foi demonstrada em estudos cuja neutralização de IL-12 ou IFN- γ , citocinas essenciais para ativação das células NK, bem como a depleção das mesmas foram realizadas e tornaram os animais mais susceptíveis à infecção (Aliberti *et al.*, 1996; Cardillo *et al.*, 1996; Lieke *et al.*, 2004). Assim, além da função citotóxica das células NK já bem estabelecida, acredita-se que essas células possuam um papel importante na secreção de IFN- γ antes do desenvolvimento da resposta imune mediada pelas células T na infecção pelo *T. cruzi*. No grupo TS há uma diminuição a partir do 14^o DAI no percentual de células NK no baço. Considerando que as citocinas produzidas por essas células levam a uma resposta do tipo Th1 em linfócitos T, a ausência dessas células no baço de animais infectados por formas TS explicaria o atraso na produção de IFN- γ observado nesses animais.

A infecção pelo *T. cruzi* induz alterações na resposta imune que estão relacionadas, principalmente, às células T (Sun & Tarleton, 1993), podendo ser a imunidade mediada por células a principal responsável pelo controle da doença de Chagas experimental.

Grisotto *et al.*, (2001), estudando camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, demonstraram o aumento da celularidade no baço traduzido pelo aumento das células CD4⁺ e CD8⁺ e das células B, durante a fase aguda. Durante a fase crônica recente, linfócitos CD4⁺ e B retornaram aos valores normais, enquanto que as células CD8⁺ continuaram elevadas. Entretanto, neste trabalho não foi observado alterações no percentual de células CD4⁺ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase aguda, demonstrando que em nosso modelo não há expansão das células CD4⁺ no baço, o que sugere que essas células não teriam grande participação na infecção pela cepa Be-78. Porém, em outros modelos essas células parecem desempenhar um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*. Rottenberg *et al.*, (1993) mostraram que a ausência dessas células em animais deficientes foi determinante para a proliferação de parasitos no coração. Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que apesar da importância destas células no controle da disseminação dos parasitos, elas também contribuem para a patogênese na infecção. Assim, a eliminação dessas células por anticorpos monoclonais, embora favoreça a multiplicação dos parasitos em diversos órgãos, também acarreta uma significativa redução do infiltrado inflamatório cardíaco (Russo *et al.*, 1996).

A ativação e a expansão de linfócitos T esplênicos (de Meis *et al.*, 2009) observada frente a infecção pelo *T. cruzi* só foi observada nesse trabalho, independente da forma infectante utilizada, para as células CD8⁺ ocorrendo um aumento na porcentagem dessas células no baço. Este aumento sugere a participação dessas células em eventos protetores durante a fase aguda da doença, pois as células CD8⁺ são capazes de reconhecer as moléculas do *T. cruzi* apresentadas via MHC I por células infectadas, permitindo assim a eliminação dessas células. Contudo, sabe-se que essas células podem ter um duplo papel na doença de Chagas, no controle do parasitismo intracelular e indução de danos tissulares, dependendo da fase da doença (Fuenmayor-Meza, 2000; Vitelli-Avelar *et al.*, 2005). O controle da parasitemia coincide com o aumento percentual dessas células no baço dos animais infectados por ambas as formas, sugerindo assim uma correlação direta entre as células CD8⁺ e o controle do parasitismo, fato também observado previamente no modelo cão (Carneiro *et al.*, 2007).

Além disso, resultados anteriores de outros pesquisadores têm demonstrado que as células T CD8⁺ constituem a população celular presente em maior número no tecido cardíaco

de pacientes chagásicos crônicos (Higuchi *et al.*, 1997). Desta forma, pode-se especular que, uma vez que a proliferação de células CD8⁺ no baço ocorre apenas ao final da fase aguda, essas células migrariam para o coração, se tornando o principal tipo celular encontrado nos focos inflamatórios cardíacos. Recentemente nosso grupo avaliou o fenótipo celular presente no infiltrado inflamatório cardíaco de cães infectados por formas TM ou TS no 42^o DAI, observou que independente da forma infectante utilizada houve um predomínio de células CD8⁺ no átrio direito desses animais, sendo que no septo interventricular os animais do grupo TM apresentaram maior número de células CD8⁺ do que os animais infectados por formas TS (Souza, 2010). Além disso, o processo inflamatório cardíaco, nesses mesmos animais, foi maior no grupo infectado por formas TM em relação aos animais do grupo TS (Vieira *et al.*, 2009). Confirmando assim que essa célula é encontrada em maior número no infiltrado inflamatório chagásico, e ainda que a presença dessa célula em maior número no infiltrado cardíaco teria um papel protetor, possivelmente através do controle do parasitismo tecidual, não permitindo assim que ocorresse uma exacerbação do processo inflamatório nos animais do grupo TM. Futuramente, será realizada a mesma análise fenotípica nos camundongos deste trabalho para confirmar se neste modelo também ocorre maior número de células T CD8⁺ nos animais infectados por formas metacíclicas.

Neste trabalho observou-se um aumento no percentual de linfócitos B no baço dos animais do grupo TM no 7^o DAI, não ocorrendo o mesmo fenômeno nos animais do grupo TS. Apesar de ter sido demonstrado que proteínas derivadas do *T. cruzi* são capazes de induzir a expansão de células B no baço (Acosta Rodriguez *et al.*, 2007), a contribuição dessa célula para a resistência à infecção ainda é discutida. Camundongos deficientes em células B apresentam mortalidade e parasitemia elevadas. Estudos demonstraram que anticorpos específicos a antígenos do *T. cruzi* tem um papel importante no controle da infecção (Kierszenbaum & Howard, 1976; Corsini *et al.*, 1982). Foi demonstrado que alguns anticorpos IgG são eficientes em se ligar ao complemento e eliminar o parasito (Lima-Martins *et al.*, 1985), sugerindo assim que a IgG parasito-específica é um componente importante da resposta imune no controle da doença. Por outro lado, a ativação policlonal de células B contribui para as alterações patológicas encontradas na doença de Chagas. Anticorpos auto-reativos contra o endocárdio e nervos são detectados tanto em camundongos quanto em humanos ao longo da infecção (Minoprio *et al.*, 1991; Kierszenbaum *et al.*, 2003). Deste modo, futuramente serão avaliados os níveis de imunoglobulinas séricas nesses animais para esclarecimento do papel dos linfócitos B na infecção por formas TM.

Züniga *et al.* (2000) observaram que as células B esplênicas de camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentam altas taxas de apoptose. Tendo em vista que a apoptose de células B é um mecanismo imunomodulador contra a ativação policlonal dessas células, a diminuição observada no percentual de células B esplênicas no 14^o DAI no grupo TM provavelmente se deve a uma tentativa de controlar a proliferação observada no 7^o DAI. Além disso, a redução observada em ambos os grupos no 42^o DAI seria uma tentativa de eliminação das células B ativadas, já que, nesse momento, a parasitemia está sob controle.

De maneira geral, os dois compartimentos avaliados nessa tese (sangue periférico e baço) desencadeiam respostas distintas ao longo da infecção pelas diferentes formas infectantes do *T. cruzi*. No sangue periférico a fenotipagem das células mononucleares não observou grandes alterações em nenhum dos grupos, entretanto no baço, com exceção das células CD4⁺, ocorrem alterações em todas as populações celulares avaliadas. Nesse sentido, é pode-se inferir que na infecção pelo *T. cruzi*, o baço apresenta maiores alterações em suas populações celulares quando comparado ao sangue periférico.

Uma vez estabelecido o perfil imunofenotípico durante a fase aguda da infecção experimental em camundongos pelo *T. cruzi*, o próximo passo foi avaliar o efeito da infecção por formas TM e TS sobre a produção de citocinas pelas células NK, Mac-3⁺, B, CD4⁺ e CD8⁺ nesses animais.

Interações entre as células do hospedeiro e o *T. cruzi* são críticas para o controle da parasitemia, e para o estabelecimento de um microambiente rico em citocinas que irão direcionar o desenvolvimento e posterior regulação das células T efetoras, conhecidas por serem importantes no estabelecimento da doença durante a fase crônica. Os macrófagos, uma vez estimulados por antígenos derivados de formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, podem atuar como células efetoras para uma atividade citotóxica, no caso parasiticida, com produção de metabólitos reativos de nitrogênio e oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α (Camargo *et al.*, 1997; Chandrasekar *et al.*, 1998). Entretanto, sabe-se que alguns GIPLs, extraídos da membrana celular de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, exercem função supressiva na ativação de macrófagos e células dendríticas, inibindo a secreção de TNF- α e IL-12 (Van Overtvelt *et al.*, 1999; Zambrano-Villa *et al.*, 2002). No 7^o DAI há uma diminuição de macrófagos TNF- α ⁺ e IL-10⁺ em ambos os grupos experimentais. A avaliação do balanço global de citocinas produzidas pelos macrófagos permitiu verificar que a infecção por TM parece promover imunossupressão na produção de citocinas pelos macrófagos, pois durante toda a fase aguda,

com exceção do 28^o DAI, período próximo ao pico máximo de parasitemia, há uma baixa produção de TNF- α e IL-10 por esses macrófagos. Perfil diferente é observado no grupo TS, onde após o 7^o DAI há um retorno ao perfil misto de produção de citocinas observado antes da infecção. Portanto, pode-se sugerir duas hipóteses para os animais do grupo TM: 1- ocorrência de supressão dessas células precocemente na infecção pelo *T. cruzi*, permitindo que o parasito estabelecesse a infecção, que se prolongaria nos animais do grupo TM; 2- produção da citocina IL-12, e não TNF- α e IL-10. Para esclarecer esse ponto, posteriormente será avaliada a produção de IL-12 por macrófagos.

Em relação a resposta imune adaptativa, observou-se um padrão distinto na produção de citocinas pelas células CD4⁺, CD8⁺ e B CD19⁺ nos grupos TM e TS. As células B apresentaram uma produção mais tardia (a partir do 28^o DAI) de ambas as citocinas avaliadas, sendo que no grupo TM não há alteração na produção de TNF- α por essas células ao longo da fase aguda. As células B efetoras podem influenciar diretamente na diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos T efetores através da produção de IL-4 e IFN- γ , além disso, a produção de citocinas por células B é variável, mas pode ser tão alta quanto à produção de citocinas por células CD4⁺ (Harris *et al.*, 2000). Esses mesmos autores também observaram que as células B produtoras de IFN- γ têm um importante papel na amplificação de respostas dependente de Th1 (Harris *et al.*, 2005). Nesse trabalho os linfócitos B apresentaram uma produção mais tardia de IFN- γ , porém nos animais do grupo TM a produção é mais precoce de citocinas do tipo Th1 por linfócitos T não havendo assim uma relação direta entre a produção de IFN- γ e a ativação dessas células nesse grupo. Já para os animais do grupo TS as células B parecem estar diretamente envolvidas na produção de IFN- γ , pois é somente após o aumento de células CD19⁺IFN- γ ⁺ que ocorre o aumento de células T IFN- γ ⁺.

A produção de citocinas por células CD4⁺ e CD8⁺ na infecção por formas TM, levou a uma produção precoce apenas de IFN- γ e mais tardiamente ocorreu um aumento na produção de TNF- α . O contrário foi observado na infecção por formas TS, onde inicialmente ocorreu um aumento de células CD4⁺ e CD8⁺ TNF- α ⁺, e somente mais tardiamente de IFN- γ ⁺. Sabe-se que o *T. cruzi* é um potente agente indutor da produção de TNF- α por células esplênicas *in vitro* (Tarleton *et al.*, 1988). Essa citocina além de ter um papel benéfico precocemente na infecção, também tem efeitos maléficos na fase de parasitemia patente (Truyens *et al.*, 1999). Os animais infectados por formas TS apresentaram alta produção precoce (7^o DAI) desta citocina, o que acarretou em um balanço global de citocinas de caráter

inflamatório nesse grupo. Lima *et al.* (2001) ao avaliarem a participação do TNF- α na necrose celular e na destruição de macrófagos parasitados no baço de camundongos durante a fase aguda da infecção por uma cepa macrofagotrópica do *T. cruzi*, observaram a expressão dessa citocina em áreas necrosadas dentro do centro germinativo e na polpa vermelha, sugerindo assim um papel para o TNF- α na exacerbação do dano tissular. Esse mesmo resultado também foi observado recentemente por Andrade *et al.*, (2008).

Ademais, investigações cinéticas sobre a ativação de macrófagos durante a doença de Chagas, demonstraram que macrófagos de camundongos susceptíveis a infecção produzem maiores níveis de TNF- α do que macrófagos de camundongos de linhagens resistentes (Russo *et al.*, 1989; Starobinas *et al.*, 1991). Pode-se inferir então, que a infecção por formas TS apresenta maiores danos cardíacos e esplênicos devido à alta produção precoce de TNF- α observada nesse grupo, ocorrendo uma exacerbação do processo inflamatório. Além disso, os linfócitos T CD4⁺ parecem ser induzidos a produzir TNF- α , ao invés de IFN- γ na infecção por formas TS.

Diversos estudos têm demonstrado que a citocina IFN- γ tem um efeito protetor na infecção experimental pelo *T. cruzi*, *in vivo*, levando a uma ativação macrofágica prevenindo a supressão do sistema imune e a morte desses animais ao longo da fase aguda (Reed *et al.*, 1988). Ao contrário do observado para os animais do grupo TS, os animais infectados por formas TM apresentaram uma produção precoce de IFN- γ , principalmente por células NK e CD8⁺. Devido a isso, esses animais apresentaram um perfil inflamatório que se tornou imunoregulado ao final da fase aguda, quando a parasitemia patente já estava controlada. Esses dados coincidem com a inflamação cardíaca, que tem seu pico máximo paralelo ao pico de parasitemia, entretanto quando a parasitemia já está sob controle, a mesma diminui, não havendo assim um descontrole do processo inflamatório nos animais desse grupo.

A depleção *in vivo* de células NK resultou em quase completa eliminação da produção de IFN- γ *in vitro* por esplenócitos cultivados com tripomastigotas vivas (Cardillo *et al.*, 1996). Esses resultados indicam que a produção dessa citocina precocemente e independente de células T, é um importante elemento da resposta imune inata na resistência do hospedeiro a infecção a esse parasito. No entanto, o intervalo em que o IFN- γ exerce efeito protetor na resistência do hospedeiro parece ser limitado, sobretudo, para a fase mais precoce da infecção aguda, como mostrado a partir de experimentos cinéticos com a administração de IFN- γ ou de anticorpos anti-IFN- γ . Com base nessas observações tem sido sugerido que o IFN- γ produzido na fase tardia da infecção aguda pode não ser relevante para

proteção, como o observado nos animais do grupo TS, que apresentaram uma produção tardia dessa citocina, quando o processo inflamatório já se encontrava exacerbado.

Nesse sentido, os animais que foram infectados por formas TM apresentaram um perfil inflamatório no início da infecção, mas foram capazes de estabelecer uma resposta imunoreguladora que foi acompanhada pela diminuição da inflamação cardíaca no final da fase aguda, quando a parasitemia já estava sob controle. O contrário foi observado nos animais do grupo TS, em relação ao balanço das citocinas IFN- γ /IL-10, pois esses animais não apresentaram um perfil inflamatório precoce na infecção, e embora ocorra uma alta produção de IL-10 no final da fase aguda, há uma exacerbção do processo inflamatório cardíaco neste grupo.

A infecção de camundongos nocautes para IL-10 pelo *T. cruzi* causa uma resposta pró-inflamatória sistêmica com um dano tecidual diretamente ligado a expressão de TNF- α , similar ao choque séptico, sendo que esses animais apresentam 100% de mortalidade na fase aguda (Holscher *et al.*, 2000). Esses resultados corroboram com os dados apresentados nessa tese, demonstrando a importância da IL-10 para controlar a exacerbção do processo inflamatório diretamente ligado a alta produção de TNF- α .

Em relação à citocina imunomodulatória IL-10 observou-se níveis significativamente elevados de IL-10 por células T em ambos os grupos, entretanto no grupo TM este aumento ocorreu no 28^o DAI enquanto que no grupo TS esse aumento ocorreu mais precocemente, no 14^o DAI. Portanto, a alta produção de IL-10 por células T ocorre sempre ao redor do pico de parasitemia em ambos os grupos experimentais. Nesse trabalho foi observado que a principal célula produtora de IL-10 foram os linfócitos T CD8⁺ em ambos os grupos experimentais. Recentemente trabalhos na literatura têm descrito uma população de células T CD8⁺, denominadas CD8⁺CD122⁺, que atuam como células reguladoras (Rifa'i *et al.*, 2004; Endharti *et al.*, 2005). Essas células são caracterizadas por produzirem altos níveis de IL-10 e suprimirem a produção de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺, bem como a proliferação dos mesmos. Desse modo, o alto percentual de células CD8⁺IL-10⁺ observado nesses animais poderiam ser células CD8⁺CD122⁺, que estariam tentando controlar a hiperativação dos linfócitos T CD8⁺, evitando assim danos teciduais.

Dessa maneira, pode-se inferir que a infecção por formas TM além de promover uma resposta imune capaz de controlar o número de parasitos durante a fase aguda da infecção direciona para uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando assim o desenvolvimento das lesões associadas à doença de Chagas. Já na infecção por formas TS,

apesar do controle da parasitemia, não ocorre o desenvolvimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando assim ao estabelecimento de uma inflamação persistente, que provavelmente poderá evoluir para uma forma clínica mais grave.

Os baços dos animais do grupo controle apresentaram aspecto histológico regular em todas as estruturas (dados não mostrados). Foi realizada também a análise histológica dos baços de camundongos infectados por formas TM ou TS, constatando o comprometimento deste órgão na fase aguda como já observado por outros pesquisadores (Lima *et al.*, 2001). No presente trabalho foi observado severas alterações no baço nos animais do grupo TS ao fim da fase aguda, com total perda de arquitetura desse órgão devido a intensa hiperplasia da polpa branca no 42^o DAI, demonstrando assim que a infecção por formas sanguíneas ocasiona em maior dano tecidual quando comparada a infecção por formas metacíclicas.

7.0 Conclusão

A interação inicial entre formas tripomastigotas metacíclicas e o hospedeiro vertebrado induz um perfil de resposta imunológica diferente daquela observada na infecção com formas tripomastigotas sanguíneas, sendo:

- 1- em TM, mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz não só de controlar o número de parasitos durante a fase aguda da infecção como também de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando assim o desenvolvimento das lesões associadas à doença de Chagas;
- 2- em TS, mais exuberante e, mesmo com o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando assim há uma inflamação persistente.

Estas proposições são sustentadas pelos seguintes achados:

- Níveis de parasitemia maiores e mais precoce no grupo TS;
- Perfil bimodal nas alterações leucocitárias no sangue periférico (7^o e 42^o DAI) no grupo TS;
- Diminuição no percentual de células NK, CD4⁺ e CD8⁺ no baço dos animais do grupo TS no 7^o DAI;
- Produção precoce de TNF- α acompanhada de uma produção mais tardia de IFN- γ , quando a parasitemia patente já esta sob controle no grupo TS;
- Ausência de uma inversão de um perfil inflamatório para um perfil imunomodulado nos animais do grupo TS, mesmo quando a parasitemia sob controle;
- Processo inflamatório cardíaco precoce que se mantém elevado até o 42^o DAI nos animais do grupo TS;
- Alterações mais severas encontradas no baço dos animais do grupo TS.

8.0 Referências Bibliográficas

- Abel, L.C., Rizzo, L.V., Ianni, B., Albuquerque, F., Bacal, F., Carrara, D., Bocchi, E.A., Teixeira, H.C., Mady, C., Kalil, J., Cunha-Neto, E. (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 17(1):99-107.
- Acosta Rodriguez, E.V.; Zuniga, E.I.; Montes, C.L.; Merino, M.C.; Bermejo, D.A.; Amezcua Vesely, M.C.; Motran, C.C.; Gruppi, A. (2007). *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? *Scand J Immunol.* 66(2-3):137-42.
- Aliberti, J.C.; Cardoso, M.A.G.; Martins, G.A.; Gazzinelli, R.T.; Vieira, L.Q.; Silva, J.S. (1996). IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice and is produced by normal murine macrophage in response to live trypomastigote. *Infect. Immunol.* 64: 1961-1967.
- Almeida, I.C.; Camargo, M.M.; Procópio, D.O.; Silva, .L.S.; Mehlert, A.; Travassos, L.R.; Gazzinelli, R.T.; Ferguson, M.A. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19(7): 1476-1485.
- Andrade, L.O. & Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-hostcell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3,819-823.
- Andrade, S.G.; Magalhães, L. dos A.; Pessina, D.H. (2008). Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103(1):21-6.
- Andrade, Z.A. (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol.*142(2):129-129.
- Antúnez, M.I. & Cardoni, R.L. (2001). 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.* 79(3):189-96.
- Arantes, J.M.; Pedrosa, M.L.; Martins, H.R.; Veloso, V.M.; de Lana, M.; Bahia, M.T.; Tafuri, W.L.; Carneiro, C.M. (2007). *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Exp Parasitol.* 117(1):43-50.
- Bahia-Oliveira, L.M.; Gomes, J.A.; Cançado, J.R.; Ferrari, T.C.; Lemos, E.M.; Luz, Z.M.; Moreira, M.C.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis.* 182(2):634-8.
- Brener, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 63: 215 – 220.
- Brener, Z. & Gazzinelli, R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 114(2):103-10.

- Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. (1995). A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem.* 270(10): 5172-5180.
- Burleigh, B.A.; Caler, E.V.; Webster, P.; Andrews, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol.* 136(3): 609-620.
- Camargo, M.M.; Almeida, I.C.; Pereira M.E.; Ferguson, M.A.; Travassos, L.R.; Gazzinelli, R.T. (1997a). Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 158 (12): 5890-5901.
- Camargo, M.M.; Andrade, A.C.; Almeida, I.C.; Travassos, L.R.; Gazzinelli, R.T. (1997b). Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma – primed macrophages. *J. Immunol.* 159: 6131-6139.
- Campbell, D.A.; Westenberger, S.J.; Sturm, N.R. (2004). The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 4(6):549-62.
- Campos, M.A.; Almeida, I.C.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Valente, E.P.; Procópio, D.O.; Travassos, L.R.; Smith, J.A.; Golenbock, D.T.; Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol.* 167(1):416-23.
- Cardillo, F.; Postol, E.; Nihei, J.; Aroeira, L.S.; Nomizo, A.; Mengel, J.. (2007). B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 122:584- 595.
- Cardillo, F.; Voltarelli, J.C.; Reed, S.G.; Silva, J.S. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells. *Infect. Immun.* 64:128-134.
- Carneiro, C.M.; Martins-Filho, O.A.M.; Reis, A.B.; Veloso, V.M.; Araújo, F.M.G.; Bahia, M.T.; Lana, M.; Machado-Coelho, G.L.L.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. Tafuri, W.L. (2007). Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Acta Tropica.* 101: 120-129.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). Chagas disease after organ transplantation--Los Angeles, California, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 55(29):798-800.
- Chandrasekar, B.; Melby, P.C.; Troyer, D.A.; Colston, J.T.; Freeman, G.L. (1998). Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 152: 925-934.

- Corsini, A.C.; Braz, R.; Ciampi, D.B.; Zucato, M.R.(1982). Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of IgG humoral response. *Z Parasitenkd.* 68(1):15-25.
- Coura, J. R. & Dias, J.C.P. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 31-40.
- Cunha-Neto, E.; Gruber, A.; Zingales, B.; Kalil, J. (1995). Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 5:217-229.
- da Silveira, A.B.; Lemos, E.M.; Adad, S.J.; Correa-Oliveira, R.; Furness, J.B.; D'Avila Reis, D. (2007). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol.* 38(8):1256-1264.
- de Meis, J.; Morrot, A.; Farias-de-Oliveira, D.A.; Villa-Verde, D.M.; Savino, W. (2009). Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 7;3(7):e417.
- Dias, J.C. (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2:43-59.
- Dias, J.C.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(5):603-12.
- Dorn, P.L.; Perniciaro, L.; Yabsley, M.J.; Roellig, D.M.; Balsamo, G.; Diaz, J.; Wesson, D. (2007). Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerg Infect Dis.* 13(4):605-7.
- Endharti, A.T.; Rifa'I, M.; Shi, Z.; Fukuoka, Y.; Nakahara, Y.; Kawamoto, Y.; Takeda, K.; Isobe, K.; Suzuki, H. (2005). Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 175(11):7093-7.
- Ferreira, R.C.; Ianni, B.M.; Abel, L.C.; Buck, P.; Mady, C.; Kalil, J. (2003) Increase plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 98(3): 407-411.
- Ferreira, V.F.; Jorqueira, A.; Souza, A.M.; da Silva, M.N.; de Souza, M.C.; Gouvêa, R.M.; Rodrigues, C.R.; Pinto, A.V.; Castro, H.C.; Santos, D.O.; Araújo, H.P.; Bourguignon, S.C. (2006). Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 14(16): 5459-5466.
- Florencio-Martínez, L.; Márquez-Dueñas, C.; Ballesteros-Rodea, G.; Martínez-Calvillo, S.; Manning-Cela, R. (2010). Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.*

- Frantz, S.; Kobzik, L.; Kim, Y.D.; Fukazawa, R.; Medzhitov, R.; Lee, R.T.; Kelly, R.A. (1999). Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 104(3):271-80.
- Fuenmayor-Meza, C.E. (2000). Quantitative analysis of histopathological alterations in endomyocardial biopsies from patients in different clinical forms of Chagas' disease or with dilated cardiomyopathy, regarding myocardial structure, *T. cruzi* antigens and subsets of T lymphocytes. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Galvão da Silva, A.P. & De Almeida Abrahamsohn, I. (2001). Interleukin – 12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol.* 104: 349 – 354.
- Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M.J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica.* 115(1-2): 22-7.
- Golgher, D. & Gazzinelli, R.T. (2004) Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity.*37(5):399-409.
- Gomes, J.A.; Bahia-Oliveira, L.M.; Rocha, M.O.; Martins-Filho, O.A.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71(3):1185-93.
- Gomes, M.L.; Toledo, M.J.; Nakamura, C.V.; Bittencourt, Nde. L.; Chiari, E.; de Araújo, S.M. (2003). *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(5):649-654.
- Gonçalves-Da-Costa, S. C.; Lagrange, P. H.; Hurtrel, B.; Kerr, I.; Alencar, A. (1984). Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. *Ann Immunol.*, v. 135, n. 3, p. 317-32
- Gonçalves da Costa, S.C.; Calabrese, K.S.; Zaverucha do Valle, T.; Lagrange, P.H. (2002). *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol.*;17(3):837-44.
- Grisotto, M.G.; D'Império Lima, M.R.; Marinho, C.R.; Tadokoro, C.E.; Abrahamsohn, I.A.; Alvarez, J.M. (2001). Most parasite-specific CD8+ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor alphabeta and CD8 molecules. *Immunol.* 102 (2): 209-217.
- Gürtler, R.E.; Segura, E.L.; Cohen, J.E. (2003). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 9(1):29-32.
- Harris, D.P.; Goodrich, S.; Mohrs, K.; Mohrs, M.; Lund, F.E. (2005). Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol.* 175(11):7103-7.
- Harris, D.P.; Haynes, L.; Sayles, P.C.; Duso, D.K.; Eaton, S.M.; Lepak, N.M.; Johnson, L.L.; Swain, S.L.; Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 1(6):475-82.

- Hatcher, F.M. & Kuhn, R.E. (1982). Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural Killer cells. *Science*. 218: 295 – 296.
- Higuchi, M.D.; Ries, M.M.; Aiello, V.D.; Benvenuti, L.A.; Gutierrez, P.S.; Bellotti, G., Pileggi, F. (1997). 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*. 56(5):485-489.
- Higuchi, M.L.; Benvenuti, L.A.; Reis, M.M.; Metzger, M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*. 60: 96-107.
- Holscher, C.; Kohler, G.; Muller, U.; Mossmann, H.; Schaub, G. A.; Brombacher, F. (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect.Immun*. 66 (3):1208-1215.
- Hölscher, C.; Mohrs, M.; Dai, W.J.; Köhler, G.; Ryffel, B.; Schaub, G.A.; Mossmann, H.; Brombacher, F. (2000). Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun*. 68(7):4075-83.
- Kierszenbaum, F. & Howard, J.G. (1976). Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *Immunol*. 116: 1208 – 1211.
- Kierszenbaum, F. (2003). Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 37(1):1-11.
- Kroll-Palhares, K.; Silvério, J.C.; Silva, A.A.; Michailowsky, V.; Marino, A.P.; Silva, N.M.; Carvalho, C.M.; Pinto, L.M.; Gazzinelli, R.T.; Lannes-Vieira, J. (2008). TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8⁺ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(4):375-85.
- Kumar, S. & Tarleton, R. L. (2001) Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*. 166: 4596-4603.
- Laucella, S.A.; Postan, M.; Martin, D.; Hubby Fralish, B.; Albareda, M.C.; Alvarez, M.G.; Lococo, B.; Barbieri, G.; Viotti, R.J., Tarleton, R.L. (2004). Frequency of interferon-gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis*. 289(5):909-18.
- Leiby, D.A.; Herron, R.M.; Read, E.J. (2002) *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion*. 42:549-555.
- Lieke, T.; Graefe, S.E.; Klauenberg, U.; Fleischer, B.; Jacobs, T. (2004). NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun*. 72(12):6817-25.

- Lima, E.S.; Andrade, Z.A.; Andrade, S.G. (2001). TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol*. 82(6):327-36.
- Lima-Martins, M.V.; Sanchez, G.A.; Krettli, A.U.; Brener Z. (1985). Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol*. 7(4):367-76.
- Lopes, M.F.; Veiga, V.F.; Santos, A.R.; Fonseca, M.E.F.; Dos Reis, G.A. (1999). Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* 154:744-752.
- Maioli, T.U. (2008). O efeito da esplenectomia na resposta immune contra as infecções causadas pela *Leishmania major* e pelo *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Martin D, & Tarleton R. (2004) Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev*. 201:304-317.
- Mebius, R.E. & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 5:606-616.
- Melo, C.N. & Machado, C.R.S. (2001). *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol*. 97: 15-23.
- Michailowsky, V.; Silva, N.M.; Rocha, C.D.; Vieira, L.Q.; Lannes-Vieira, J. Gazzinelli, R.T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology*. 159: 1723-1733.
- Minoprio, P.; Itohara, S.; Heusser, C.; Tonegawa, S.; Coutinho, A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev*. 112:183-207.
- Minoprio, P.; Coutinho, A.; Spinella, S.; Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Int Immunol*. 3(5):427-33.
- Minoprio, P.; el Cheikh, M.C.; Murphy, E.; Hontebeyrie-Joskowicz, M.; Coffman, R.; Coutinho, A.; O'Garra, A. (1993). Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol*. 151(8):4200-8.
- Minoprio, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol*. 31(5-6):588-91.
- Molina, H.A. & Kierszenbaum, F. (1988a). Immunohistochemical detection of deposits of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil peroxidase in the myocardium of patients with Chagas' disease. *Immunology*. 64(4):725-31.

- Molina, H.A. & Kierszenbaum, F. (1988b). Kinetics of development of inflammatory lesions in myocardial and skeletal muscle in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol.* 74(3):370-4.
- Molina, H.A. & Kierszenbaum, F. (1989a). Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. *J Parasitol.* 75(1):129-33.
- Molina, H.A. & Kierszenbaum, F. (1989b). Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology.* 66(2):289-95.
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(5): 577-591.
- Moncayo, A.; Ortiz Yanine, M.L. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 100(8): 663-77.
- Nakhle, M.C.; de Menezes, Mda. C.; Irulegui, I. (1989). Eosinophil levels in the acute phase of experimental Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 31(6):384-91.
- Nascentes, G.A.; Meira, W.S.; Lages-Silva, E.; Ramírez, L.E. (2010). Immunization of Mice with a *Trypanosoma cruzi*-Like Strain Isolated from a Bat: Predictive Factors for Involvement of Eosinophiles in Tissue Damage. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Nogueira, N.; Chaplan, S.; Reesink, M.; Tydings, J.; Cohn, Z.A. (1982). *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 128: 2142 – 2146.
- Oliveira, A.C.; Peixoto, J.R.; de Arruda, L.B.; Campos, M.A.; Gazzinelli, R.T.; Golenbock, D.T.; Akira, S.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L.; Nobrega, A.; Bellio, M. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol.* 173(9):5688-5696.
- Ozinsky, A.; Underhill, D.M.; Fontenot, J.D.; Hajjar, A.M.; Smith, K.D.; Wilson, C.B.; Schroeder, L.; Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25):13766-71.
- Padilla, A.; Xu, D.; Martin, D.; Tarleton, R. (2007). Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. *Infect Immun.* 75(1):231-235.
- Padilla, A.M.; Bustamante, J.M.; Tarleton, R.L. (2009). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol.* 21(4):385-90.

- Parada, H.; Carrasco, H.A.; Anez, N.; Fuenmayor, C.; Inglessis, I. (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 60 (1): 49-54.
- Ramirez, M.I.; Ruiz, M.C.; Araya, J.E.; Franco da Silveira, J.; Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.* 61: 3636-3641.
- Reed, S.G. (1988). In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 140(12):4342-7.
- Reed, S.G.; Brownell, C.E.; Russo, D.M.; Silva, J.S.; Grabstein, K.H.; Morrissey, P.J. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 153(7):3135-40.
- Reis, M.M.; Higuchi, Mde. L.; Benvenuti, L.A.; Aiello, V.D.; Gutierrez, P.S.; Bellotti, G.; Pileggi, F. (1997). 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.* 83(2):165-172.
- Ribeirão, M.; Pereira-Chioccola, V.L.; Rénia, L.; Augusto Fragata Filho, A.; Schenkman, S.; Rodrigues, M.M. (2000). Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 22(1):49-53.
- Rifa'i, M.; Kawamoto, Y.; Nakashima, I.; Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med.* 200(9):1123-34.
- Rocha, M.O.; Teixeira, M.M.; Ribeiro, A.L. (2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 5: 727-743.
- Rottenberg, M.E.; Bakhiet, M.; Olsson, T.; Kristensson, K.; Mak, T.; Wigzell, H.; Orn, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genimically deleted of CD4 and CD8 to infectious with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* 61: 5129-5133.
- Rottenberg, M.E.; Riarte, A.; Sporrang, L. (1995). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol. Lett.* 45: 53-60.
- Rowland, E.C. & Sibley-Phillips, S. (1984). Bone marrow eosinophil levels in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J Parasitol.* 70(5):819-20.
- Russo, M.; Starobinas, N.; Ribeiro-Dos-Santos, R.; Minoprio, P.; Eisen, H.; Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1989). Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11(4):385-95.
- Russo, M.; Starobinas, N.; Marcondes, M.C.; Minoprio, P.; Honteyberie-Joskowicz, M. (1996). The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol Letters.* 49: 163 – 168.

- Sathler-Avelar, R.; Lemos, E.M.; Reis, D.D.; Medrano-Mercado, N.; Araújo-Jorge, T.C.; Antas, P.R.; Corrêa-Oliveira, R.; Teixeira-Carvalho, A.; Elói-Santos, S.M.; Favato, D.; Martins-Filho O.A. (2003). Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 58(6):655-63.
- Silva, E.M.; Guillermo, L.V.; Ribeiro-Gomes, F.L.; De Meis, J.; Pereira, R.M.; Wu, Z.; Calegari-Silva, T.C.; Seabra, S.H.; Lopes, U.G.; Siegel, R.M.; Dos Reis, G.A.; Lopes, M.F. (2005). Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 174(10):6314-21.
- Silverio, J.C.; de-Oliveira-Pinto, L.M.; da Silva, A.A.; de Oliveira, G.M.; Lannes-Vieira, J. (2010). Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol.* 91(1):72-86.
- Souza, P.E., Rocha, M.O., Menezes, C.A., Coelho, J.S., Chaves, A.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 72(9):5283-91.
- Souza, S.M. (2010). Estudo imuno-histoquímico do infiltrado celular no miocárdio de cães experimentalmente infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado.
- Starobinas, N.; Russo, M.; Minoprio, P.; Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol.* 142(2):117-22.
- Steiniger, B. & Barth, P. (2000). Microanatomy and function of the spleen. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 151: 1-101.
- Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gürtler, R.E.; McKerrow, J.; Reed, S.; Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 118(4):1301-10.
- Sun, J. & Tarleton, R.L. (1993). Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 48(2):161-9.
- Talvani, A.; Ribeiro, C.S.; Aliberti, J.C.; Michailowsky, V.; Santos, P.V.; Murta, S.M.; Romanha, A.J.; Almeida, I.C.; Farber, J.; Lannes-Vieira, J.; Silva, J.S.; Gazzinelli, R.T. (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2(8):851-66.
- Talvani, A.; Rocha, M.O.; Cogan, J.; Maewal, P.; de Lemos, J.; Ribeiro, A.L.; Teixeira, M.M. (2004). Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(6):645-649.

- Tarleton, R.L.; Sun, J.; Zhang, L.; Postan, M. (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* 62(5):1820-1829.
- Tarleton, R.L.; de Andrade, P.P.; de Andrade, C.R. (1988). Interleukin 2 production in patients with Chagas' disease: correlation with anti-parasite antibody responses. *Immunol Lett.* 17(3):229-34.
- Todorov, A.G.; Einicker-Lamas, M.; de Castro, S.L.; Oliveira, M.M.; Guilherme, A. (2000). Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 275(41): 32182-32186.
- Truyens, C.; Torrico, F.; Lucas, R.; De Baetselier, P.; Buurman, W.A.; Carlier, Y. (1999). The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 67(11):5579-86.
- Tzelepis, F.; Persechini, P.M.; Rodrigues, M.M. (2007). Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS ONE.* 2(4):e393.
- Vago, A.R.; Andrade, L.O.; Leite, A.A.; D'Avila Reis, D.; Macedo, A.M.; Adad, S.J.; Tostes, S. J.R.; Moreira, M.C.; Filho, G.B.; Pena, S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156(5):1805-9.
- Van Overtvelt, L.; Vanderheyde, N.; Verhasselt, V.; Ismaili, J.; De Vos, L.; Goldman, M.; Willems, F.; Vray, B. (1999). *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun.* 67(8):4033-40.
- Vespa, G. N.; Cunha, F. Q.; Silva, J. S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect.Immun.* 62 (11):5177-5182.
- Vieira, P. M. A.; Francisco. A.F.; Souza, S. M.; Malaquias, L. C. C.; Reis, A. B.; Giunchetti, R. C.; Veloso, V. M.; Lana, M.; Tafuri, W.L.; Carneiro, C.M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute phase of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. *Experimental Parasitology (Online)*.
- Villalta, F.; Zhang, Y.; Bibb, K.E; Kappes J.C.; Lima, M.F. (1998).The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP- α and MIP- β induce trypanocidal activity in human activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immunol* 66: 4690-4695.
- Vitelli-Avelar, D.M.; Sathler-Avelar, R.; Dias, J.C.; Pascoal, V.P.; Teixeira-Carvalho, A.; Lage, P.S.; Eloi-Santos, S.M.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A. (2005). Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62(3):297-308.

- Yoshida N.; Favoreto, S. Jr.; Ferreira, A.T.; Manque, P.M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res.* 33(3): 269- 278.
- Yoshida, N. (2006). Molecular Basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1): 87-111.
- Young, C.; Losikoff, P.; Chawla, A.; Glasser, L.; Forman, E. (2007). Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion.* 47(3):540-4.
- Zambrano-Villa, S.; Rosales-Borjas, D.; Carrero, J.C.; Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology.* 18(6): 272-278.
- Zhang L, & Tarleton RL. (1996) Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.* 84(2):203-13.
- Zuñiga, E.; Motran, C.; Montes, C.L.; Diaz, F.L.; Bocco, J.L.; Gruppi, A. (2000). *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin Exp Immunol.* 119(3):507-15.

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](#)