### **RAÍSSA FONSECA**

# Análise do papel modulador da interação PD-1/PD-L1 na fase crônica da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Doutor em Ciências.

São Paulo 2017

### **RAÍSSA FONSECA**

## Análise do papel modulador da interação PD-1/PD-L1 na fase crônica da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

Versão original

São Paulo 2017 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fonseca, Raíssa Análise do papel modulador da interação PD-1/PD-L1 na fase crônica da infecção murina pelo Trypanosoma cruzi / Raíssa Fonseca; orientador José Maria Álvarez Mosig. -- São Paulo, 2018. 105 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Patologia Cardíaca. 4. Fase Crônica. 5. Inibição da Resposta Imune. I. Álvarez Mosig, José Maria , orientador. II. Título.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raíssa Fonseca

Título da Tese: Análise do papel modulador da interação PD-1/PD-L1 na fase crônica da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* 

Orientador(a): Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ....../....., considerou

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

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 -e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética no USO de Animais

Decl. CEUA.033/2012.

#### DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 140/10/CEUA, datado de 23.11.10 e por solicitação do Prof. Dr. José Maria Álvares Mosig, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna *Raissa Fonseca*, ao Projeto de Pesquisa "*A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi clone Sylvio X10/4: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e na patologia cardíaca crônica*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de julho de 2012.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Vice- Coordenador da CEUA ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 010 nas fls.028 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a José Maria Alvarez Mosig, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Análise do papel dos macrófagos esplênicos na resposta imune da infecção experimental pelo trypanosoma cruzi" do qual participam o(s) aluno(s) Raíssa Fonseca, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 10.02.2015, com validade de 4 anos.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015.

m

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. AN A PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Citade Universitaria Armanda de Sales Ovieral Budanta São Paulo SP - Av Professor Lineu Preses 1415-108 in Intérn o CEUA-ICB/USP - Telefone (11/13041-7733), e mail repliciduation

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e no desenvolvimento da patologia cardiaca", registrado sob o protocolo nº 2/2017, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquiso Científico, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em 07/03/2017 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) José Maria Alvarez Mosig

- Departamento: Imunologia

 Membros da Equipe: Raisso Fonseca (Pós-graduando), Rafael Moysés Salgado (Pós-graduando), Beatriz Villas Boas (Pós-graduando), Rogério Silva do Nascimento (Técnico de laboratório)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.or/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "The murine infection by Trypanosoma cruzi: Mechanisms

involved in parasite control and development of cardiac pathology", protocol nº 2/2017, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 3/7/2017 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) José Maria Alvarez Mosig

 Team members: Raissa Fonseca (Graduate Student), Rafael Moysés Salgado (Graduate Student), Beatriz Villas Boas (Graduate Student), Rogério Silva do Nascimento (Laboratory Technician).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	CD28KO	Femea/Female	6-8 semanas/weeks	140
	C\$781/6	Femeu/Female	6-8 semanas/weeks	1000
	A/1	Femea/Female	6-8 semanas/weeks	300
	MerCreMer	Mache/Male	6-8 semanas/weeks	-40
	MyD88KD	Macho/Male	6-8 semanas/wneks	20
	FORPIGEP	Femea/Female	6-8 semanas/weeks	60
	DTR eGFP FoxP3	Femeo/Female	6-8 semanas/weeks	280
	CS-/ (backpround B6)	Femea/Female	6-8 semanas/weeks	240
	RKD	Femeo/Female	6-8 semanas/weeks	40
	CD45 1	Femera/Vemale	5-8 semanas/weeks	40
	C3H/HePAS	Femera/Female	6-8 semanas/weeks	100

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

São Paulo, 17 de março de 2017.

land ont

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretário CEUA-ICB/USP

## DEDICATÓRIA

A todos que acompanharam esta jornada, de longe ou de perto.

#### AGRADECIMENTOS

Ás agencias de fomento, FAPESP, CNPq e CAPES, que tornaram possível e apoiaram a execução deste projeto.

Ao meu orientador, Pepe, por ter aceitado me orientar e acreditado que eu seria capaz de realizar este projeto. Agradeço pela oportunidade, a qual me fez fazer a escolha que eu nunca esperava ter feito, e me levou a um lugar onde eu nunca havia imaginado chegar. À Regina, pela co-orientação informal, pelas discussões enriquecedoras, e pelo gibi do Quino!

A minha família, pela minha criação e por todo o suporte durante todos esses anos. Eu sei que não foi fácil.

Beca, Henrique e Chaves pelos almoços entre as aulas, pelas noites jogando, pelas conversas ininteligíveis e pela amizade genuína. Pela Nemelés.

À Eni, por estar sempre disposta a ajudar e aconselhar nos momentos mais difíceis.

Aos meus grandes companheiros Rafa, Thi, Fe, Aline e Nath pelas discussões sobre os planos para a vida, por ouvir minhas lamentações, pelas viagens e cafés. Aos meus colegas de laboratório, Henrique, Rafa e Rogério pelos experimentos intermináveis, pela experiência e ensinamentos adquiridos e por poder contar sempre com vocês. Érika, Maria, Rosana, Paula, Beatriz, Paulo, Caio, Eduardo, Isabella, Áurea e todos os outros que fizeram parte do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas pelas reuniões e vivências compartilhadas.

Dave and Vaiva for all the big fishes caught. Emily and Lalit for the cheap Chinese ordered, for the endless nights flowing (with all the good results someone could get) and for the GoT nights + gardening at Jess'.

Diógenes, pelas poucas e melhores aulas de R. Pelas muitas viagens e pela companhia nos finais de tarde mais bonitos e também nos chuvosos no remo. Por incitar as reflexões mais inusitadas e pelas conversas mais longas.

À pós-graduação (Sim, toda a experiência.) que me deu as minhas melhores e as minhas piores noites de reflexão (e de sono). E por me ensinar que eu precisava aprender a gerenciar meus sentimentos. Aos agradecimentos, por me fazer parar e pensar nas coisas pelas quais eu sou agradecida. E não são poucas.



There is nothing so stable as change. -Bob Dylan

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig. O presente projeto recebeu auxilio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processos nº2012/14670-5, 2014/03802-3 e 2015/00680-7, do CNPq, processo nº134149/2012-2 e da PROEX-CAPES.

#### RESUMO

FONSECA, R. Análise do papel modulador da interação PD-1/PD-L1 na fase crônica da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*. 2017. 110 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Camundongos C3H/HePAS infectados com Trypanosoma cruzi Sylvio X10/4 desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica semelhante àquela observada em pacientes afetados pela doença de Chagas. A presença do infiltrado inflamatório cardíaco, apesar de insuficiente para erradicar os parasitas localmente, parece contribuir para a progressão patologia cardíaca. Para entender por que a resposta imune falha em eliminar o parasite, analisamos o perfil das células do sangue, coração e baço na fase crônica da infecção nestes camundongos, comparado ao de camundongos não infectados da mesma idade. A análise por citometria de fluxo das células que infiltram o coração revelou uma maior frequência de leucócitos, especialmente monócitos e linfócitos com elevada expressão de PD-1 e PD-L1, provavelmente devido ao estímulo antigênico persistente, sugerindo que esta interação inibitória previne a resposta imune local neste modelo experimental. Visando restaurar a resposta imune na fase crônica da infecção, em diferentes experimentos tratamos os camundongos com anticorpos anti-PD-L1, ou com anti-PD-L1 e anti-PD-1. No entanto, ambos os bloqueios mediados por anticorpos monoclonais falharam em exercer uma diferença significativa na patologia cardíaca, parasitemia do sangue ou do coração ou aumento da resposta imune. Considerando estes resultados, avaliamos a possibilidade da utilização de *T. cruzi* irradiado para prover antígeno e co-estímulo via CD28 para as células exaustas. Experimentos in vivo e in vitro mostraram que os parasitas irradiados conseguem infectar células sem replicar, promovendo uma resposta imune sem causar patologia, fornecendo-nos uma ferramenta interessante para o tratamento dos camundongos crônicos. Desta forma, observamos que o tratamento com anti-PD-1 e anti-PD-L1 associado ao desafio dos camundongos com T. cruzi irradiado aumenta a patologia cardíaca e a bradicardia, assim como diminui a parasitemia sanguínea. Além disto, o tratamento aumenta a proporção de células de memória efetoras no coração dos camundongos tratados, apesar de não alterar as células do baço ou a funcionalidade destas, segundos ensaios in vitro. Portanto, o tratamento indica que na fase crônica da doença de Chagas, o aumento da resposta imune não conduz à esterilidade, mas pode resultar na piora da patologia cardíaca.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Fase crônica. Interação inibitória.

#### ABSTRACT

FONSECA, R. Analysis of the modulatory role of PD-1/PD-L1 interaction in the chronic phase of the murine infection with *Trypanosoma cruzi*. 2017. 110 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

C3H/HePAS mice infected with T. cruzi Sylvio X10/4 parasites develop a chronic cardiomyopathy like the observed in human chagasic patients. The presence of inflammatory infiltrate in the heart, while insufficient to eradicate local parasites, may contribute to disease progression. To understand why the immune response fails eliminating the parasite, we analyzed the profile of blood, heart and spleen cells in the chronic phase of infected mice compared to age-matched controls. Flow cytometry analysis of heart-infiltrating cells in chronically infected mice revealed higher leukocyte frequency, especially monocytes and lymphocytes with increased PD-1 and PD-L1 expression, probably due to continued antigen stimulation, suggesting this inhibitory pathway is functional, preventing the immune response. To restore the immune response at the chronic phase, mice were treated first with monoclonal antibody anti-PD-L1, and then with anti-PD-L1 associated with anti-PD-1 in different experiments, however, neither antibody mediated blockade exerted significant effects at heart pathology, blood and heart parasitemia nor restored T cell response. Considering these results, we evaluated the possibility of using *T. cruzi* irradiated challenge to provide both parasite antigen and CD28 co-stimulatory signaling to exhausted cells. In vivo and in vitro experiments showed that irradiated parasites can infect cells without replicating, thus promoting specific immune response without causing pathology, being suitable for treatment. Thus, association of anti-PD-1 and anti-PD-L1 treatment with irradiated T. cruzi challenge increased heart pathology and bradycardia as well as reduced blood parasitemia. Additionally, the treatment boosts effector T cells in heart but does not change neither spleen T cells profile or response assessed by in vitro assays. Blocking both inhibitory interactions and provide antigen with co-stimulation seems to cause a loss in heart function despite decreasing parasitemia.

Keywords: Chagas disease. Chronic phase. Inhibitory interaction.

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas	16
1.1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e infecção	16
1.1.2 Ciclo de vida do parasita	18
1.2 Imunidade na doença de Chagas	19
1.2.1 A resposta imune contra o Trypanosoma cruzi	19
1.2.2 Mecanismos de escape do Trypanosoma cruzi	22
1.3 Modelos murinos para o estudo da infecção crônica pelo <i>T. cruzi</i>	24
1.4 A interação inibitória mediada pelas moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2	26
1.4.1 Expressão e regulação	26
1.4.2 O bloqueio de PD-1 e PD-L1 como mecanismo terapêutico	30
1.4.3 A interação PD-1/PD-L1 na infecção pelo T. cruzi	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Camundongos e parasitas	38
4.2 Aspectos éticos	38
4.3 Obtenção do antígeno de <i>T. cruzi</i>	38
4.4 Análise das populações leucocitárias por citometria de fluxo	39
4.5 Produção de IFNγ por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> via citometria de fluxo	39
4.6 Ensaios de proliferação celular	40
4.7 Análise da produção de citocinas por citometria de fluxo utilizando CBA	40
4.8 Análise via ELISA da produção de IFNγ in vitro por esplenócitos	41
4.9 Detecção por ELISA de anticorpos específicos ao <i>T. cruzi</i>	41
4.10 Real Time PCR – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	42
4.11 Cultura de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC)	43
4.12 Cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM)	44
4.13 Exame Eletrocardiográfico	44

## SUMÁRIO

4.14 Análise Histopatológica	44
4.15 Bloqueio da interação PD-1/PD-L1 <i>in vivo</i> 4	45
4.16 Análise por citometria de fluxo das populações leucocitárias do coração4	45
4.17 Irradiação de <i>Trypanosoma cruzi</i> 4	16
4.18 Análise da carga parasitária no sangue e coração por cultura em meio LIT4	16
4.19 Análise Estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Modelo murino crônico de doença de Chagas4	48
5.2 O tratamento com αPDL15	52
5.2.1 Parasitemia e patologia cardíaca5	52
5.2.2 Caracterização funcional e fenotípica de Linfócitos T	54
5.3 Padronização de ensaio para estímulo específico de células T CD8 <sup>+</sup> in vitro	59
5.4 O tratamento com αPDL1 associado a αPD1	61
5.4.1 Parasitemia e patologia cardíaca6	51
5.4.2 Caracterização funcional e fenotípica de linfócitos T	33
5.5 Reestimulação da resposta imune especifica de camundongos crônicos	
utilizando o desafio com <i>Trypanosoma cruzi</i> irradiado6	6
5.6 Padronização do ensaio de proliferação <i>in vivo</i> 6	<u>;9</u>
5.7 O tratamento com $\alpha$ PDL1 e $\alpha$ PD1 associado ao desafio com <i>T</i> .	
<i>cruzi</i> irradiado	71
5.7.1 Parasitemia e patologia cardíaca7	71
5.7.2 Influencia do tratamento na alteração da produção de anticorpos específicos	
ao parasita	74
5.7.3 Caracterização funcional e fenotípica de linfócitos T7	76
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO9	)4
REFERENCIAS	96

1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas

#### 1.1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e infecção

A doença de Chagas é uma zoonose negligenciada endêmica do continente americano que afeta aproximadamente 6 milhões de indivíduos em 21 países da América Latina, dentre os quais 1,1 milhões se encontram no Brasil. O seu agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é, por sua vez, transmitido principalmente por insetos da subfamília Triatominae (Reduviidae). A infecção ocorre por meio do contato das fezes e urina contaminadas do inseto vetor com o local da picada ou com regiões da mucosa, como os olhos e a boca. Além desta, outras formas de transmissão foram descritas, tais como como contaminação oral, transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos infectados, transmissão congênita ou por meio de acidentes de laboratório (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O curso da infecção manifesta duas fases, uma aguda e uma crônica. Durante a fase aguda da infecção, que compreende as primeiras 4 a 8 semanas após a infecção, a doença pode ser assintomática ou apresentar dor de cabeça, dores abdominais ou musculares, inflamação e inchaço na região de inoculação do parasita (Romaña ou Chagoma de inoculação), tosse, hepatomegalia, esplenomegalia, anorexia, diarreia e miocardite. Nesta fase, há parasitemia elevada que regride após este período, dando início a fase crônica da infecção, na qual ocorrem as consequências mais graves da doença (LIDIANI, et al. 2017). Na fase crônica diferentes formas clínicas podem ser observadas. A forma indeterminada ou assintomática é a mais frequente, atingindo de 60 a 70% dos indivíduos infectados, e geralmente perdurando por toda a vida do paciente. A forma cardíaca acomete de 30 a 35% dos pacientes, que apresentam um quadro de miocardite podendo eventualmente levar à morte por arritmia ou insuficiência cardíaca congestiva (SABINO, et al. 2013). Uma porcentagem menor dos pacientes apresenta megasíndromes do aparelho digestivo (megacólon ou megaesôfago). Pode ocorrer ainda a forma mista, com acometimento tanto cardíaco como digestivo, que afeta aproximadamente 10% dos pacientes.

A patogênese da doença de Chagas é complexa e envolve elementos como aspectos ambientais, nutricionais e genéticos, tanto do parasita como do hospedeiro,

assim como a dose e a via de infecção. Além disto, o perfil da resposta imune e sua magnitude são críticos para o desenvolvimento da patologia cardíaca (MACEDO et al. 2004). A característica mais notável da doença humana, assim como da infecção experimental em roedores, é a ausência de cura espontânea. Embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica capaz de auxiliar no controle da parasitemia no final da fase aguda, o controle estéril é raramente obtido (DIAS, et al. 2006). Desta maneira, ninhos de amastigotas persistem nos tecidos por toda a vida do hospedeiro. Ao se romperem, estes ninhos liberam tripomastigotas que podem alcançar a corrente sanguínea, permitindo sua detecção por métodos indiretos, tais como xenodiagnose, hemocultura ou PCR, facilitando o diagnostico da doença de Chagas na fase aguda da infecção. Na fase crônica, a ausência do parasita na circulação sanguínea dificulta sua detecção, tornando a dosagem de IgM e IgG específicos e testes moleculares mais adequados para seu diagnostico (Figura 1).



#### Figura 1 – Curso natural da infecção pelo Trypanosoma cruzi.

A transmissão do parasita pode ocorrer via vetorial por insetos triatomíneos, transfusão de sangue ou transplante de órgãos, via oral ou congênita. O período de incubação é de 5 a 10 dias depois da contaminação e nesta fase ocorrem a maior parte dos sintomas, como febre, anorexia, sinal de Romaña e Chagoma. A infecção prossegue então à fase aguda da doença de Chagas, que dura de 4 a 8 semanas. Esta fase é caracterizada pela presença de tripomastigotas no sangue, e após 10 dias, há produção de anticorpos específicos do tipo IgM. Após esta fase, a parasitemia decresce não sendo mais possível observar o parasita circulante no sangue via microscopia, e a infecção passa à fase crônica. Na fase crônica, o diagnosticado

pode ser realizado via presença de anticorpo IgG específicos, testes moleculares ou cultivo do sangue. A maior parte das pessoas desenvolve a forma indeterminada da doença que é assintomática, enquanto outros indivíduos podem apresentar manifestações clínicas cardíacas, digestivas ou cardio-digestivas. Fonte: Lidiani, K. C. F. et al. 2017.

#### 1.1.2 Ciclo de vida do parasita

O parasita hemiflagelado *Trypanosoma cruzi* tem um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros mamíferos e insetos vetores. O parasita passa por quatro estágios distintos: tripomastigota sanguíneo, amastigota intracelular, epimastigota e tripomastigota metacíclico. No ciclo de vida natural, durante o repasto sanguíneo, o inseto pode ingerir a forma não multiplicativa do tripomastigota no sangue do hospedeiro contaminado. Esta forma do parasita se transforma em epimastigota e se divide por fissão binária no inseto vetor. De 3 a 4 semanas após a ingestão, o parasita se converte na forma infecciosa, que recebe o nome de tripomastigota metacíclico, já na porção posterior do intestino do inseto. Durante um novo repasto sanguíneo, o inseto pode liberar parasitas em suas fezes e/ou a urina, facilitando a infecção de outro hospedeiro vertebrado.

Para continuar o ciclo no hospedeiro vertebrado, o parasita infecta as células próximas ao local da picada, se diferencia em amastigota e se multiplica por fissão binaria. Após sua replicação, se converte na forma tripomastigota, que rompe a membrana da célula, podendo então infectar células adjacentes para realizar novos ciclos de proliferação intracelular, atingir a corrente sanguínea ou o sistema linfático e se dispersar para outros tecidos do hospedeiro. Dentre os tecidos do hospedeiro susceptíveis a infecção, há uma preferencia por células reticulo endoteliais, nervosas e musculares. Ao atingir o sangue, o parasita reinicia o ciclo, podendo eventualmente voltar ao inseto vetor durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado (NAGAJYOTHI et al. 2012) (Figura 2).



#### Figura 2 – O ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.

O inseto vetor triatomíneo (ou "barbeiro") realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado e libera tripomastigotas em suas fezes próximo ao local da picada. Os tripomastigotas podem, desta maneira, infectar células do hospedeiro no local da picada ou em mucosas (olhos e boca). Neste local, os parasitas se diferenciam na forma de amastigotas intracelulares, que se multiplicam por fissão binária, e se convertem em novos tripomastigotas, que rompem a membrana celular e podem alcançar a corrente sanguínea, se dispersando e infectando outros tecidos do corpo. O ciclo de infecção reinicia quando o inseto vetor se infecta através do sangue de um hospedeiro vertebrado contaminado com o parasita. Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino do inseto, onde se multiplicam e diferenciam em tripomastigotas metacíclicos na porção terminal do trato gastrointestinal. Fonte: Nagajyothi, F. et al. 2012.

#### 1.2 Imunidade na doença de Chagas

#### 1.2.1 A resposta imune contra o Trypanosoma cruzi

A resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* tem participação da imunidade inata e da adaptativa. A resposta inata frente ao parasita envolve sua detecção através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores do tipo Toll (TLRs) e

os receptores do tipo NOD (NLRs) por células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas. Este reconhecimento induz a destruição do parasita por macrófagos ativados, e apresentação de antígeno pelas células dendríticas para ativação da resposta imune adquirida (TARLETON, 2007). Existem relatos recentes da participação do inflamassoma em sinergia com TLRs na detecção de sinais de dano (DAMPs) produzidos em consequência a infecção, seguido de produção de IL-1β e IL-18 (DEY, et al. 2014; SILVA, et al. 2013).

Células da imunidade inata participam do controle da replicação do parasita nas fases aguda e crônica da infecção (JUNQUEIRA, et al. 2010). Este processo é intermediado por mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-12 (IL-12), o fator de necrose tumoral (TNFα) e mediadores efetores como proteases, radicais de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio (RNI). A IL-12 é importante na ativação de células natural killer (NK), que participam da fase aguda através da produção de TNFα e IFNγ. O IFNγ por sua vez, possui papel crucial na ativação dos macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico, elemento tóxico para microrganismos intracelulares (KAYAMA, 2010; SILVA, et al. 1995; TAKEDA, 2010).

Enquanto a resposta imune inata é desencadeada durante a fase aguda, as células dendríticas fazem a ligação com a resposta adaptativa. A produção de IL-12, induz a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o perfil Th1, e contribui indiretamente para a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células B. Além da destruição direta de células infectadas pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a produção de IFNγ por células T CD4<sup>+</sup> Th1 e células T CD8<sup>+</sup> leva a uma maior ativação dos macrófagos para destruição dos parasitas fagocitados. As células Th1 também auxiliam os linfócitos B na produção de anticorpos IgG2a e IgG2b *T. cruzi*-específicos, que participam da eliminação dos tripomastigotas extracelulares ao promover sua lise e/ou fagocitose através de receptores Fc (JUNQUEIRA, et al. 2010; TAMBOURGI, et al. 1989) (Figura 3).



Figura 3 – Elementos da resposta imune inata e adaptativa contra o *Trypanosoma cruzi*.

Na fase inicial da infecção, a resposta imune inata tem um papel essencial na proteção do hospedeiro. A primeira barreira para conter a infecção é fornecida por macrófagos, células NK e células dendríticas através da produção de citocinas como IL-12, TNFα, IFNγ e de moléculas efetoras como intermediários reativos de nitrogênio (RNIs) que controlam a replicação do parasita. Ao mesmo tempo, células dendríticas fazem a ponte entre o sistema imune inato e o adaptativo através da produção de IL-12, necessária para a diferenciação e proliferação de células T CD4+ com o perfil Th1, células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas e células plasmáticas. O IFNγ produzido por células NK, Th1 ou CD8<sup>+</sup> ativam mecanismos efetores em macrófagos, que possibilitam a destruição tanto de amastigotas como tripomastigotas fagocitados, enquanto a atividade citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> é responsável por eliminar células infectadas. Anticorpos produzidos por células B podem levar a lise extracelular de tripomastigotas ou facilitar sua fagocitose via opsonização com IgG1 ou IgG2a. Fonte: Junqueira, C. et al. 2010.

Dentre as células T envolvidas na resposta imune adaptativa em uma fase mais tardia da infecção, há destaque para as células efetoras ( $T_E$ ), de memória efetoras ( $T_{EM}$ ) e de memória central ( $T_{CM}$ ) que se mantêm na fase crônica. Estas células de memória foram descritas em 1999 por Sallusto e Lanzavecchia, que caracterizaram a seu

fenótipo, características funcionais e a forma como recirculam. As  $T_{EM}$  constituem a população predominante em casos de infecção crônica devido ao persistente estímulo antigênico (PEPPER, et al. 2011), sendo importantes para a manutenção da imunidade protetora através do "priming" tanto do sistema imune inato como do sistema adaptativo (revisado por BORGES DA SILVA, et al. 2015).

Masopust e Lefrançois descreveram em 2002 um tipo de célula T CD8<sup>+</sup> de memória que recebeu o nome de célula T de memória residente ( $T_{RM}$ ). Estas células são encontradas em órgãos não linfoides e não recirculam, sendo responsáveis pela imunidade local e por realizar a primeira resposta contra patógenos que se alojam ou realizam novas infecções em órgãos não linfoides (SCHENKEL; MASOPUST, et al. 2014). Em 2015, Beura et al. mostrou o aumento destas células no pulmão, intestino grosso, fígado, rim e trato reprodutor feminino na fase crônica da infecção da coriomeningite linfocítica experimental, indicando a importância destas células em um modelo onde há persistência viral. Quando comparadas com a infecção por uma variante deste mesmo vírus, mas que causa apenas a fase aguda de infecção, as células T de memória residente apresentam maior expressão de PD-1, molécula inibitória expressa por linfócitos T exaustos. Não se sabe ainda, entretanto, qual o papel destas células na infecção pelo *T. cruzi*.

#### 1.2.2 Mecanismos de escape do Trypanosoma cruzi

Na doença de Chagas, elementos do parasita e da resposta imune contribuem para o escape do *T. cruzi* evitando sua eliminação completa pelo hospedeiro. O parasita pode realizar o escape do vacúolo parasitóforo para o citosol (NOGUEIRA; COHN, 1976), resistir a ativação do sistema complemento pela via alternativa (FISCHER, et al. 1988; KIPNIS, *et al.* 1981), modular a resposta de células dendríticas (GIL-JARAMILLO, et al. 2016) e interferir na capacidade sinalizadora das células não leucocitárias infectadas, auxiliando o desenvolvimento da patologia crônica por facilitar sua persistência nesta fase da infecção (MARINHO, et al. 2009).

A ineficiência de mecanismos efetores do sistema imune adaptativo também parece ocasionar na persistência do parasita. A regulação negativa dos linfócitos e sua estimulação persistente causa a exaustão das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, com perda de

sua capacidade efetora em locais como o coração ou os músculos estriados esqueléticos. Esta disfunção representam um déficit importante na resposta imune adquirida, favorecendo a persistência do parasita através da perda da capacidade de encontrar e destruir células infectadas (ALBAREDA, et al. 2009; LEAVEY; TARLETON, 2003).

Nos modelos animais de infecção crônica há diferenças na descrição do infiltrado inflamatório no coração. Os principais tipos celulares descritos no miocárdio em modelos murinos de infecção são neutrófilos, células mononucleares (YOUNÈS-CHENNOUFI et al. 1988), células T CD4<sup>+</sup> (PIRMEZ, 1994) e células T CD8<sup>+</sup> (SATO et al. 1992; SUN; TARLETON, 1993). Já em pacientes que desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é descrito que o infiltrado é predominantemente composto por células T, em sua maioria CD8<sup>+</sup> (HIGUCHI et al. 1997; REIS et al. 1993). Neste ambiente, as principais citocinas produzidas são TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  tanto em pacientes como nos modelos experimentais (ABRAHANSON, 1998). Apesar de ser assunto ainda debatido, acredita-se que a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) seja principalmente o resultado da destruição das células cardíacas, consequência direta da ação do parasita e dos mecanismos efetores do sistema imune frente a infecção persistente no tecido (ANEZ, et al. 1999; PALOMINO, et al. 2000; TARLETON, 2001; VAGO, et al. 1996).

No modelo murino de infecção, a resposta de células T CD8<sup>+</sup> é predominantemente composta por um ou poucos clones, caracterizando uma imunodominância que pode facilitar a evasão do parasita culminando em sua persistência, devido à falta de uma resposta mais abrangente (TZELEPIS, et al. 2008). Esta persistência em órgãos não linfoides como o coração, o músculo e o tecido adiposo parecem resultar da falta de funcionalidade das células do sistema imune que se encontram nestes locais. Estas células são incapazes de produzir citocinas frente ao seu reestimulo, levando a acreditar que não estão funcionais (LEAVEY, et al. 2003).

O tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* da cepa Colombiana com Pentoxifilina (PTX), um inibidor de fosfodiesterases utilizado no tratamento de doenças vasculares periféricas que age também sobre o receptor de TNFα, normaliza a resposta de células T CD8<sup>+</sup> exaustas, melhorando a cardiomiopatia

chagásica crônica (PEREIRA et al. 2015). Neste mesmo contexto, a interação das moléculas inibitórias PD-1 e PD-L1 poderia ser responsável pela inibição da resposta imune na fase crônica da infecção de forma análoga ao descrito em outros modelos crônicos, fazendo desta interação um importante objeto de estudo.

#### 1.3 Modelos murinos para o estudo da infecção crônica pelo Trypanosoma cruzi

Combinações de diferentes linhagens de camundongos (suscetíveis ou resistentes) e clones ou cepas do parasita podem ser utilizados para o estudo da resposta imune na doença de Chagas visando esclarecer aspectos da fase aguda e crônica da infecção *Trypanosoma cruzi*. Camundongos de linhagens suscetíveis como A/J e C3H/HeN morrem após a infecção com o parasita da cepa Y mesmo com baixo inoculo, enquanto linhagens intermediárias como o BALB/c, ou resistentes como C57BI/6, apresentam uma menor mortalidade quando comparados aos primeiros, porque desenvolvem uma forte resposta adaptativa. Entretanto, a susceptibilidade de camundongos resistentes a infecção com a cepa CL mostra que a sobrevivência também está fortemente relacionada com a virulência e o tropismo do parasita (GONÇALVES DA COSTA, et al. 2002).

Dentre os modelos utilizados para o estudo da fase crônica da infecção, camundongos C57BI/6 infectados com a cepa CL (*T. cruzi* tipo VI) apresentam persistência dos parasitas no trato gastrointestinal, mas baixa parasitemia detectável no coração (LEWIS, et al. 2016). Por outro lado, camundongos BALB/c ou C3H/HeN infectados com parasitas da cepa JRcl4 (*T.* cruzi tipo I) apresentam presença crônica do parasita tanto no trato gastrointestinal como no coração, desenvolvendo fibrose acentuada neste órgão (LEWIS; KELLY, 2016) (Figura 4).

#### Figura 4 – Modelos experimentais da doença de Chagas crônica.



Para o estudo da fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruz*i utilizando modelos murinos, dependendo da combinação da linhagem de camundongo e da cepa/clone de parasita utilizados, é possível gerar diferentes níveis de patologia cardíaca e/ou gastrointestinal. Imagens *ex vivo* do trato gastrointestinal mostram através da intensidade de bioluminescência a presença do parasita no local infectado, demonstrando que este local pode ser um reservatório permanente na fase crônica da infecção. Camundongos C57BI/6 infectados com a cepa CL (tipo VI) tem baixa carga parasitaria em órgãos como o coração e pouca fibrose, pois há controle eficiente do parasita com baixa disseminação, enquanto a linhagem C3H/HeN na fase crônica da infecção por parasitas do tipo I apresenta infecção disseminada, com grande parasitemia cardíaca e fibrose severa. Fonte: Lewis e Kelly, 2016.

Além destes, outros isolados de *T. cruzi* foram utilizados para o estudo da fase crônica da infecção da doença de Chagas. O clone Sylvio X10/4 isolado por Miles (1974) de um inseto utilizado para o xenodiagnóstico (*Rhodnius prolixus*) de um paciente da região norte do Brasil (SILVEIRA et al. 1979) induz em determinadas linhagens de camundongos um acometimento característico da fase crônica da infecção em humanos, com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (POSTAN et al. 1*983;* ZHANG; TARLETON, 1996). Em 2003, Marinho et al. avaliaram em diversas linhagens

de camundongos a patologia cardíaca gerada na infecção intraperitoneal pelo parasita *T. cruzi* Sylvio X10/4, sendo que na linhagem C3H/HePAS este parasita gerou um quadro que se assemelha muito ao da doença de Chagas humana, exibindo expressivo infiltrado inflamatório no coração e patologia hepática ausente em aproximadamente 30% dos camundongos infectados. Neste modelo é possível observar o extensivo infiltrado leucocitário presente na CCC e a expressão de moléculas inibitórias como o PD-L1 nos monócitos encontrados no coração, provavelmente contribuindo para a ineficiência do sistema em combater localmente o parasita (MOSIG et al. 2014).

#### 1.4 A interação inibitória mediada pelas moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2

#### 1.4.1 Expressão e regulação

Inicialmente identificada como uma molécula indutora de morte, o que motivou sua nomeação como proteína indutora de morte programada 1 (PD-1 ou CD279), a expressão de PD-1 é induzida após a ativação de células T, B e células mielóides através de citocinas portadoras da cadeia gama comum, como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, em um processo no qual o fator de transcrição NFAT funciona como regulador positivo (OESTREICH, *et al.* 2008) e T-bet e Blimp-1 como reguladores negativos (KAO, *et al.* 2011). As citocinas IL-6 e IL-12 regulam a expressão de PD-1 através das moléculas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição 3 e 4 (STAT3 e STAT4) respectivamente (AUSTIN, et al. 2014).

Em infecções virais, fatores epigenéticos estão envolvidos na regulação de PD-1 através da metilação tanto de seu promotor como seu gene (YOUNGBLOOD, B. et al. 2011). No modelo crônico da infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica murina (LCMV), FoxO1 é um elemento-chave na regulação de PD-1. O estímulo antigênico persistente junto a sinalização de PD-1 inibem a ativação de AKT e mTORC2 através da diminuição do sinal do TCR, promovendo a acumulação de FoxO1 que irá induzir maior expressão de PD-1, criando um *feedback* positivo (STARON, et al. 2014). No microambiente tumoral, o fator de crescimento vascular A (VEGFA) pode promover a expressão de PD-1 através do receptor para VEGF em células T CD8<sup>+</sup>.

Já em relação aos ligantes de PD-1, a molécula PD-L1 (CD274) é expressa constitutivamente em células T, B, macrófagos e células dendríticas (DCs), assim como

em uma grande variedade de células não leucocitárias, incluindo os cardiomiócitos e células vasculares (KEIR, et al. 2006), enquanto a molécula PD-L2 (CD273) é restrita a macrófagos, DCs ativadas e linfócitos B1 (JIN, et al. 2011). A molécula PD-L1 tem sua expressão aumentada por citocinas pró-inflamatórias como o IFNγ que opera através da transcrição de IRF-1, além de também ser regulada por GM-CSF, IL-4 e outras interleucinas de cadeia gama comum, que podem também induzir a expressão de PD-L2 (LEE, et al. 2006; WILKE, et al. 2011).

A sinalização PD-L1/PD-1 também foi descrita como elemento atenuante da resposta imune a tumores, facilitando o desenvolvimento tumoral (JIN, et al. 2011). A expressão de PD-1 e seus ligantes podem promover indicações importantes no prognostico do tratamento de pacientes que apresentam alta expressão destas moléculas inibitórias (VORON, T. et al. 2015). Sua expressão pode ser aumentada em tumores onde há mutação com perda de PTEN, que pode levar a ativação da via PI3K/AKT aumentando a expressão desta molécula inibitória (PARSA, et al. 2007), assim como em tumores com mutações relacionadas a vias do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (AKBAY, et al. 2013). Em tumores sólidos, a hipóxia pode levar ao aumento de HIF-1 $\alpha$  que se liga ao promotor de *Pd-I1* aumentando sua expressão não somente nas células do tumor, como também em células mielóides supressoras, macrófagos e células dendríticas presentes no microambiente tumoral (NOMAN, et al. 2014).

Fatores pós-transcricionais também participam do controle da expressão de PD-L1. Recentemente foi descrito que mudanças nas quantidades de microRNAs interferem diretamente na quantidade de PD-L1 expressa em tumores. A diminuição do miR-200 esta envolvida diretamente na metástase tumoral e no aumento de PD-L1 (CHEN, et al. 2014), enquanto o miR-513 induz a degradação do transcrito de *PD-L1* (GONG, et al. 2009) (Figura 5).



Figura 5 – Mecanismos reguladores da expressão de PD-1 e PD-L1.

A expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 é regulada por uma rede complexa de fatores. **(A)** A expressão de PD-1 em células T pode ser induzida por diversas citocinas, principalmente as que possuem a cadeia  $\gamma$  comum, tais como a IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. IL-6 e IL-12 que atuam através de STAT3 e STAT4 respectivamente, induzindo a expressão de PD-1. Outros elementos como o VEGF-A pode induzir a expressão desta molécula através do receptor de VEGF, encontrado em células T. Os fatores nucleares FoxO1 e NFATc1 aumentam sua expressão atuando no promotor de *PD-1*. Blimp-1 e T-bet também interagem com o promotor, bloqueando a expressão desta molécula. Blimp-1 também pode inibir o promotor NFATc1, regulando a expressão de PD-1. **(B)** A expressão de PD-L1 também é regulada por diversas das citocinas de cadeia  $\gamma$  comum, de IL-4 e GM-CSF. IRF-1 pode se ligar ao promotor de *PD-L1* induzindo sua expressão via sinalização de IFN $\gamma$ . A hipóxia pode levar ao aumento da expressão de HIF- $\alpha$  que também se liga ao promotor de *PD-L1* estimulando sua expressão. Mutações no receptor EGFR e perda de PTEN podem aumentar sua expressão em tumores. Sua expressão também pode ser regulada através de mecanismos pós-transcricionais, como os microRNAs miR-200 e miR-513. Fonte: Austin, J. W. et al. 2014.

Em relação à atividade efetora de células T, um elemento que poderia explicar a ineficiência da resposta imune na doença de Chagas crônica é a regulação excessiva promovida pela interação da molécula PD-1 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com os seus ligantes PD-L1/PD-L2. Estas moléculas tem estruturas semelhantes às moléculas co-estimulatórias e seus ligantes, mas diferente da interação B7.1-2/CD28, a interação de PD-1 com PD-L1 e PD-L2 tem ação inibitória, pois resulta em recrutamento de fosfatases à sinapse imunológica que diminuem a fosforilação de ITAMs necessária à ativação/ação efetora dos linfócitos T (CHEMNITZ, et al. 2004; ZANG; ALLISON, 2007). Uma complexidade adicional do sistema PD-1/PD-L1 foi sugerida pela

descoberta de que PD-L1 não se liga apenas a PD-1, mas também à molécula B7.1 (CD80) gerando outra sinalização inibitória (BUTTE, et al. 2007).

Recentemente, as interações de PD-1 com seus ligantes têm sido consideradas elementos-chave na exaustão de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTLs). Nos processos inflamatórios persistentes tais como infecções crônicas, a repetida estimulação antigênica resulta em exaustão imunológica, processo no qual as moléculas PD-1 e PD-L1 aparecem amplamente expressas, havendo perda progressiva de diversos segmentos da atividade efetora da resposta imune adaptativa. Desta forma, as CTLs exaustas mostram uma capacidade reduzida de proliferação, produção de citocinas e atividade citotóxica (GALLIMORE, et al. 1998; ZAJAC et al. 1998). Além disto, estas células exibem deficiências metabólicas e expressão deficitária de genes envolvidos na quimiotaxia, adesão e migração (WHERRY, et al. 2007). A hiperexpressão de PD-1 em modelos de infecções virais crônicas ratifica este mecanismo, levando precocemente as CTLs à exaustão (BARBER, et al. 2006).

Esta via é complexa, e apresenta pelo menos cinco mecanismos de atuação para executar a ação inibitória. A interação de PD-1 com PD-L1 pode atuar antagonizando a sinalização do TCR através do recrutamento de fosfatases, modulando a via PI3K/AKT/mTOR (envolvida no metabolismo celular, sensoriamento de nutrientes e desenvolvimento celular), modulando a via de Ras alterando o ciclo celular, induzindo a expressão de Basic Leucine Zipper Transcription Factor (BATF) que reprime a expressão de genes efetores, ou ainda influenciando a motilidade das células T através de mecanismos ainda em estudo (PAUKEN; WHERRY, 2015).

A sinalização PD-L1/PD-1 tem se mostrado muito importante na indução e manutenção da tolerância periférica a antígenos próprios. Camundongos C57BL/6 deficientes em PD-1 desenvolvem um quadro autoimune semelhante a lúpus, enquanto em BALB/c a ausência de PD-1 resulta em cardiomiopatia dilatada fatal (NISHIMURA, et al. 1999). Tendo em vista que esta interação atenua a atividade efetora das células T resultando na diminuição do dano tecidual induzido pela resposta imune persistente, os camundongos PD-1KO e PD-L1KO desenvolvem respostas autoimunes espontâneas somente após o primeiro ano de vida, mas mostram respostas teciduais exacerbadas à infecção, ou um curso acelerado de patologia autoimune em linhagens suscetíveis. Na

resposta a agentes infecciosos, principalmente a patógenos intracelulares, a interação PD-1/PD-L1 é essencial para evitar uma resposta imune exacerbada que resulta em dano tecidual. Por outro lado, a interação PD-1/PD-L1, ao suprimir a resposta imune ao patógeno, pode facilitar o escape deste, favorecendo o desenvolvimento de um quadro de infecção crônica.

#### 1.4.2 O bloqueio de PD-1 e PD-L1 como mecanismo terapêutico

Com o objetivo de reverter o quadro de regulação excessiva do sistema imune, um grande número de grupos de pesquisa tem utilizado os anticorpos monoclonais αPD1, αPDL1 e αPD-L2, assim como a molécula PD-1 solúvel (SONG, et al. 2011) em modelos experimentais e ensaios clínicos para bloquear *in vivo* a interação de PD-1 com PD-L1/2.

Devido ao fato de um grande número de tumores de diferentes origens mostrarem expressão elevada de PD-L1 junto à elevada expressão de PD-1 por linfócitos que infiltram o tumor (AHMADZADEH, et al. 2009), o bloqueio da interação PD-1/PD-L1 mostrou-se uma alternativa terapêutica viável frente ao tratamento do câncer. Vários monoclonais testados em ensaios clínicos para induzir o bloqueio da interação PD-1/PD-L1-2 tiveram resultados promissores na regressão de melanoma, carcinoma pulmonar e renal, dentre outros (PAUKEN; WHERRY, 2015; TOPALIAN, et al. 2012). Recentemente, medicamentos que interferem nesta via como pembromizulab e nivolumab foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de carcinomas recorrentes ou metastáticos de bexiga, cabeça e pescoço, pele, rins e linfoma. De forma análoga, espera-se que o bloqueio desta interação possa ser utilizado no tratamento de diversas infecções crônicas, como a infecção pelo vírus da HIV (VELU, et al. 2015).

Estudos da imunoterapia com anticorpos que bloqueiam a interação PD-1/PD-L1-2 mostram que é possível reestabelecer a função de células T levando a aumentos na produção de citocinas, restauração da capacidade citotóxica e elevação do potencial proliferativo (PAUKEN; WHERRY, 2015), alternativa que parece promissora para realizar a restauração do sistema imune na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

#### 1.4.3 A interação PD-1/PD-L1 na infecção pelo T. cruzi

A interação PD-1/PD-L1 foi estudada na fase aguda da infecção murina (GUTIERREZ, et al. 2011). Neste trabalho, os autores verificaram que o tratamento *in vivo* com anticorpo monoclonal  $\alpha$ PD1 resulta em aumento do infiltrado inflamatório no miocárdio, menor carga parasitária e aumento dos níveis séricos de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Efeitos similares foram observados em animais na fase aguda da infecção após tratamento com anticorpo monoclonal  $\alpha$ PDL1.

Sabendo que os elementos da resposta imune necessários na fase crônica da infecção podem ser restaurados através do bloqueio desta interação em outros modelos experimentais, é possível que o tratamento dos animais crônicos infectados com *Trypanosoma cruzi* com os anticorpos monoclonais  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 seja capaz de restaurar a resposta imune, levantando a possibilidade de uma nova terapia para a doença de Chagas (Figura 6).





A utilização de anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 como potencial ferramenta terapêutica para o tratamento da doença de Chagas na fase crônica da infecção parece promissora, já que as células do sistema imune se encontram exaustas e há expressão destas moléculas tanto por parte das células infectadas como por parte do sistema imune. Células apresentadoras de antígeno (APCs) apresentam peptídeos do parasita no contexto do MHC para células T, que por

sua vez, exaustas, não realizam a resposta imune efetora. Esta incapacidade em promover a resposta imune efetora está relacionada com as vias inibitórias das moléculas PD-1, PD-L1, PD-L2 e B7-1, que aparecem expressas em monócitos, linfócitos, cardiomiócitos, dentre outros leucócitos e células teciduais. Desta forma, o bloqueio destas interações auxiliaria na restauração da resposta imune especifica na fase crônica da doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a inexistência de um processo terapêutico capaz de curar a doença de Chagas na fase crônica da infecção, estudamos o bloqueio da interação PD-1/PD-L1. Avaliamos sua influência no sistema imune e na patologia de camundongos C3H/HePAS infectados com parasitas Sylvio X10/4, modelo no qual se observa um quadro de cardiomiopatia crônica.

**3 OBJETIVOS**
#### 3.1 Objetivo geral

Verificar se na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* a interação PD-1/PD-L1 está implicada na ineficiência do sistema imune, na persistência do parasita e na patologia cardíaca através do bloqueio *in vivo* destas moléculas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se as moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2 são expressas no tecido cardíaco dos camundongos com infecção crônica pelo *T. cruzi*, assim como nas diferentes populações mononucleares do sangue, do baço e do coração destes animais.

 Verificar se o tratamento do animal crônico com os anticorpos monoclonais αPDL1 determinam aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias.

- Verificar se o tratamento do animal crônico determina mudança na intensidade do infilamatório cardíaco.

- Verificar se o tratamento determina diminuição da carga parasitária sanguínea e cardíaca.

**4 MATERIAL E MÉTODOS** 

#### 4.1 Camundongos e parasitas

Camundongos fêmeas C3H/HePAS fornecidos pelo Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 1 x 10<sup>6</sup> tripomastigotas de cultura do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* (MARINHO, et al. 2004). Após 90, 210, e 330 dias de infecção, os animais crônicos foram submetidos à experimentação. O clone Sylvio X10/4 foi mantido *in vitro* por passagens em células do rim de macaco (Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells - LLCMK2) em meio RPMI suplementado com 3% de soro bovino fetal (SBF). O isolamento do parasita foi realizado a partir do sobrenadante da cultura, o qual foi submetido à centrifugação a 1200 g, 5 min, 4 °C; ao pellet foram adicionados 2 mL de meio RPMI suplementado com 3% SBF e após 10 minutos, o sobrenadante foi coletado para que apenas os parasitas na forma tripomastigotas fossem utilizados para a infecção.

#### 4.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Saúde e do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com número de protocolo 140/10 e 2/2017.

#### 4.3 Obtenção do Antígeno de T. cruzi (Ag)

Como descrito na literatura, parasitas provenientes do sobrenadante das culturas de células LLCMK2 foram lavados três vezes em PBS estéril por centrifugação, submetidos a 20 ciclos de congelamento e descongelamento para rompimento da membrana plasmática, e centrifugados a 5000 g, 60 min, 4 °C, para obtenção do sobrenadante. A concentração de antígeno foi ajustada para 1200 µg/mL e alíquotas de 1 mL foram armazenadas a -20 °C (CUROTTO DE LAFAILLE, et al. 1990).

#### 4.4 Análise das populações leucocitárias por citometria de fluxo

Células mononucleares obtidas do sangue (por separação em gradiente de Percoll 74%) e do macerado do baço dos camundongos experimentais foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 3% soro bovino fetal inativado (FCS), e o número de células foi estimado em câmara de Neubauer. As células foram incubadas com diferentes combinações dos anticorpos monoclonais (MoAbs) conjugados a fluorocromos em Tampão de Marcação (PBS, 2% Soro fetal bovino, 0,01% Azida) à 4 °C por 30 min. Receptores Fc foram bloqueados com o anticorpo murino CD16/CD32 (2.4.G2). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e sua viabilidade foi determinada através do kit comercial Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) segundo as instruções do fabricante.

Os MoAbs usados (BD Biosciences, EUA) foram anti-CD3 (clone 145-2C11), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone RPA-T8), anti-CD19 (clone 1D3), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-PD1 (clone J43), anti-PDL1 (clone MIH5), anti-IFNγ (clone DB-1) e anti-CD69 (clone H1.2F3). Após lavagem e ressuspensão das células em Tampão de Marcação, a aquisição foi realizada em aparelho FACSCanto (BD Biosciences, EUA) e a análise dos dados no programa FlowJo (TreeStar Inc., EUA).

#### 4.5 Produção de IFNγ por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> via citometria de fluxo

Para detecção intracelular de IFNγ foi utilizado o kit de permeabilização Cytofix/Cytoperm<sup>™</sup> Plus (BD Biosciences), conforme protocolo do fabricante. Em resumo, 5x10<sup>5</sup> células de sangue ou baço foram incubadas em solução com Stop Golgi (monensina) e meio RPMI completo (RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de l-glutamina e 0,1% de 2-mercaptoetanol), na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml), antígeno de *T. cruzi* (150 µg/ml), BMDC ou BMDM infectados ou não na proporção 3 linfócitos para 1 macrófago ou célula dendrítica por 12 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi realizada marcação extracelular das células com MoAbs para as moléculas CD4 e CD8. Após o período de incubação, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytofix/Cytoperm por 20 minutos e em seguida lavadas com Permwash. Em seguida, as células foram incubadas com MoAbs anti-IFNγ (BD

Biosciences, EUA), lavadas e analisadas em aparelho FACSCanto (BD Biosciences, EUA) e a análise dos dados no programa FlowJo (TreeStar Inc., EUA).

#### 4.6 Ensaios de proliferação celular

Baços de camundongos dos grupos experimentais foram processados e a suspensão de células foi marcada com Cell Trace Violet (CTV) ou Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) de acordo com as instruções do fabricante.

Para os ensaios de proliferação *in vitro*, os esplenócitos (1 x  $10^6$  células por poço) foram mantidos em cultura em meio completo por 72 horas a  $37^\circ$ C com 5% de CO<sub>2</sub> na presença de anti-CD3 (1 µg/ml), antígeno de *T. cruzi* (150 µg/ml), BMDC ou BMDM infectados ou não infectados na proporção 3 linfócitos para 1 macrófago ou célula dendrítica por 12 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram então marcadas com anticorpos específicos ao CD3, CD4, CD8 e CD19 para definir as populações celulares e a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo.

Para os ensaios de proliferação *in vivo*, os esplenócitos dos grupos experimentais (tratados com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 e/ou desafiados com *Trypanosoma cruzi* irradiado) foram marcados exclusivamente com CFSE ou com CTV e transferidos para camundongos não infectados intravascularmente (2,5 x 10<sup>7</sup> células por recipiente), que foram então infectados com 1 x 10<sup>7</sup> tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 intraperitonealmente logo após a transferência das células. Ao dia 3 após a transferência, os camundongos foram desafiados com mais 1 x 10<sup>7</sup> tripomastigotas. Seis dias após a transferência os camundongos receptores foram sacrificados e o baço, o sangue e os linfonodos foram coletados para a avaliação da proliferação por citometria de fluxo.

### 4.7 Análise da produção de citocinas por citometria de fluxo utilizando Cytometric Bead Array (CBA)

A dosagem de citocinas no sobrenadante de culturas de esplenócitos estimulados por 72 horas na presença ou não de anti-CD3 (1 μg/ml) ou antígeno de *T. cruzi* (150 μg/ml) foram realizadas pelo método CBA utilizando-se o kit *Mouse Th1/Th2/Th17* (IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ, TNF, IL-17A e IL-10) segundo protocolo do

fabricante (BD Biosciences, EUA). A aquisição foi realizada em aparelho FACSCanto (BD Biosciences, EUA) e os resultados gerados foram analisados com o software BD CBA Analysis Software.

#### 4.8 Análise via ELISA da produção de IFNy in vitro por esplenócitos

Para observar a capacidade de produção de IFN $\gamma$  *in vitro* dos esplenócitos de animais crônicos com diferentes dias de infecção, 5x10<sup>6</sup> células esplênicas foram incubadas em placas de 96 poços por 72 horas em meio RPMI completo, na presença ou não de anti-CD3 (1 µg/ml), antígeno de *T. cruzi* (125 µg/mL) ou com antígeno associado a αPDL1 (10 µg/ml), e o sobrenadante foi retirado para quantificação por ELISA pelo kit Mouse IFN-ELISA Set - BD OPteia (BD Biosciences, EUA), conforme protocolo do fabricante. A leitura das placas de ELISA foi realizada em aparelho Epoch (Biotek, EUA).

#### 4.9 Detecção por ELISA de anticorpos específicos ao T. cruzi

Anticorpos anti-T. cruzi foram detectados por ELISA. Inicialmente, placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 50 µL de antígeno de T. cruzi (20 µL/mL) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6 e incubadas durante a noite a 4 °C. Após lavagens sucessivas com PBS contendo 0.05% de tween 20 (Sigma-Aldrich), as placas foram saturadas por 60 minutos com 200 µL de PBS-tween contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich). Após as lavagens, foi adicionado em cada poço 100 µL de diluições descrentes de soro de camundongo crônico nas diluições padronizadas em PBS-tween contendo 1% de BSA. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas e a presença de anticorpos específicos contra o parasita revelada adicionando-se os anticorpos de cabra anti-IgM, anti-lg1 ou anti-lgG2a de camundongos conjugados a peroxidase (Southern Biotecnology Associates), diluídos 1:2000 em PBS-tween com 1% de BSA. Por fim, as placas foram novamente lavadas e 100 µL de Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado em cada poco. A reação foi bloqueada com acido cítrico 0.2 M e a leitura realizada através de um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 450nm.

#### 4.10 Real Time PCR – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O coração, o músculo estriado esquelético e/ou o baço dos camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* foram avaliados quanto à transcrição dos genes *pd1, pdl1* e *pdl2, ifng, tnfa, il10* e *tgfb*, assim como para quantificar o rRNA 18S de *T. cruzi*. A sequencia dos primers utilizados encontra-se na Tabela I. Para a normalização das amostras foi empregado como controle o gene endógeno codificador da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

A extração do RNA das amostras em Trizol (Life Technologies, EUA) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (kit RNeasy mini, Qiagen, Germantown, Maryland, USA). A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e cálculo da razão 260/280, respectivamente (Epoch, Biotek).

As amostras de RNA foram tratadas com DNAse (Deoxyribonuclease I, Invitrogen) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. A seguir, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 1 µg de RNA total, transcriptase reversa (Multiscribe, Applied Biosystems) e Random primers (Applied Biosystems) em presença de inibidores de RNAse (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL, a ordem e as etapas de incubação realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems).

As amplificações por PCR foram realizadas em triplicatas e utilizando 50 ng de cDNA por reação e reagentes padronizados para PCR em tempo real (Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems) adicionado dos conjuntos de primers específicos para os genes avaliados. As condições da reação foram descritas na literatura para os diferentes conjuntos de pares de primers. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplificação e a análise posterior pelo 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems, EUA).

Tabela I – Lista de primers utilizados para a quantificação dos genes relacionados via qRT-PCR.

GENE	SEQUENCIA 5'-3'
pd1	F – CGTGGCCTATCCACTCCTCA
	R - ATCCCTTGTCCCAGCCACTC
pdl1	F – AAATGGAACCTGGCGAAAGC
	R – GATGAGCCCCTCAGGCATTT
pdl2	F – GTCTTGGGAGCCAGGGTGAC
	R – TGAAAAGTGCAAATGGCAAGC
ifng	F – TCAAGTGGCATAGATGTGGAA
	R – TGGCTCTGCAGGATTTTTCATG
tnfa	F – CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA
	R – TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
il10	F – GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
	R – ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
tgfb	F – TGACGTCACTGGAGTTGTACG
	R – GGTTCATGTCATGGATGGTGC
18s t cruzi	F – TTGAATTGAGGGCCTCTAAGG
	R –AAAGGTACCACTCCCGTGTTT
gapdh	F – TGAAGCAGGCATCTGAGGG
	R – CGAAGGTGGAAGAGTGGGA

#### 4.11 Cultura de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC)

As células dendríticas (BMDC, "bone marrow-derived dendritic cell") utilizadas foram derivadas de precursores encontrados na medula óssea de camundongos C3H/HePAS, tratadas com tampão de lise e cultivadas por 12 horas na presença de meio RPMI completo (cRPMI) em placas de petri 96 x 21 mm. As células não aderentes foram retiradas e meio RPMI completo suplementado com GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL) foi adicionado a placa (Sigma Aldrich, USA). Após 5 dias em cultura, as células foram incubadas por 6 horas na presença ou na ausência de tripomastigotas de cultura da cepa Sylvio X10/4 na proporção de 3 parasitas por célula, lavadas com meio cRPMI para retirar os parasitas excedentes, que não infectaram ou não foram endocitados pelas BMDCs. Após 12 horas, a cultura foi tratada ou não com benzonidazol nas concentrações de 10 mM, 100 mM e RPMI para inviabilizar os

parasitas, e 1 x 10<sup>6</sup> esplenócitos totais de animais não infectados ou animais crônicos foram adicionados à cultura, e avaliados quanto à sua capacidade de proliferação e produção de IFNγ.

#### 4.12 Cultura de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM)

Os macrófagos utilizados foram derivados de precursores encontrados na medula óssea (BMDM, "bone marrow-derived macrophages") de camundongos C3H/HePAS. Após a extração da medula, as células foram mantidas em cultura com meio DMEM-F12 contendo soro fetal bovino (10%), piruvato (1%), glutamina (1%) e gentamicina (0,05%). No segundo dia de cultura, o sobrenadante da garrafa foi retirado e um novo meio contendo os componentes já citados, acrescido de sobrenadante de células L929 (20%), produtoras do fator de crescimento M-CSF, necessário para diferenciação de macrófagos foi adicionado. Após 3 dias de cultura neste meio, as células receberam mais meio com sobrenadante, sendo que no sétimo dia de cultura as células estão totalmente diferenciadas e prontas para o uso. As células foram removidas com PBS gelado e replaqueadas em placas de 96 poços.

#### 4.13 Exame Eletrocardiográfico

Os animais foram anestesiados através da injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/kg) e ketamina (100mg/kg) e contidos para a realização do eletrocardiograma. Os transdutores de sinal foram introduzidos na região subcutânea na derivação DII. Os espectros foram salvos por 2 minutos utilizando o aparelho Powerlab 4/35 (ADInstruments, NZ) conectados com um bio-amplificador de 2mV/s, com os filtros padronizados entre 0,1 e 100 Hz. Os dados obtidos foram analisados através do software LabChart (ADInstuments, NZ) quanto a arritmia, batimentos por minuto (BPM) e outros eventuais distúrbios aparentes no espectro obtido.

#### 4.14 Análise Histopatológica

A metade do coração de cada animal foi coletada, fixada em formalina 10% e processada no laboratório de histologia do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Seções do tecido embebidas em parafina foram coradas com hematoxilina-eosina ou

picro sirius e analisadas por microscopia óptica. A análise da fibrose foi realizada através do escaneamento dos cortes histológicos corados com picro sirius com microscópio Zeiss AxioScan.Z1 seguido de seleção das áreas apresentando fibrose no *software* ImageJ.

#### 4.15 Bloqueio da interação PD-1/PD-L1 in vivo

Camundongos C3H/HePAS na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 foram tratados com αPDL1 (clone MIH5), αPD1 (J43) (BioXCell, US) ou IgG normal de rato, por animal, a cada 3 dias, por 2 semanas (totalizando 5 doses, de 250 μg cada). Os animais foram sacrificados duas semanas após finalizado o tratamento, para análise dos diferentes parâmetros.

#### 4.16 Análise por citometria de fluxo das populações leucocitárias do coração

O coração foi macerado em 5 mL de meio RPMI, 3% soro bovino fetal e 0,5 mg/mL de Colagenase (Gibco, EUA) e incubado por 30 minutos à 37 °C. Células mononucleares obtidas do coração foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 3% soro bovino fetal inativado, o número de células foi estimado em câmara de Neubauer. A seguir, as células foram incubadas a 4 °C, por 20 minutos com anticorpos anti-CD16/32 (Fc Block) e, logo em seguida, adicionadas diferentes combinações dos anticorpos conjugados a fluorocromos e incubadas a 4 °C por 30 min.

Os MoAbs usados (BD Biosciences, EUA) foram: anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone RPA-T8), anti-CD19 (clone 1D3), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-PD1 (clone J43), anti-PDL1 (clone MIH5), anti-DX5 (clone HMα2), anti-CD103 (clone M290), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD62L (clone MEL14), anti-CD127 (clone SB199), anti-KLRG1 (clone 2F1), anti-CD49d (clone R1-2), anti-CD69 (clone H1.2F3) e controles isotípicos IgG e IgG2a. Após lavagem e ressuspensão das células em Tampão de Marcação, a aquisição foi realizada em aparelho FACSCanto (BD Biosciences, EUA) e a análise dos dados no programa FlowJo (TreeStar Inc., EUA).

#### 4.17 Irradiação de Trypanosoma cruzi

O processo de irradiação foi realizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em fonte de <sup>60</sup>Co (Gammacell, Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 4,29 kGy/hora). Foram irradiadas formas de cultivo de T. cruzi Sylvio X10/4 a 1 x 10<sup>7</sup> parasitas por mililitro de RPMI sem soro fetal bovino com 2kGy. Durante todos os procedimentos foi mantida uma amostra controle do lado de fora do irradiador. Após o processo de irradiação, as amostras foram lavadas antes de serem utilizadas. Os parasitas irradiados foram congelados em uma solução de soro bovino fetal inativado (volume final 50%) e DMSO (volume final 5%), mantidos a temperatura de -80 °C por 24 horas e nitrogênio liquido (-196 °C) até o momento do uso. A viabilidade do parasita irradiado foi observada através do teste de viabilidade com trypan blue, da proliferação in vitro com meio LIT e da invasão de células LLCMK2.

#### 4.18 Análise da carga parasitária no sangue e coração por cultura em meio LIT

A carga parasitária sistêmica e local (coração) dos animais crônicos infectados por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 foi determinada por cultura de alíquotas de 5  $\mu$ L e 1  $\mu$ L de sangue heparinizado (em quintuplicata) ou de macerado de tecido cardíaco (0,1 e 0,5 mg) em meio "Liver Infusion Tryptose" (LIT) a 29 °C, por 40 d, com exame semanal ao microscópio invertido para visualizar o crescimento de epimastigotas.

#### 4.19 Análise Estatística

Os resultados foram analisados com o *software* Prism 6 (GraphPad Inc.), utilizando-se testes Mantel-Cox, Teste T, One-way ANOVA ou Two-way ANOVA com pós teste de Tukey quando apropriado. A existência da distribuição normal foi confirmada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Diferenças entre dois grupos foram consideradas significativas quando o valor *p* foi <0.05.

**5 RESULTADOS** 

#### 5.1 Modelo murino crônico de doença de Chagas

Animais C3H/HePAS infectados com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 pode ser utilizados como um modelo de infecção crônica da doença de Chagas, que apresenta patologia cardíaca. Este modelo foi descrito por Marinho et al. em 2009, e foi escolhido para ser utilizado neste projeto devido a sua semelhança com o desenvolvimento da doença que ocorre em humanos. Para entender melhor a participação das moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2 neste modelo, observamos diferentes parâmetros relacionados a fase crônica da infecção.

Acompanhamos a sobrevivência dos animais infectados e de controles pareados da mesma idade. A longevidade dos animais crônicos é comprometida quando comparada com a de animais não infectados (Figura 7A). A patologia cardíaca foi avaliada quanto à intensidade do infiltrado celular através de análise histológica, à qual atribuímos "scores" equivalentes ao infiltrado inflamatório encontrados em cada região do coração (pericárdio, miocárdio e endocárdio). Os camundongos na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* apresentam grande variabilidade do infiltrado inflamatório entre os animais analisados, podendo haver ou não presença de ninhos de amastigotas (Figura 7B). Este aspecto se assemelha bastante com a patologia encontrada em humanos infectados com o parasita, que acarreta em divergentes acometimentos deste órgão vital.

Alterações funcionais do coração foram avaliadas através do exame eletrocardiográfico dos camundongos crônicos infectados. O espectro encontrado no grupo infectado também foi variável, assim como o observado para a patologia. Encontramos indivíduos com eletrocardiograma semelhante ao de animais não infectados, outros com diminuição na frequência (bradicardia) e/ou presença de extrasístole (Figura 7C). De maneira geral, o grupo crônico mostrou uma diminuição no número de batimentos por minuto (BPM) em relação ao grupo não infectado pareado (Figura 7D), mostrando que a infecção crônica leva a um acometimento funcional do coração.

Visando detalhar os elementos envolvidos na resposta imune, foram avaliados os tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório do coração na fase crônica da

infecção. Para isto, realizamos a padronização a extração das células do infiltrado inflamatório deste órgão, seguida de sua marcação para análise via citometria de fluxo. A proporção das principais populações celulares leucocitárias encontradas no coração foi comparada com o grupo controle, e foi possível observar que há um aumento principalmente de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no coração dos camundongos na fase crônica da infecção (Figura 7E). A expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 foi encontrada aumentada em células T, monócitos e células NK, indicando a inibição da resposta imune comandada por estas populações celulares (Figura 7F).





(A) Curva de sobrevivência associada a infecção crônica por *Trypanosoma cruzi*. (B) Histologia cardíaca com coloração de hematoxilina e eosina (H&E) apresentando variação na quantidade de infiltrado inflamatório cardíaco com eventual presença de ninhos de amastigotas. Barras com 50 μm. (C) Eletrocardiograma (ECG) de um animal controle (1) e três animais crônicos (2-4) com diferentes graus de arritmia. (D) Diminuição no número de batimentos cardíacos por minuto decorrente da infecção pelo parasita. (E) Proporção entre as diferentes populações celulares que infiltram o coração de camundongos controle (não infectados) ou aos 330 dias após a infecção. (F) Histogramas representativos da expressão das moléculas inibitórias PD-L1 e PD-1 nas diferentes populações celulares presentes no coração de animais controle (linha não preenchida) ou infectados (linha preenchida). Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*p<0.01.

Ainda em relação à expressão das moléculas inibitórias, avaliamos através de RT-PCR quantitativo em tempo real sua alteração no decorrer da infecção. No músculo estriado esquelético observamos um aumento da expressão do gene *pdl1*, mas não de *pd1 e pdl2*. No coração é possível observar uma tendência ao aumento de *pdl1* com grande desvio, que deve refletir a heterogeneidade na patologia cardíaca encontrada nos animais C3H/HePAS infectados com *T. cruzi* (Figura 8).





Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05. Os dados mostram a media  $\pm$  desvio padrão (n=13) de um experimento representativo de dois.

Para corroborar os dados de expressão gênica encontrados via qRT-PCR, analisamos por citometria de fluxo a presença das moléculas inibitórias PD-1 e PD-L1 nas diversas populações celulares presentes no coração e no baço. Como o esperado, as populações celulares analisadas (células T, monócitos, células NK, células B e células estruturais) apresentam um aumento na expressão das moléculas inibitórias (Figura 9 e Figura 7F), indicando uma regulação da resposta imune na fase crônica.

Figura 9 – Aumento da expressão das moléculas PD-L1 e PD-1 em células do coração e do baço de camundongos C3H/HePAS aos 330 dias a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4.



(A) Histogramas da expressão de PD-L1 e de PD-1 nas populações CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, DX5<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> que infiltram o coração e nas células estruturais (CD45<sup>-</sup>) deste órgão. (B) Histogramas da expressão de PD-L1 e de PD-1 nas mesmas populações celulares do baço. (C) Médias de

fluorescência de PD-L1 e PD-1 nas diferentes populações celulares que infiltram o coração de animais não infectados e animais cronicamente infectados. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media  $\pm$  desvio padrão.

Indicada a provável inibição da resposta imune pela presença das moléculas regulatórias PD-1, PD-L1 e PD-L2 na fase crônica da infecção experimental murina pelo *Trypanosoma cruzi*, o bloqueio desta interação parece promissor na retomada de mecanismos efetores do sistema imune em busca da eliminação do parasita causador da patologia.

#### 5.2 O tratamento com αPDL1

Camundongos C3H/HePAS infectados pela via intraperitoneal com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 aos 330 dias de infecção foram submetidos ao tratamento com o anticorpo monoclonal αPDL1 ou IgG controle. Estes camundongos receberam cinco doses de anticorpo na concentração de 250 µg/dose a cada 3 dias, do dia 330 ao dia 345 e quinze dias após o tratamento, ao dia 360, foram sacrificados para a coleta das amostras de interesse (Figura 10A).

#### 5.2.1 Parasitemia e patologia cardíaca

O tratamento com o anticorpo monoclonal αPDL1 não promoveu diferenças no peso do coração e do baço ou na celularidade do baço nos animais crônicos tratados com αPDL1 (Figura 10B).

# Figura 10 – O tratamento com αPDL1 não altera peso e tamanho do coração e do baço, assim como a celularidade do baço em camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



(A) Esquema mostrando o design experimental, no qual camundongos C3H/HePAS foram infectados com 1 x  $10^6$  formas de *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 e aos 330 dias de infecção, tratados via intraperitoneal com cinco doses de 250 µg de anticorpo  $\alpha$ PDL1 a cada 3 dias.

Quinze dias após o final do tratamento, os camundongos tiveram seus órgãos excisados e submetidos às análises de interesse. **(B)** Pesagem do coração e o baço de cada um dos animais experimentais, seguida da contagem da celularidade do baço. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media  $\pm$  desvio padrão.

Para avaliar mudanças relativas a presença do parasita, a parasitemia subpatente nos camundongos infectados e tratados com αPDL1 ou IgG controle foi estimada através da cultura de 5 µL de sangue em meio LIT, antes e após o tratamento. Este procedimento de amplificação se torna necessário frente à impossibilidade de contar os parasitas diretamente no sangue. Não foram encontradas diferenças significativas entre o inicio e o fim do tratamento ou entre os grupos avaliados (Figura 11A). A patologia cardíaca foi avaliada através do exame histopatológico, a qual atribuímos valores a quantidade de células infiltrando o pericárdio, miocárdio e endocárdio do ventrículo e do átrio, totalizando um valor (*score*) para cada animal. Este parâmetro também não apresentou diferenças significativas entre os grupos tratados (Figura 11B).

Figura 11 – O tratamento com  $\alpha$ PDL1 não altera a parasitemia subpatente ou a patologia cardíaca de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



(A) Porcentagem de culturas com 5  $\mu$ L de sangue positivas para *Trypanosoma cruzi* antes e após o tratamento com  $\alpha$ PDL1 e IgG controle. (B) Análise da intensidade do infiltrado inflamatório no coração dos camundongos tratados com  $\alpha$ PDL1 ou IgG controle. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media ± desvio padrão ou cada ponto representa um individuo e a linha a média do grupo experimental.

#### 5.2.2 Caracterização funcional e fenotípica de linfócitos T

Para verificar se houve alterações na resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, avaliamos a capacidade de produção de IFN $\gamma$  por esplenócitos sem estímulo, com  $\alpha$ CD3 e com antígeno de *T. cruzi* em animais não infectados e em animais crônicos tratados ou não com  $\alpha$ PDL1 ou IgG controle.

As células não estimuladas ou estimuladas com antígeno não apresentaram capacidade de produção de IFNv nenhum dos em grupos avaliados. Surpreendentemente, no estímulo *in vitro* com aCD3 observamos produção de IFNV discretamente inferior nas células CD4<sup>+</sup> do baço dos animais tratados com aPDL1 (em relação ao grupo tratado com IgG controle). Nas células CD8<sup>+,</sup> entretanto, não observamos diferenças na produção de IFNy após estímulo com αCD3 entre os grupos tratados (Figura 12).





Estratégia de gates utilizada para definir a subpopulação de células produtoras de IFNγ em células T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B). Frequência de células CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> (C) e células CD8<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> (D)

após 12 horas de cultura dos esplenócitos na presença de  $\alpha$ CD3, antígeno de *T. cruzi* ou sem estímulo. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media ± desvio padrão.

A capacidade efetora das células circulantes, presentes no sangue dos animais tratados, também foi avaliada através do estímulo *in vitro*. Apenas a resposta dos linfócitos CD4<sup>+</sup> dos animais tratados com  $\alpha$ PDL1 foi significativamente aumentada quando estimulada com  $\alpha$ CD3 quando comparados com o grupo controle, sem diferença significativa entre os grupos crônicos. Quanto às células CD8<sup>+</sup>, houve em relação ao grupo controle aumento mais significativo na produção de IFN $\gamma$  para os animais tratados com  $\alpha$ PDL1 do que para os tratados com IgG controle, no entanto, também não houve diferença significativa entre os grupos crônicos que receberam ou não o tratamento (Figura 13).

Figura 13 – Produção de IFN $\gamma$  em linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 tratados com o monoclonal  $\alpha$ PDL1.



(A) Dotplots representativos da produção de IFN $\gamma$  de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. (B) Frequência de células CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media ± desvio padrão.

Além da produção desta citocina, avaliamos também a capacidade de proliferação de esplenócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Houve pouca proliferação das células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> quando não estimuladas, não havendo diferenças significativas entre os grupos avaliados.

Já com antígeno de *T. cruzi*, observamos proliferação nas células T CD4<sup>+</sup> dos animais cronicamente infectados, sendo que o tratamento com o anticorpo monoclonal αPDL1 não foi capaz de aumentar a capacidade de proliferação destas células. Células CD8<sup>+</sup> não apresentaram proliferação ao antígeno após 72 horas em relação ao grupo não infectado, provavelmente devido à ausência de apresentação cruzada e/ou à demora no processamento e apresentação do antígeno *in vitro* (Figura 14A-C).





Definição da população CellTrace<sup>low</sup> e frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) esplênicos em proliferação (CellTrace<sup>low</sup>) cultivados por 72 horas, sem estímulo (-) ou estimuladas com antígeno de *T. cruzi* (Ag). (C) Definição da população CellTracer<sup>low</sup> e frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> esplênicos em proliferação (CellTracer<sup>low</sup>) em resposta a  $\alpha$ CD3. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*\*p<0.001. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), mostrando a media ± desvio padrão.

Além da caracterização funcional das células provenientes dos grupos experimentais, avaliamos se o fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos camundongos tratados apresentaram mudanças que pudessem ser atribuídas ao tratamento com o anticorpo αPDL1.

Inicialmente, avaliamos a porcentagem e o número total de células T dos grupos avaliados (Figura 15A-B). Enquanto a população de células T CD4<sup>+</sup> não mostrou alterações decorrentes do tratamento, o número total de células CD8<sup>+</sup> apresentou uma queda no grupo tratado com αPDL1 em relação ao grupo que recebeu IgG controle. Verificamos a expressão de CD69 nessas populações, que poderia representar uma melhora na ativação dos linfócitos decorrente do tratamento, mas não foram observadas alterações significativas na porcentagem ou no número total de células CD69<sup>+</sup>.

O perfil das células T foi definido através dos marcadores CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> e CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>, representando respectivamente células de memória central, de memória efetora/efetoras e células naïve. Era esperado que as células efetoras e/ou de memória efetora dos animais tratados com o anticorpo monoclonal αPDL1 aumentassem em frequência ou número em relação ao grupo de animais tratados com IgG controle devido à sua possível reativação frente ao bloqueio da interação inibitória. Contudo, não houve aumento no número total destas células tanto para as populações de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. As populações de células CD4<sup>+</sup> naïve e de memória central também não apresentaram alterações entre os grupos analisados decorrentes do tratamento, apesar de haver uma tendência a uma maior frequência de células naïve CD4<sup>+</sup> no grupo tratado com αPDL1 comparado ao grupo tratado com IgG controle. Desta forma, concluímos que o tratamento com αPDL1 não foi suficiente para alterar a proporção ou o número das células de memoria ou células efetoras entre as células T do baço (Figura 15).

Figura 15 – O fenótipo das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 não é alterado pelo tratamento com  $\alpha$ PDL1.



(A) Porcentagem e número total das populações de células T CD4<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. (B) Porcentagem e número total das populações de células T CD8<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \* (p<0.05), \*\* (p<0.01), \*\*\*p<0.001. Dados representativos de dois experimentos independentes (n=13), cada ponto representa um individuo e a linha a média do grupo experimental.

Avaliamos também a expressão de PD-L1 após o tratamento com αPDL1 e observamos redução na fluorescência desta molécula nas células B, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> esplênicas. Observamos também uma redução significativa na frequência da subpopulação de células B esplênicas com alta expressão de PD-L1 (B220<sup>+</sup>PDL1<sup>high</sup>) (dados não mostrados).

As análises das células do baço e do sangue periférico, assim como a patologia ou a parasitemia dos animais crônicos não mostraram uma melhora nos parâmetros avaliados decorrentes do tratamento αPDL1. Como este anticorpo monoclonal bloqueia as interações inibitórias entre PD-L1 com PD-1 e CD80, mas não entre PD-1 e PD-L2, também inibitória, iniciamos o tratamento associando os anticorpos αPDL1 e αPD1 após padronizar um ensaio para estimular células T CD8<sup>+</sup> *in vitro*.

#### 5.3 Padronização de ensaio para estímulo específico de células T CD8<sup>+</sup> in vitro

Em nossos experimentos, realizamos o estímulo policional dos esplenócitos totais através de seu cultivo com αCD3 para obter informações sobre a sua capacidade de proliferação e produção de citocinas. Como estímulo específico, utilizamos antígeno de *T. cruzi* capaz de induzir a resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mas não de células CD8<sup>+</sup> devido à ausência de uma célula apresentadora de antígeno na cultura e co-estímulo. Com base nesta falta, buscamos uma forma de realizar a apresentação de antígenos específicos no contexto do MHC de classe I, para que possamos avaliar no próximo tratamento a influência do bloqueio de PD-1 e PD-L1 para a resposta das células citotóxicas.

Para padronizar um estímulo específico *in vitro* para as células CD8<sup>+</sup>, realizamos a infeção de células dendríticas (BMDC) e macrófagos (BMDM) derivados de células retiradas da medula óssea de animais C3H/HePAS com *T. cruzi Sylvio* X10/4. Para evitar a proliferação excessiva do parasita que poderia danificar as células da cultura, tratamos estas células com benzonidazol, que causa a morte do parasita *in vitro*. Dentre as diversas doses de benzonidazol avaliadas, observamos maior capacidade de indução de resposta por células dendríticas infectadas tratadas com 10mM de benzonidazol, concentração que foi adotada para a realização de experimentos posteriores (dados não mostrados).

A capacidade de produção de citocinas nas culturas de esplenócitos estimuladas com APCs infectadas foi avaliada via marcação intracelular de citocinas ou análise do sobrenadante (através de ELISA para IFNγ). Além desta avaliação, a proliferação de esplenócitos totais de animais não infectados (0d) e animais crônicos (460 dpi) foi estimada nestas culturas para verificar se o estímulo dos esplenócitos com as células

dendríticas infectadas seria diferencial para demonstrar a capacidade da resposta dos esplenócitos dos animais crônicos, que não tinha sido possível avaliar em nossos experimentos anteriores frente ao estímulo com antígeno de *Trypanosoma cruzi* (Tc Ag).

A marcação intracelular de IFNγ de células T CD8<sup>+</sup> nos diferentes estímulos realizados e sua proliferação não apresentou resultados significativos que permitissem avaliar a resposta diferencial dos animais crônicos tratados em relação ao estímulo realizado com antígeno de *T. cruzi* (Figura 16A-B). No entanto, foi possível observar no sobrenadante das culturas as 72 horas que o estímulo realizado com células dendríticas infectadas (iBMDC) aumenta a capacidade de produção de IFNγ dos esplenócitos dos animais crônicos, apesar de aumentar consideravelmente também a capacidade de resposta de esplenócitos de animais não infectados (Figura 16C), indicando que a padronização permitiria avaliar esta citocina no sobrenadante das culturas dos esplenócitos dos animais crônicos.

### Figura 16 – Avaliação da resposta imune funcional de células T CD8<sup>+</sup> especificas frente ao estímulo com células dendríticas infectadas com *Trypanosoma cruzi*.



(A) Proliferação das células CD8<sup>+</sup> de animais cronicamente infectados por T. cruzi no cocultivo com células dendríticas não infectadas (BMDC), células dendríticas infectadas com T. cruzi (iBMDC), culturas sem estímulo (RPMI) e com  $\alpha$ CD3. (B) Marcação intracelular de IFN $\gamma$  em células CD8<sup>+</sup> sem estímulo (RPMI), com antígeno de T. cruzi (Ag Tc), com  $\alpha$ CD3 e no cocultivo com células dendríticas infectadas ou não infectadas. (C) Avaliação da capacidade de produção de IFN $\gamma$  de esplenócitos de animais não infectados (0d) e animais crônicos (460 dpi) com antígeno de T. cruzi solúvel (Tc Ag) e células dendríticas infectadas e tratadas com benzonidazol (iBMDC+10mM). Diferenças significativas (One-way ANOVA) entre os grupos foram representadas por \*\* (p<0.01) e \*\*\* (p<0.001). Os dados são representativos de dois experimentos independentes, experimento, mostrando a media ± desvio padrão.

#### 

Camundongos C3H/HePAS infectados pela via intraperitoneal com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 aos 330 dias de infecção foram submetidos ao tratamento com a associação dos anticorpos monoclonais  $\alpha$ PDL1 e  $\alpha$ PD1 ou IgG controle. Estes camundongos receberam cinco doses dos anticorpos na concentração de 250 µg/dose a cada 3 dias, do dia 330 ao dia 345 e quinze dias após o tratamento e ao dia 360 foram sacrificados para a coleta das amostras de interesse (Figura 17A).

### 5.4.1 Parasitemia e patologia cardíaca de camundongos crônicos tratados com αPDL1 e αPD1

O tratamento dos camundongos cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* com os anticorpos monoclonais αPDL1 e αPD1 não promoveu diferenças no peso do coração e do baço, assim como na celularidade do baço nos animais crônicos tratados (Figura 17B).

Figura 17 – O tratamento com os anticorpos  $\alpha$ PDL1 e  $\alpha$ PD1 também não promove alteração do peso e tamanho do coração e do baço, assim como o número de esplenócitos em camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



(A) Esquema mostrando o design experimental, no qual camundongos C3H/HePAS foram infectados com 1 x  $10^6$  formas de *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 e aos 330 dias de infecção, foram tratados intraperitonealmente com cinco doses de 250 µg de anticorpo  $\alpha$ PDL1 e 250 µg de anticorpo  $\alpha$ PD1 a cada 3 dias. Quinze dias após o final do tratamento, os camundongos tiveram seus órgãos excisados e submetidos às análises de interesse. (B) Peso do coração e o baço dos grupos experimentais, seguida da celularidade do baço. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados. Os dados mostram a media ± desvio padrão (n=13) de um experimento.

A parasitemia subpatente dos camundongos submetidos ao tratamento não apresentou alterações significativas quando comparamos o cultivo do sangue antes e após o tratamento ou entre os grupos avaliados (Figura 18A). Não houve diferença na patologia cardíaca, que foi avaliada através da quantidade de células infiltrando o tecido cardíaco ou na porcentagem de área apresentando fibrose em relação a área total do corte histológico (Figura 18B-C).

Figura 18 – O tratamento com αPDL1 associado a αPD1 não altera a parasitemia subpatente ou a patologia cardíaca de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



(A) Porcentagem de culturas com 5  $\mu$ L de sangue positivas para *Trypanosoma cruzi* antes e após o tratamento com  $\alpha$ PDL1 associado a  $\alpha$ PD1, ou IgG controle. (B) Scores atribuídos ao infiltrado cardíaco inflamatório após o tratamento com  $\alpha$ PD1/ $\alpha$ PDL1 ou IgG. (C) Porcentagem de fibrose no coração dos grupos experimentais calculada sobre a área total do corte histológico do coração corado com Picro Sirius. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*p<0.01. Os dados mostram a media  $\pm$  desvio padrão (n=14) de um experimento.

# 5.4.2 Caracterização funcional e fenotípica de linfócitos T de camundongos crônicos tratados com αPDL1 e αPD1

Dentre as alterações funcionais em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, analisamos sua capacidade de produção de IFN $\gamma$  *in vitro* quando estimulados com  $\alpha$ CD3, células dendríticas não infectadas ou infectadas com *Trypanosoma cruzi* tratadas com benzonidazol, como descrito anteriormente. Tanto esplenócitos como células do sangue dos camundongos tratados com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 não apresentaram aumento da capacidade de produção de IFN $\gamma$  quando comparados com o grupo tratado com IgG controle (Figura 19A-D).

Verificamos também se houve melhora na reposta proliferativa das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço dos animais submetidos ao tratamento através do ensaio de proliferação *in vitro*. Não observamos diferenças na proliferação dos linfócitos dos grupos crônicos relacionados ao bloqueio da interação PD-1/PD-L1 quando mantidos em cultura sem estímulo (NS) ou com antígeno (Ag) (Figura19E), assim como quando cultivados com αCD3 (dados não mostrados).

Avaliamos a quantidade de IFNγ produzida pelas células do baço dos grupos experimentais mantidas em cultura por 72 horas com antígeno, células dendríticas ou células dendríticas infectadas e tratadas com benzonidazol através da quantificação desta citocina por ELISA no sobrenadante (Figura 19F). O tratamento com os anticorpos monoclonais αPD1 e αPDL1 não promoveram um aumento significativo na produção de IFNγ dos esplenócitos frente aos estímulos observados *in vitro*.

Figura 19 – O tratamento com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 não induz alterações funcionais em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço ou do sangue de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



Análise da porcentagem de células produtoras de IFN $\gamma$  frente ao estímulo com  $\alpha$ CD3, células dendríticas não estimuladas (DC), células dendríticas infectadas (iDC) ou sem estímulo (NS) após 12 horas de cultivo. (A) CD4<sup>+</sup> e (B) CD8<sup>+</sup> do baço ou (C) CD4<sup>+</sup> e (D) CD8<sup>+</sup> do sangue. (E) Porcentagem de esplenócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não estimulados ou estimulados com antígeno (Ag) que proliferaram (CellTrace<sup>low</sup>) *in vitro* 72 horas após o estímulo. (F) Quantificação por ELISA da produção de IFN $\gamma$  no sobrenadante das culturas mantidas por 72 horas. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Os dados mostram a media ± desvio padrão (n=14) de um experimento.

Em relação ao perfil das células T do baço dos camundongos tratados, não encontramos diferenças significativas na porcentagem e o número total de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> dos camundongos tratados, assim como nas células de memoria central,

células efetoras ou de memoria efetoras CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> entre os grupos avaliados (Figura 20A-B).

Figura 20 – O fenótipo das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 não é alterado pelo tratamento com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1.



(A) Porcentagem e número total das populações de células T CD4<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. (B) Porcentagem e número total das populações de células T CD8<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. Os dados mostram a media ± desvio padrão (n=14) de um experimento.

O tratamento dos camundongos cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* utilizando anticorpos monoclonais que bloqueiam tanto a molécula PD-1 como a molécula PD-L1, inibindo desta forma sua ligação, respectivamente, com PD-L1/PD-L2 e CD80, não alteraram significativamente a quantidade de leucócitos infiltrando o tecido cardíaco ou o dano deste órgão, assim como a parasitemia observada através do cultivo do sangue dos camundongos submetidos ao tratamento.

Recentemente Kamphorst, et al. (2017) descreveu que para um melhor funcionamento das células T exaustas relacionado ao tratamento com αPD1, é necessário também um co-estímulo via CD28 na presença de um estímulo específico, como o peptídeo correspondente ao TCR das células T exaustas. Tal estímulo poderia ser dado no contexto de reativação geral do sistema imunológico por uma infecção secundaria ou pelo tratamento com o peptideo, processo descrito em diferentes modelos experimentais como desafio (*challenge*), onde o peptídeo relacionado a infecção é adicionado juntamente com uma molécula co-estimulatoria, havendo reconhecimento e reativação das células T.

Na ausência de um peptídeo dominante ou subdominante derivado do modelo experimental utilizado, encontramos a alternativa de utilizar *Trypanosoma cruzi* irradiado. Para que pudesse ter utilizado, avaliamos se o parasita irradiado era capaz de infectar células mas não de replicar, não oferecendo desta forma perigo ao hospedeiro e fornecendo o estímulo e o co-estímulo necessário as células T exaustas.

# 5.5 Reestimulação da resposta imune especifica de camundongos crônicos utilizando o desafio com *Trypanosoma cruzi* irradiado

Para fornecer um estímulo via TCR que favorecesse a resposta imune sem prejudicar o hospedeiro da doença de Chagas, na ausência de um peptídeo eficiente para o modelo murino crônico utilizado, avaliamos a possibilidade da utilização de parasitas irradiados como desafio destes camundongos.

Inicialmente, avaliamos a viabilidade dos parasitas submetidos a irradiação (I), e observamos que há uma pequena perda na sobrevivência destes quando comparados a parasitas mantidos fora do irradiador (-) pelo período do tratamento. Para evitar a necessidade de irradiar os parasitas sempre imediatamente antes do tratamento dos grupos experimentais, avaliamos também a viabilidade do parasita irradiado e mantido em nitrogênio liquido (I+F). Após o descongelamento destes parasitas para a realização de experimentos posteriores, verificamos que o parasita não perde sua viabilidade quando comparado com parasitas irradiados não congelados (Figura 21A).

Para verificar se os parasitas submetidos a irradiação mantem sua capacidade de infecção e replicação, adicionamos parasitas não irradiados, irradiado e irradiados e congelados à cultura de células LLC-MK2. Não observamos tripomastigotas presentes no sobrenadante após 4 dias de cultura para aquelas infectadas com *Trypanosoma* irradiado (Figura 21B) apesar de encontrar células infectadas (Figura 21C-D). A capacidade de replicação do parasita irradiado também foi avaliada em meio LIT, a qual dispensa a infecção de células para que este possa realizar sua divisão. Não foram encontrados parasitas nas culturas nas quais foram adicionados parasitas irradiados 7 dias após seu inicio, enquanto culturas infectadas com *Trypanosoma cruzi* não irradiado apresentavam 100% de positividade (Figura 21E).

Figura 21 - Avaliação da utilização de *Trypanosoma cruzi* irradiado como antígeno específico no desafio de animais crônicos. (-) – parasita não irradiado, I – parasita irradiado e congelado (*frozen*).



(A) Análise da viabilidade do *Trypanosoma cruzi* através da coloração com Trypan blue. (B) Número de tripomastigotas viáveis presentes no sobrenadante da cultura de LLC-MK2 4 dias após a infecção destas células. (C) Coloração da cultura de LLC-MK2 com *panótico rápido* para observação das células infectadas contendo amastigotas. (D) Porcentagem de células LLC-MK2 infectadas. (E) Porcentagem de poços positivos para o parasita em culturas com meio LIT contendo o sangue de animais C3H/HePAS, 7 dias após a infecção. Diferenças significativas (ANOVA) entre os grupos foram representadas por \* (p<0.05), \*\* (p<0.01), \*\*\* (p<0.001). Os dados são representativos de três experimentos independentes, mostrando a media  $\pm$  desvio padrão.

Para verificar se as células dendríticas passam a expressar ou alteram a expressão de moléculas co-estimulatórias em resposta a infecção pelo parasita irradiado *in vitro* indicando sua provável capacidade de co-estímulo *in vivo* frente ao desafio com o parasita irradiado, diferenciamos DCs a partir de células da medula óssea e infectamos a cultura na proporção de 3 *T. cruzi* irradiados por célula. Observamos a mediana geométrica de fluorescência das moléculas CD40, CD80 e CD86 nestas células (Figura 22A-B), utilizando como controle positivo o aumento da expressão destas moléculas em células tratadas com LPS (dados não mostrados) e como controle negativo células não infectadas (RPMI).

Figura 22 – Expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas infectadas com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 irradiados.



(A) Mediana geométrica de fluorescência das moléculas CD40, CD80 e CD86 em células dendríticas infectadas com *T. cruzi* irradiado (iTC) ou não infectadas (RPMI). (B) Histogramas representativos da expressão destas moléculas. Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas no gráfico com o respectivo valor de p. Os dados são representativos de três experimentos independentes, mostrando a media  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados mostram que células dendríticas infectadas *in vitro* por *T. cruzi* irradiado aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias, o que indica que estas células seriam *in vivo* capazes de auxiliar na restauração da resposta imune na terapia utilizando os anticorpos αPD1 e αPDL1.

#### 5.6 Padronização do ensaio de proliferação in vivo

Em busca de um estímulo que permitisse observar a alteração funcional relativa a capacidade de proliferação de linfócitos T específicos ao *Trypanosoma cruzi* na ausência de peptídeos que possibilitem a detecção destas células devido ao modelo experimental utilizado, padronizamos um ensaio de proliferação *in vivo*, mantendo o ambiente de infecção assim como todas as citocinas associadas ao desenvolvimento da resposta imune, diferente dos ensaios de proliferação comuns realizados *in vitro*.

Para isto, coletamos os esplenócitos obtidos dos camundongos infectados tratados ou não tratados, marcamos as células do baço de cada grupo experimental separadamente com um corante de rastreamento da divisão (CFSE ou CTV), obtendo desta forma células marcadas com CTV provenientes dos camundongos tratados e células marcadas com CFSE provenientes de camundongos não tratados. As células marcadas foram cotransferidas via intravenosa (i.v.) para um camundongo não infectado, que foi então submetido a infecção com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 via intraperitoneal (i.p.). Após 3 dias, os camundongos receberam uma nova infecção com o parasita, e no dia 6 após a transferência das células, o baço, os linfonodos (inguinais, axilares, mediastinais e cervicais) e o sangue dos camundongos receptores foram coletados.

A análise das células dos camundongos doadores (tratados ou não tratados) foi realizada através da seleção de todas as células marcadas com CFSE e/ou CTV, incluindo células que houvessem diluído em qualquer proporção o corante devido a falta de um marcador congênito que permitisse isolar as células transferidas. Excluindo desta forma as células dos camundongos receptores, prosseguiu-se à análise das populações celulares (CD4 ou CD8) dentre as células marcadas transferidas.

Dentro da população de células CD4 ou CD8, desta forma, era possível encontrar uma população de células marcadas com CTV, correspondentes as células transferidas dos camundongos que receberam o tratamento, e uma população de células marcadas com CFSE, correspondente as células dos camundongos não tratados. *Gates* individuais para cada uma das populações marcadas foram feitos, e

dentro de cada um deles foi possível avaliar a porcentagem de células que proliferaram (diluíram o corante) (Figura 23).



**Figura 23 – Avaliação da capacidade de proliferação de células provenientes de diferentes grupos experimentais** *in vivo.* (A) Esquema mostrando o design experimental, no qual camundongos C3H/HePAS foram infectados com 1 x 10<sup>6</sup> formas de *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 360 dias antes da coleta (d-360) dos esplenócitos para marcação com o corante utilizado para rastreamento de divisão, e ao dia 30 antes da coleta (d-30) foram submetidos ao tratamento diferencial do grupo experimental. Os esplenócitos foram extraídos (d0) e marcados individualmente com CFSE ou CTV, agregados e então transferidos para um camundongo C3H/HePAS não infectado. O camundongo receptor foi infectado com 1 x 10<sup>6</sup> formas de *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 no dia 0 e desafiado após 3 dias (d3). Após 6 dias, o baco, o sangue e os linfonodos do camundongo receptor foram coletados para análise da proliferação. (B) Estratégia de *gates* utilizada para avaliar a capacidade de proliferação *in vivo* de células provenientes de diferentes grupos experimentais doadores em um camundongo receptor.

Padronizado o ensaio e verificando seu funcionamento, o utilizamos em experimentos posteriores para mensurar alterações na capacidade da proliferação das células do baço de camundongos tratados frente a um estímulo especifico *in vivo*.

# 5.7 O tratamento com αPDL1 e αPD1 associado ao desafio com *Trypanosoma cruzi* irradiado

Camundongos C3H/HePAS infectados via intraperitoneal com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 aos 330 dias de infecção foram submetidos aos seguintes tratamentos: associação dos anticorpos monoclonais αPDL1 e αPD1 (αPD1/L1), associação dos anticorpos seguido do desafio com *Trypanosoma cruzi irradiado* (αPD1/L1+Tc), IgG controle (IgG) ou IgG com parasitas irradiados (IgG+Tc).

O esquema de tratamento com os anticorpos se manteve o mesmo dos experimentos anteriores, sendo que os camundongos desafiados receberam o parasita irradiado i.v. no primeiro dia do tratamento. Quinze dias após o fim do tratamento os camundongos foram sacrificados para a coleta das amostras de interesse (Figura 24A). Após a segunda dose do tratamento, buscamos por possíveis alterações nas porcentagens das células circulantes no sangue dos camundongos crônicos tratados (αPD+Tc) em relação aos não tratados (IgG). Não encontramos alterações nas porcentagens de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Figura 24B), assim como em células mielóides (dados não mostrados).

### 5.7.1 Parasitemia e patologia cardíaca de camundongos crônicos tratados com αPDL1 e αPD1 desafiados com parasita irradiado

O peso do coração e do baço, assim como a celularidade do baço não sofreram alterações frente a nenhum dos tratamentos realizados (Figura 24C-D).
Figura 24 – O tratamento de camundongos chagásicos crônicos com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 associado ao desafio com *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 irradiado não altera peso e tamanho do coração e do baço, assim como a celularidade do baço.



(A) Esquema mostrando o design experimental. Camundongos C3H/HePAS foram infectados com  $1\times10^6$  formas de *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 e aos 330 dias de infecção, foram desafiados através da via intravenosa com  $1 \times 10^6$  tripomastigotas da mesma cepa irradiados, além de tratados intraperitonealmente com cinco doses de 250 µg com os anticorpos  $\alpha$ PD1+ $\alpha$ PDL1 a cada 3 dias. (B) Após a segunda dose do tratamento, comparamos a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes no sangue dos camundongos crônicos não tratados (IgG) ou tratados e desafios ( $\alpha$ PD+Tc) àquelas que estavam presentes antes do inicio do tratamento nestes mesmos animais. (C-E) Quinze dias após o final do tratamento, os camundongos tiveram seus órgãos excisados, o coração e o baço foram pesados e a celularidade do baço avaliada via contagem em câmara de Neubauer. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados. \*\*\*p<0.001. Os dados mostram resultados agrupados de 3 experimentos independentes (n=3), mostrando a média ± desvio padrão.

A parasitemia subpatente dos camundongos submetidos aos tratamentos não apresentou diferença significativa quando comparamos o cultivo do sangue em meio LIT antes e após o tratamento entre os grupos avaliados, mas é possível observar uma tendência a diminuição na parasitemia nos camundongos que foram desafiados e tratados com αPD1/L1 (Figura 25A).

O score atribuído a patologia cardíaca, que condiz com a quantidade de leucócitos infiltrando o tecido cardíaco mostrou diferença significativa apenas entre o grupo não tratado (IgG controle) e o grupo tratado com os anticorpos monoclonais associado ao desafio com *T. cruzi* irradiado, indicando que o tratamento favorece a

migração com aumento da resposta imune local (Figura 25B). Provavelmente associado ao aumento do infiltrado inflamatório no coração, os camundongos submetidos ao tratamento com αPD1/L1+Tc apresentaram bradicardia exacerbada quando comparado o número de batimentos por minuto antes e após o tratamento (Figura 25C). A comparação entre o número de batimentos por minuto (BPM) anterior ao tratamento entre os grupos não tratado (IgG) e o grupo submetido ao tratamento com os anticorpos monoclonais associados ao desafio com o *T. cruzi* irradiado (αPD+Tc) não apresentou diferença estatística, enquanto a mesma comparação após o tratamento mostra a diminuição no BPM influenciada pelo tratamento (Figura 25D).

A transcrição das citocinas *il10, tgfb, tnfa e ifng* assim como o gene da região ribossomal 18S do *T. cruzi* (*tc*) foram estimados através de qRT-PCR no coração de cada grupo experimental aos quinze dias após o termino do tratamento. Houve uma grande variação entre as amostras avaliadas, provavelmente devido a irregularidade da distribuição do parasita no coração, não sendo possível observar uma diferença significativa nos camundongos tratados, apesar de haver uma tendência a diminuição do parasita e aumento na produção de *il10* (Figura 25E).

Figura 25 – O tratamento com  $\alpha$ PDL1 e  $\alpha$ PD1 associado ao desafio dos animais crônicos com *Trypanosoma cruzi* irradiado aumenta o infiltrado inflamatório cardíaco e diminui a frequência cardíaca.



(A) Porcentagem de culturas com 5  $\mu$ L de sangue positivas para o parasita antes e após o tratamento. (B) Scores atribuídos ao infiltrado cardíaco inflamatório. (C) Número de batimentos cardíacos por minuto (BPM) antes e após os tratamentos. (D) Comparação do número de batimentos por minuto (BPM) entre os grupos infectados não tratado (IgG) e tratado seguido do desafio ( $\alpha$ PD1/L1+Tc) antes e depois do tratamento. (E) Alteração da expressão dos genes *il10, tgfb, tnfa, ifn* $\gamma$  e *tc* em log na base 2 baseado no calculo de Ct utilizando GAPDH como gene endógeno e o grupo não tratado (IgG) como basal via qRT-PCR. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Os dados mostram resultados representativos de quatro experimentos independentes (n=3), cada ponto representa um individuo, com a média ± desvio padrão.

## 5.7.2 Influencia do tratamento na produção de anticorpos específicos ao parasita

Observamos também possíveis variações na quantidade de anticorpos específicos ao *Trypanosoma cruzi* ocasionadas pelo tratamento. Para isto, coletamos o soro dos camundongos antes e após o tratamento e quantificamos anticorpos do tipo IgM, IgG1 e IgG2a via ELISA. Não foi possível observar alterações nas quantidades de

IgM e IgG2a-especificas no soro dos camundongos antes e depois do tratamento em nenhum dos grupos avaliados (Figura 26A-B). No entanto, houve um aumento significativo na quantidade do anticorpo do tipo IgG1 ocasionado pelo tratamento com os anticorpos  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 associados ao parasita irradiado (Figura 26C). Este aumento também foi expressivo quando comparamos a quantidade de anticorpos IgG1 entre o soro dos camundongos não tratados (IgG) com o dos camundongos tratados ( $\alpha$ PD+Tc) (Figura 26D), indicando que estes anticorpos provavelmente auxiliam na internalização de parasitas circulantes.

Figura 26 – Avaliação dos anticorpos IgM, IgG2a e IgG1 específicos ao *T. cruzi* nos camundongos não infectados, na fase crônica não tratados (IgG) ou tratados com anticorpos  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 associados ao desafio com *T. cruzi* irradiado.



Quantificação de anticorpos específicos ao *T. cruzi* do tipo (A) IgM (B) IgG2a ou (C) IgG1 antes e após o tratamento (D) Comparação entre a quantidade de IgG1 no soro de camundongos crônicos que receberam IgG controle (IgG) ou os anticorpos  $\alpha$ PD1/ $\alpha$ PDL1 e parasitas irradiados ( $\alpha$ PD+Tc) 15 dias após o termino do tratamento. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados e expressas no gráfico. Os dados mostram resultados representativos de quatro experimentos independentes (n=3), mostrando a média ± desvio padrão.

## 5.7.3 Caracterização funcional e fenotípica de linfócitos T

A produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  por células T foi analisada *in vitro* após o tratamento sob estímulo de  $\alpha$ CD3 e antígeno de *T. cruzi* (Ag) para as células do baco, e com  $\alpha$ CD3 para as células circulantes do sangue. Não observamos diferenças significativas entre os grupos tratados e os animais crônicos não tratados em relação a produção destas citocinas individualmente ou sua coprodução por células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> do sangue ou do baço (Figura 27A-B).

Figura 27 – A produção *in vitro* de IFNγ e TNFα não mostrou aumentos *in vitro* em decorrência dos tratamentos utilizados *in vivo* na tentativa de reestimulação dos linfócitos do baço ou do sangue de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.



Análise da porcentagem de células produtoras de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  ou ambos frente ao estímulo com  $\alpha$ CD3, ou antígeno de *T. cruzi* (Ag) após 12 horas de cultivo. **(A)** CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço ou **(B)** CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \* (p<0.05). Os dados mostram resultados representativos de quatro experimentos independentes (n=3), mostrando a média ± desvio padrão.

Analisamos também a produção de citocinas dos grupos tratados através do cultivo das células do baço dos camundongos por 72 horas com ou sem estímulo por antígeno de *T. cruzi,* seguido da análise de seu sobrenadante através de citometria de

fluxo (*Cytometric Bead Array – CBA*) para a detecção de citocinas relacionadas a resposta do tipo Th1, Th2 e Th17.

Através deste ensaio, observamos um aumento na produção da citocina IL-4 e IL-10 no sobrenadante da cultura dos esplenócitos de camundongos tratados com os anticorpos monoclonais αPD1 e αPDL1 que foram desafiados com *Trypanosoma cruzi* irradiado (αPD1/L1+Tc) em relação ao grupo crônico não tratado (IgG). A citocina IL-4 indica uma interferência na resposta típica Th1 contra o parasita, induzindo um perfil mais polarizado ao tipo Th2, com aumento na produção de IL-10 (Figura 28).

Figura 28 - Comparação do padrão de citocinas secretadas (IFN $\gamma$ , IL6, IL4, IL2, TNF $\alpha$ , IL17A, IL10) no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais.



Cultura de esplenócitos totais de camundongos não infectados (Control), tratados com IgG controle (IgG), tratados com IgG controle e desafiados com *Trypanosoma* irradiado (IgG+Tc), tratados com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 ( $\alpha$ PD1/L1), e tratados com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 e desafiados com *Trypanosoma* irradiado ( $\alpha$ PD1/L1+Tc), 72 horas após o início do estímulo. NS – Não estimuladas, Ag – Estimuladas com antígeno de *T. cruzi*. Diferenças significativas (Two-way ANOVA) entre os grupos foram representadas por \* (p<0.05). Os dados são de um experimento (n=3), mostrando a media ± desvio padrão.

A proliferação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço do dos animais submetidos ao tratamento foi avaliada através do ensaio de proliferação *in vitro* e *in vivo*. Nas culturas celulares, não observamos diferenças na proliferação dos linfócitos do grupo crônico

não tratado em comparação com os grupos desafiado (IgG+Tc), tratado com anticorpos monoclonais  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1 ( $\alpha$ PD1/L1), ou tratados com os mAb e desafiados com *Tc* ( $\alpha$ PD1/L1+Tc) quando mantidos em cultura sem estímulo (NS) ou com antígeno (Ag) (Figura 29), assim como quando cultivados com  $\alpha$ CD3 (dados não mostrados).







(A) Porcentagem de células T CD4<sup>+</sup>CellTrace<sup>low</sup> e (B) CD8<sup>+</sup>CellTrace<sup>low</sup> provenientes de cultura, estimulados por 72 horas, apenas com RPMI (NS) ou estimuladas com antígeno de *T. cruzi* (Ag). Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*\*p<0.001. Os dados mostram resultados representativos de quatro experimentos independentes (n=3), mostrando a média  $\pm$  desvio padrão.

A proliferação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço dos animais submetidos ao tratamento também foi avaliada *in vivo*. A comparação entre a proliferação das células dos camundongos doadores encontradas no baço dos camundongos receptores do grupo não tratado (IgG) e do grupo tratado com os anticorpos monoclonais e desafiado com *Tc* (αPD1/L1+Tc) mostrou que células T CD4<sup>+</sup> não sofrem alterações na capacidade proliferativa devido ao tratamento, enquanto células T CD8<sup>+</sup> diminuem sua capacidade de proliferação quando submetidas ao bloqueio de PD-1 e PD-L1 seguida da reestimulação por *T. cruzi* irradiado (Figura 30A).

A mediana geométrica de fluorescência da molécula CD69 aparece mais alta no grupo crônico tratado com IgG controle nas populações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que não proliferaram (CFSE<sup>hi</sup>) em comparação as células provenientes do grupo tratado com αPD1/L1+Tc (CTV<sup>hi</sup>), indicando uma provável maior ativação destas populações

após sua transferência. Esta molécula também pode estar relacionada a tendência destas células à não recircular, o que corrobora o maior numero de células CD8<sup>+</sup> do grupo controle no baço. Não há diferença na expressão de CD69 nas células que passaram pelo processo de divisão e permaneceram no baço dentre os grupos avaliados (Figura 30B).

Figura 30 – Células T CD4<sup>+</sup> de camundongos desafiados com *T. cruzi* irradiado não apresentam diferenças na capacidade de proliferação quando tratadas com  $\alpha$ PD1 e  $\alpha$ PDL1, enquanto células T CD8<sup>+</sup> apresentam uma diminuição na sua capacidade proliferativa frente ao bloqueio da interação inibitória.



Esplenócitos totais de camundongos crônicos tratados com IgG controle (IgG) foram marcados com CFSE, enquanto esplenócitos obtidos de camundongos crônicos tratados com αPD1 e αPDL1 que foram desafiados com *T. cruzi* irradiado foram marcados com CellTrace Violet (CTV). As células foram cotransferidas para um camundongo receptor que recebeu uma nova infecção por *Trypanosoma cruzi*. A proliferação das células transferidas foi avaliada 6 dias após o reestimulo *in vivo*. (A) Porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> que diluíram o corante de rastreamento de divisão (Dye<sup>low</sup>) (B) Mediana geométrica de fluorescência da molécula CD69 nas células que não dividiram (CFSE<sup>hi</sup>/CTV<sup>hi</sup>) ou células que passaram pelo processo de divisão (CFSE<sup>lo</sup>/CTV<sup>lo</sup>) dentro das populações CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Os dados mostram resultados representativos de três experimentos (n=3-5), mostrando a média ± desvio padrão.

Os perfis das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos grupos submetidos aos tratamentos foram definidos através dos marcadores CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup> (naïve), CD44<sup>high</sup>CD127<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup> (memória central) e CD44<sup>high</sup>CD127<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> (memória

efetora). Dentre as porcentagens e números totais das populações analisadas, não encontramos diferenças significativas em relação ao grupo crônico não tratado nas células T CD4+ (Figura 31A). O aumento na porcentagem de células CD8<sup>+</sup> do grupo tratados com os anticorpos monoclonais e desafiados com *T. cruzi* irradiado em relação ao grupo que apenas recebeu o parasita irradiado não refletiu em um aumento no número total de células CD8<sup>+</sup> (Figura 31B).

Figura 31 – O fenótipo e o número total de células das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 não é alterado com o tratamento com anticorpos  $\alpha$ PDL1 e  $\alpha$ PD1 associado ou não ao desafio com *T. cruzi* irradiado.



(A) Porcentagem e número total das populações de células T CD4<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. (B) Porcentagem e número total das populações de células T CD8<sup>+</sup> avaliadas após o tratamento. Diferenças significativas foram analisadas entre os grupos avaliados, \*\*p<0.01. Os dados mostram resultados representativos de quatro experimentos independentes (n=3), mostrando a média  $\pm$  desvio padrão.

Em relação aos linfócitos encontrados no coração dos grupos crônicos, observamos um aumento na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> sem alterações significativas na população de células T CD8<sup>+</sup>. Ao caracterizar o perfil destas células, encontramos principalmente células que apresentam o perfil de memoria residente (T<sub>RM</sub>) expressando CD69<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>, fenótipo descrito para memória de células T em diferentes tecidos não linfoides e células CD69<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>, além de células de memoria efetoras (CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). Observamos dentre estas populações, um aumento na porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória efetoras nos grupos que receberam  $\alpha$ PD1,  $\alpha$ PDL1 e *T. cruzi* irradiado (Figura 32).

Figura 32 – Aumento na porcentagem de células de memória efetoras (CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que infiltram o coração dos animais crônicos tratados (αPD+Tc) em relação aos não tratados (IgG).



Análise das populações celulares (Live/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>) (A) Porcentagem e número total das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. (B) Porcentagem dos diferentes perfis das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os dados mostram dados agrupados de três experimentos independentes (n=3), cada ponto representa um individuo.

As análises avaliando a influencia do bloqueio da interação PD-1/PD-L1-2 e PD-L1/CD80, seguidas do desafio com *T. cruzi* irradiado mostram alterações mais expressivas nas células presentes no coração do que em células encontradas em órgãos linfoides, tanto em relação a quantidade como no fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como no funcionamento do órgão acometido, induzindo uma piora em seu desempenho através do aumento da bradicardia.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a doença de Chagas crônica não apresenta cura espontânea ou quimioterápica. Os tratamentos disponíveis atualmente, como o Benzonidazol e o Nifurtimox, não são efetivos e causam diversos efeitos colaterais, o que indica a necessidade de inovações terapêuticas que ofereçam melhores perspectivas para pessoas cronicamente infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Em busca de um modelo para avaliar estas alternativas na fase crônica, utilizamos camundongos C3H/HePAS infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4. Estes animais apresentam um aumento nos leucócitos que infiltram o coração, revalidando os resultados obtidos em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (ABEL, et al. 1993; HIGUCHI, et al. 1993; HIGUCHI, et al. 1997). O infiltrado leucocitário consiste principalmente em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células Ly6C<sup>+</sup>. Além de um infiltrado cardíaco característico de CCC, observamos que os camundongos com patologia crônica apresentam um acometimento variável na função cardíaca com diferentes graus de arritmia e diminuição no número de batimentos por minuto, semelhante ao encontrado na fase crônica da infecção em humanos.

Apesar de o coração apresentar infiltrado celular associado à infecção pelo parasita na fase crônica, trabalhos anteriores mostraram que na infecção pelo *T. cruzi*, as células T parasita-específicas perdem progressivamente suas funções efetoras no decorrer da infecção (ALBAREDA, et al. 2009), fenômeno conhecido como exaustão imunológica. Além do estímulo antigênico persistente em um local de inflamação crônica que causa perda da atividade funcional do infiltrado, células T exaustas aparecem principalmente em locais onde há imunossupressão. Por ser um órgão vital, o coração requere uma limitação da resposta imune para evitar danos excessivos. Esta limitação pode ser atribuída a diversos elementos tais como a tolerização de células T especificas a peptídeos do coração em linfonodos responsáveis por sua drenagem, pela expressão constitutiva de moléculas inibitórias, além da presença de células T reguladoras neste local (LICHTMAN, 2013).

A molécula PD-L1 é expressa no coração constitutivamente (FREEMAN, et al. 2000) inibindo a resposta imune neste local, o que provavelmente está relacionado com a alta sensibilidade deste órgão à danos e a incapacidade de renovação ou regeneração dos cardiomiócitos (MEDZHITOV, et al. 2012). A interação de PD-1 com

PD-L1 tem uma função essencial na limitação da imunopatologia, promovendo a resolução da inflamação e indução da homeostase local. Caso a resposta não seja controlada adequadamente, a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFNγ e o TNFα pode causar patologia severa, com indução exacerbada de morte das células infectadas (SHARPE; PAUKEN, 2017). Na infecção pelo *T. cruzi,* a inibição da resposta do infiltrado inflamatório no coração deve contribuir para a persistência do parasita (LEAVEY; TARLETON, 2003).

Diversas moléculas foram descritas na literatura como responsáveis pela perda progressiva da atividade efetora linfocitária. Dentre elas, as mais estudadas têm sido a molécula CTLA-4 (que interage com CD80 e CD86) e o conjunto de moléculas PD-1, PD-L1 e PD-L2. Na cardiomiopatia chagásica crônica a inibição da atividade efetora de linfócitos presentes no coração está diretamente relacionada com a expressão de CTLA-4 em pacientes (ARGUELLO, et al. 2013; ARGUELLO, et al. 2014). Pouco foi descrito, entretanto, sobre a interação inibitória de PD-1/PD-L1 na CCC.

Para verificar se nosso modelo experimental permitiria o estudo desta interação, avaliamos a expressão de *pd1*, *pdl1* e *pdl2* no coração dos animais cronicamente infectados por *T. cruzi*. Foi possível observar maior expressão de *pdl1* via qRT-PCR no coração e no músculo esquelético destes animais. O aumento da expressão de PD-1 e PD-L1 também foi verificado através de citometria de fluxo nas diferentes populações de leucócitos que infiltram o coração na fase crônica da infecção, acometendo tanto linfócitos como monócitos. Células CD45<sup>-</sup>, dentre as quais estão cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais também foram avaliadas. Estas células expressam mais PD-L1 em animais crônicos quando comparados com animais não infectados da mesma idade, o que corrobora os resultados obtidos via qPCR.

Relatos prévios indicam que é possível interferir na interação PD-1/PD-L1-2 através do tratamento com anticorpos monoclonais que bloqueiam seletivamente estas moléculas em modelos murinos de infecção viral e câncer (BLATTMAN, et al. 2009; FREEMAN, et al. 2006; JEONG, et al. 2008; JOSHI, et al. 2009; revisado por PAUKEN; WHERRY, 2015). O bloqueio desta interação consegue restaurar a atividade de células T CD8<sup>+</sup> especificas para o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) exaustas, induzindo sua proliferação, produção de citocinas e indução de morte, assim como diminuição da carga viral (BARBER, et al. 2006). Além de modelos murinos, o tratamento foi também estudado em primatas não humanos infectados com HSV (vírus da herpes simplex) ou HCV (vírus da hepatite C), assim como em humanos infectados com HCV, que apresentaram as mesmas alterações decorrentes do tratamento (FULLER, et al. 2013; GARDINER, et al. 2013; VELU, et al. 2009).

O anticorpo monoclonal αPDL1 foi inicialmente escolhido para o tratamento por ser capaz de bloquear além da interação de PD-L1 com PD-1, sua interação com CD80, ambas capazes de inibir a resposta de células T (YAMAZAKI, et al. 2002; YANG, et al. 2011). Prosseguimos ao tratamento dos animais crônicos com o anticorpo monoclonal αPDL1 visando o bloqueio de suas interações *in vivo*. Após o tratamento, analisamos células provenientes destes camundongos para verificar alterações funcionais e fenotípicas nas populações do baço e do sangue, tais como mudanças em sua capacidade de produção de citocinas. Avaliamos também os níveis de carga parasitária e do infiltrado cardíaco, comparando o grupo tratado com o αPDL1 e o grupo tratado com IgG controle.

A análise histopatológica do coração não mostrou diferenças na intensidade do infiltrado cardíaco entre os animais do grupo crônico tratado com  $\alpha$ PDL1 e os tratados com IgG controle. Também não observamos diferenças na parasitemia subpatente no sangue dos camundongos submetidos ao tratamento. As células do baço não apresentaram alterações na frequência ou no perfil de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como a expressão de CD69<sup>+</sup> nestas células, sugerindo que não houve aumento na ativação das células T nos animais tratados. Curiosamente, quando avaliamos a produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos do sangue periférico estimulados com  $\alpha$ CD3, foi possível observar diferença significativa apenas entre o grupo tratado com  $\alpha$ PDL1 e o grupo não infectado por células CD4<sup>+</sup>. Células B, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> esplênicas, apresentaram redução na mediana de fluorescência de PD-L1, indicando o bloqueio desta molécula pelo tratamento.

A ineficiência do tratamento com αPDL1 para potencializar a resposta imune pode estar relacionada a diversos elementos. Dentre eles, a expressão muito elevada de PD-L1 nos tecidos do animal crônico poderia tornar insuficiente as doses do anticorpo monoclonal usadas para o bloqueio desta molécula. Além disto, a presença de outras moléculas inibitórias da atividade de linfócitos T poderiam manter baixa a resposta imune, mesmo após o bloqueio da interação PD-1/PD-L1, havendo possível compensação inibitória com o aumento na expressão destas outras moléculas. Ainda, é possível que haja manutenção da exaustão/inibição das células respondedoras através da interação de PD-1 com PD-L2.

Apesar de os marcadores funcionais sugerirem a ineficiência do tratamento, por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de o tratamento ter causado a ativação das células previamente inibidas pela sinalização de PD-1, seguida de morte celular induzida por ativação (*activation induced cell death* – AICD) (SANCHO, et al. 2005). Além disto, os resultados indicam que o tratamento resultou em uma maior saída das células efetoras parasito-específicas do baço para atuar nos principais locais de infecção. Em nossos resultados, o aumento nas células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFNγ circulantes corrobora esta. A saída de células do baço de fato faria sentido no animal tratado com αPDL1, devido a um provável aumento da secreção de quimiocinas no local da inflamação, impossibilitando encontrar diferenças nestas células no baço. Esta ativação seguida de migração foi descrita por outros trabalhos que utilizaram o bloqueio desta interação inibitória, ou em modelos deficientes nas moléculas PD-1 ou PD-L1, nos quais se observou um aumento do infiltrado de células T nos locais de infecção (ANNAN, et al. 2010; LÁZAR-MOLNÁR, et al. 2010; PENG, et al. 2012).

Contudo, no aspecto técnico, nossa abordagem mostrou limitações. Não fomos capazes de observar diferenças na resposta funcional de células CD8<sup>+</sup>, população importante na resposta ao parasita. O antígeno de *T. cruzi* utilizado nos experimentos não foi adequado para induzir a proliferação de células CD8<sup>+</sup>. Acreditamos que isto ocorra pois o antígeno dificilmente atingiria as moléculas MHC de classe I de células dendríticas e macrófagos presentes em esplenócitos totais mantidos em cultura por apresentação cruzada (JOFRFRE, et al. 2012). A ausência da produção de IFNγ pelas células T do baço *in vitro* provavelmente ocorreu pelo mesmo motivo, não permitindo concluir sobre a alteração funcional destas células em decorrência ao tratamento.

A avaliação da capacidade de produção de citocinas pelas células CD8<sup>+</sup> específicas é comumente feita com peptídeos imunodominantes de *T. cruzi* e tetrâmetros específicos dos clones dominantes da resposta ao *T. cruzi* (TZELEPSIS, et

al. 2008), ou cocultura com APCs na presença do respectivo peptideo (ROLPH; RAMSHAW, 2003; WONG; PAMER, 2003). Frente à impossibilidade de isolar a população celular específica em nosso modelo experimental através da marcação com tetrâmeros, assim como estimular esta população com peptídeos imunodominantes, buscamos estimular as células T CD8<sup>+</sup> com APCs. Para isto, realizamos a padronização da diferenciação de macrófagos e células dendríticas a partir da medula óssea de animais C3H/HePAS, seguidas de sua infecção com *T. cruzi* Sylvio X10/4 e tratamento com benzonidazol, para que fosse possível a apresentação de peptídeos em MHC de classe I.

Através deste ensaio, conseguimos ampliar a produção de IFNγ no sobrenadante das células dos animais crônicos, com o mesmo efeito sobre as células dos animais não infectados. Esta observação não nos permite fazer inferências sobre a capacidade de resposta dos esplenócitos individualmente, já que a análise das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> individualmente não indicou proliferação ou produção de citocinas intracelulares. Acreditamos que a grande heterogeneidade do grupo crônico possa ter interferido nos resultados destes experimentos.

Realizamos o tratamento utilizando os anticorpos αPDL1 e αPD1, garantindo assim o bloqueio das interações inibitórias entre PD-1 e PD-L1, assim como sua ligação com PD-L2, além da interação de PD-L1 com CD80. Após o tratamento, avaliamos os parâmetros associados a patologia e a resposta imune, como realizado em experimentos anteriores. O tratamento utilizando ambos os monoclonais não alterou significativamente a patologia cardíaca e a parasitemia do grupo crônico tratado. Em relação à resposta de células T, o fenótipo das populações celulares CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do baço e do sangue não apresentaram mudanças. A utilização de um ensaio padronizado que forneceu um estímulo especifico capaz de estimular tanto células via MHC de classe II como via classe I, a produção de citocinas e a proliferação das células especificas ao *T. cruzi* também não apresentou mudanças em relação ao grupo não tratado. Por este motivo, não utilizamos este ensaio em experimentos posteriores devido à sua complexidade e a falta de diferenças nos resultados.

Devido à alta expressão de PD-1 e PD-L1 nas células que infiltram o coração encontradas no modelo utilizado neste estudo, assim como a disfunção encontrada em células infiltrando órgãos não linfoides em outros modelos experimentais (LEAVEY; TARLETON, 2003; SILVERIO, et al. 2012), esperávamos que as maiores alterações acontecessem no coração após o bloqueio da interação inibitória. A fim de entender a razão da ineficiência do tratamento na fase crônica da infecção pelo parasita, buscamos na literatura casos onde não foram observadas mudanças decorrentes da intervenção. Uma elucidação da ineficácia do tratamento utilizando anticorpos foi proposta por Arlauckas et al. (2017), no qual a utilização de αPD1 no tratamento tumoral, após gerar o bloqueio desta molécula em células T exaustas, é seguido da internalização dos anticorpos por macrófagos associados ao tumor via porção Fc. O "sequestro" do anticorpo utilizado no tratamento pelo macrófago diminui o seu tempo de atuação e abrevia a atividade destes anticorpos *in vivo*, impossibilitando a restauração da resposta inclusive para seu funcionamento (HULSMANS et al. 2017), é possível que o anticorpo não mantenha sua atuação neste local por longos períodos.

Além disto, o grupo de Kamphorst mostrou que para a recuperação da atividade efetora de células T inibidas via PD-1, também é necessária a sinalização via CD28, tanto na resposta imune ao câncer como na infecção viral, principalmente para a proliferação das células T CD8<sup>+</sup>. Pacientes que receberam o tratamento αPD1 apresentam melhora na proliferação principalmente em células CD8<sup>+</sup> que expressam CD28. Diante deste cenário, o bloqueio das interações inibitórias com os anticorpos utilizados anteriormente, associado ao reestimulo das células T via TCR e co-estímulo via CD28 deveria ser o suficiente para restaurar a resposta imune ao parasita.

Para fornecer estímulos via TCR e via CD28, exploramos a possibilidade da utilização de *Trypanosoma cruzi* irradiado, que poderia prover antígenos específicos do parasita e possivelmente aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígeno. O processo de irradiação pode levar a alterações variáveis em microrganismos dependendo da quantidade de radiação. É possível gerar parasitas que mantenham sua capacidade de infecção, mas não a de replicação, levando-os a esterilidade, impedindo consequentemente a infecção de novas células. Este processo favoreceria uma resposta imune similar a uma infecção natural sem prejudicar o hospedeiro. A utilização de parasitas irradiados para estimular o sistema

imune já foi estudada para *Toxoplasma gondii*, visando o desenvolvimento de uma vacina contra a toxoplasmose (ZORGI et al. 2016).

Para testar os efeitos da irradiação do *T. cruzi*, avaliamos se o parasita mantinha a capacidade de infecção na ausência de replicação. Este processo permitiria a exposição de peptídeos de *T. cruzi* e aumento de moléculas co-estimulatórias pelas células apresentadoras de antígeno em camundongos infectados com este parasita. Ensaios realizados *in vitro* mostraram que o parasita após ser irradiado perde pouca viabilidade, mantem a capacidade de infecção mas não de replicação, além de ser capaz de modular positivamente a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas derivadas de medula óssea. Estas informações indicam que o parasita irradiado pode ser uma ferramenta valida na tentativa de auxiliar na restauração resposta imune através de sua associação com o bloqueio das moléculas PD-1 e PD-L1 por anticorpos monoclonais, já que forneceria antígeno especifico, reestimulando as células de memória dos animais crônicos, além de co-estímulo pelo aumento da expressão de moléculas relacionadas à via do CD28 em APCs.

Prosseguimos ao tratamento dos camundongos crônicos associando o desafio com *T. cruzi* irradiado ao tratamento com os anticorpos αPD1 e αPDL1. Os camundongos submetidos ao desafio, que também tiveram a interação inibitória bloqueada com o uso dos anticorpos monoclonais, mostraram aumento da patologia cardíaca e bradicardia em relação a camundongos crônicos não tratados, enquanto apenas o desafio de camundongos ou seu tratamento não gerou diferenças estatísticas significativas. Há ainda uma tendência a diminuição da parasitemia associada ao tratamento completo, já que camundongos que receberam apenas os anticorpos ou o desafio não apresentaram tanta redução neste parâmetro. O bloqueio da interação inibitória associado ao desafio provavelmente favoreceu a resposta imune das células T presentes no coração logo após o tratamento, danificando cardiomiócitos e consequentemente prejudicando seu funcionamento.

A interação PD-1/PD-L1 também tem um papel crucial na regulação da resposta imune humoral, controlando a produção de anticorpos. Células B podem expressar PD-1, PD-L1 e PD-L2, influenciando a troca de classe e a maturação de afinidade no centro germinativo. Neste local, durante a interação com células T foliculares, há o contato com PD-1, tornando estas células sensíveis a sinalização por esta via. Plasmablastos também apresentam a expressão de PD-L1, fazendo com que estas células também estejam suscetíveis a inibição por esta via (SAGE, et al. 2015). Na infecção por *Plasmodium*, Butler e colaboradores (2011) mostram que o tratamento com anti-PD-1 aumenta significativamente a proteção mediada por anticorpos através do bloqueio desta via. Também observamos em nosso modelo que a produção de anticorpos específicos ao parasita do subtipo IgG1 pode ser aumentada através do bloqueio de PD-1 e PD-L1 na presença de *T. cruzi* irradiado, favorecendo a diminuição da parasitemia nos camundongos tratados.

A avaliação da atividade funcional dos linfócitos T do baço dos camundongos crônicos tratados quinze dias após o fim do tratamento não apresentou um aumento na produção de IFNγ *in vitro*. No entanto, houve um aumento na produção de citocinas encontradas no sobrenadante da cultura condizente com uma resposta imune mais regulatória, provavelmente equilibrando a resposta imune inflamatória gerada em um primeiro momento, logo após o inicio do tratamento. Não descartamos a possibilidade de que não foi possível observar a produção de citocinas pró-inflamatórias devido ao intervalo entre o fim do tratamento e a coleta das amostras. É possível que o aumento da resposta do tipo Th1 tenha acontecido nos primeiros dias após as primeiras doses com os anticorpos monoclonais e do desafio pelo *T. cruzi*, seguido de uma regulação para que não houvesse excesso de dano tecidual, resposta que foi possível detectar *ex vivo* na produção espontânea de citocinas pelas células do baço.

Neste mesmo cenário, as células T CD8<sup>+</sup> do baço de camundongos tratados com αPD1, αPDL1 e desafiados com *T. cruzi* irradiado apresentaram uma diminuição na capacidade de proliferação *in vivo* em comparação com células provenientes de camundongos crônicos não tratados. O aumento de células com o perfil de memória efetoras no coração dos animais tratados indica uma maior migração destas células para os órgãos mais acometido pela infecção, provavelmente precedido de proliferação das células especificas nos camundongos que receberam o tratamento. As células remanescentes no baço dos animais tratados podem se encontrar em um estado mais diferenciado por ter passado por um maior numero de divisões, o que diminuiria sua capacidade de proliferação frente ao reestimulo. O grupo de Wherry descreveu na infecção crônica por LCMV uma maior sensibilidade ao tratamento de um subtipo de células T com características "progenitoras", menos diferenciadas, que apresenta maior capacidade de proliferação e de produção de citocinas. Células diferenciadas terminalmente, encontradas em tecidos não linfoides, são menos sensíveis ao tratamento, tendo menor capacidade de proliferação e produção de citocinas. A proliferação das células com características progenitoras após o tratamento gera células terminalmente diferenciadas (PALEY, et al. 2012).

A resposta gerada após o tratamento pode também ter retomado a exaustão destas células nos camundongos tratados, dificultando a execução de uma nova resposta frente à transferência e ao reestimulo com *T. cruzi*. Além disso, é possível que o fato de estas células se encontrarem previamente à transferência em um microambiente imunoregulatório como indica o padrão de citocinas secretados pelas células do baço *in vitro*, tenha diminuído a capacidade de proliferação destas células. Não podemos descartar a possibilidade de que a menor proliferação encontrada em células T CD8+ provenientes dos camundongos tratados com αPD1/L1 e *T.* cruzi irradiado no baço dos camundongos receptores esteja relacionada à sua migração para o coração, o que indicaria mais uma vez a restauração da resposta imune destas células, previamente exaustas.

Avaliamos também o perfil das células presentes no coração dos camundongos submetidos aos tratamentos. Neste órgão, encontramos um aumento na população CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória efetora após o tratamento com αPD1 e αPDL1 seguidos do desafio por *T. cruzi* irradiado. Células com perfil de memória residente, que expressam CD69, não apresentaram mudanças em frequência, número ou perfil no coração do grupo tratado.

Uma vez que a inflamação cardíaca parece ter uma ação dualística, contribuindo para a lesão cardíaca ao mesmo tempo em que é fundamental para o controle do parasita, consideramos que a associação de anticorpos αPD1 e αPDL1 associada ao *T. cruzi* irradiado precisaria ser cuidadosamente verificada na presença de elementos que restaurassem o tecido cardíaco antes de ser utilizada como alternativa terapêutica. A redução da carga parasitaria, associada ao aumento da patologia cardíaca teria que ser contrabalanceada com um tratamento que auxiliasse na restauração do músculo

cardíaco, mantendo seu funcionamento adequado. Estudos recentes mostraram que 1% dos cardiomiócitos são regenerados anualmente, e detalhes deste processo estão sendo examinados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que o acelerem para tratar patologias cardíacas (BERGMANN, et al. 2009; SENYO, et al. 2013). Além da regeneração das células cardíacas, a inibição da fibrose, responsável por disfunção elétrica e mecânica, através da inibição de TGFß e IL11 poderia auxiliar na recuperação do funcionamento deste órgão. Desta forma, acreditamos que a associação de diferentes terapias com a testada em nosso trabalho poderia auxiliar no tratamento da doença de Chagas na fase crônica da infecção.

7 CONCLUSÃO

0 tratamento realizado os anticorpos monoclonais αPD1 е αPDL1, individualmente ou associados, permite bloquear estas moléculas in vivo, mas não leva a alterações funcionais ou fisiológicas, assim como na parasitemia ou na patologia cardíaca causada pela infecção crônica pelo T. cruzi. No entanto, o tratamento associado ao reestimulo das células T utilizando o parasita irradiado leva a um aumento na patologia cardíaca com acometimento funcional deste órgão, apesar diminuir a parasitemia. O aumento das células de memória efetoras no coração indica que o tratamento leva à reativação da resposta imune especifica. Desta forma, acreditamos que esta terapia poderia ser associada à outras que inibam a fibrose e auxiliem na regeneração de cardiomiócitos, protegendo a função essencial do coração.

## **REFERÊNCIAS\***

ABEL, L. C., et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-g response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**., v. 17, p. 99-107, 2001.

ABRAHAMSOHN, I.A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 31, p. 117–121, 1998.

AHMADZADEH, M., et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**., v. 114, n. 8, p. 1537-44, 2009.

AKBAY, E. A., et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. **Cancer Discov**., v. 3, p. 1355-1363, 2013.

ALBAREDA, M.C., et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4<sup>+</sup> T cells to immune senescence. **J Immunol**., v. 183, n. 6, p. 4103-4108, 2009.

ANNAN, J.E. et al. Regulation of T-cell Chemotaxis by Programmed cell death-Ligand 1 (PDL1) in dry eye-associated corneal inflammation. **IOVS**., v. 51, n. 7, p. 3418-3423, 2010.

ANEZ, N., et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 60, n. 5, p. 726-732, 1999.

ARAÚJO, A. F. et al. Genetic vaccination against experimental infection with myotropic parasite strains of *Trypanosoma cruzi*. **Med. of Inflamm**., 605023, 2014.

ARGUELLO, R. J. et al. Inhibitory receptors are expressed by *Trypanosoma cruzi*-Specific effector T cells and in hearts of subjects with Chronic Chagas disease. **Plos ONE.**, v. 7, n. 5, 2013.

ARGUELLO, R. J. et al. Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. **Plos Negl. Trop. Dis.,** v. 8, n. 8, 2014.

AUSTIN, J. W. et al. STAT3, STAT4, NFATc1 and CTCF regulate PD-1 though multiple novel regulatory regions in murine T cells. **J. Immun**., v. 181, p.4876-4886, 2014.

BARBER, D.L., et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, p. 682-687, 2006.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J. Exp. Med.,** v. 3, n. 1, 2013.

BERGMANN, O., et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, v. 324, p. 98-110, 2009.

BIXBY, L. M., TARLETON, R. L. Stable CD8<sup>+</sup> T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol**., v. 181, p. 2644-2650, 2008.

BLATTMAN, J.N. et al. Impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection. **J. Virol**., v. 83, n. 9, p. 4389-4394, 2009.

BUGEON, L. and DALLMAN, M. J. Costimulation of T Cells. Amer. J. of Resp. and Crit. Care., v. 162, p.164–168, 2000.

BUTLER, N.S. et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. **Nat. Immunol**., v. 13, n. 2, 2011.

BUTTE, M.J., et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 111-122, 2007.

CHEMNITZ, J.M., et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosinebased switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J Immunol**., v. 173, n. 2, p. 945-954, 2004.

CHEN L. et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. **Nat. Commun.**, v. 5, , n. 5241, 2014.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A., et al. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance of parasitespecific T cell responses in lymph nodes during the acute phase of infection. **Exp Parasitol.**, v. 70, p.164-174, 1990.

D'AVILA REIS, D. et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, p.192–200, 1993.

DIAS, J.C., et al. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. **Rev Soc. Bras. Med. Trop**., v. 41, n. 5, p. 505-506, 2008.

DOMINGUEZ, M. R. et al. Subdominant/Cryptic CD8 T Cell Epitopes Contribute to Resistance against Experimental Infection with a Human Protozoan Parasite. **Plos One.**, v. 6, n. 7, 2011.

DOSREIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz**., v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

FISCHER, E., et al. Gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology**., v. 65, n. 2, p.299-303, 1988.

FREEMAN, G.J. et al. Engagement of the Pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **JEM**., v. 192, n. 7, p. 1027-1034, 2000.

FREEMAN, G.J. et al. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-L1 ligand blockade. **JEM**., v. 203, n. 10, p. 2223-2227, 2006.

FULLER, M. J., et al. Immunotherapy of chronic hepatitis C virus infection with antibodies against programmed cell death-1 (PD-1). **Proc. Natl Acad Sci USA**., v. 110, p. 15001-15006, 2013.

GALLIMORE, A., et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virusspecific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. **JEM**., v. 187, n. 9, p. 1383-1393, 1998.

GARDINER, D., et al. A randomized, double-blind, placebo controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1) in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Plos One**., v. 8: e63818, 2013.

GONÇALVES DA COSTA, S.C. et al. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. **Histol Histopathol**., v. 17, p. 837-844, 2002.

GONG, A. Y. et al. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFNg induced B7-H1 expression in cholangiocytes. **J. Immunol**., v. 182, p.1325-1333, 2009.

GRISOTTO, M.G. et al. Most parasite-specific CD8<sup>+</sup> cells in *Trypanosoma cruzi*-infected mice are down-regulated for T-cell receptor-ab and CD8 molecules. **Immunology**., v. 102, p. 209-217, 2001.

GUTIERREZ, F.R., et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect. Immun**., v. 79, n. 5, p.1873-1881, 2011.

HAFALLA, J. C. R et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to Plasmodium-induced Acute Immune Pathology. **Plos Pathogens.**, v. 8, n. 2, 2012.

HIGUCHI, M. L. et al. Immunohistochemical characterisation of infiltrating cells in human chronic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 4233, p.157-160, 1993.

HIGUCHI, M. L. et al. Assocation of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 56, p. 485-489, 1997.

JEONG, H. et al. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatites C infection. **J. Leu Biol**., v. 83, p.755-764, 2008.

JIN, H.T., et al. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. Curr., v. 350, p. 17-37, 2011.

JOFFRE, O.P. et al. Cross presentation by dendritic cells. **Nat. Rev Immun**., v. 12, p. 557-569, 2012.

JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of disfuncional CD8<sup>+</sup> T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **Plos Pat**. v. 5(5): e100431. 2009.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 12, n. 29, 2010.

KAMPHORST, A. O. et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. **Science**, v. 355, p. 1423-1427, 2017.

KAO, C., et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. **Nat. Immunol.**, v. 1038, n. 7, p. 663-671, 2011.

KAYAMA, H., TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, v. 12, p. 511-517, 2010.

KEIR, M.E., et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **J Exp Med.**, v. 203, n. 4, p.883-895, 2006.

KIPNIS, T.L., et al. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, n. 1, p.602-605, 1981.

LÁZAR-MOLNÁR, E. et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. **PNAS**, v. 107, n. 30, p. 13402-13407, 2010.

LEAVEY, J.K., TARLETON, R. L. Cutting edge: dysfunctional CD8<sup>+</sup> T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol**., v. 170, n. 5, p. 2264-2268, 2003.

LEE, S.J., et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). **FEBS Let**., v. 580, n. 3, p. 755-762, 2006.

LESCURE, F.X., et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet**, v. 10, n. 8, p. 556-570, 2010.

LEWIS, M. D. et al. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. **Cell. Microbiol**., v. 18, n. 10, p.1429-1443, 2016.

LEWIS, M. D., KELLY, J. M. Putting infection dynamics at the heart of Chagas disease. **Tren in Paras**., v. 32, n. 11, p. 899-911, 2016.

LICHTMAN, A.H. The heart of the matter: Protection of the myocardium from T cells. **J Autoim.**, v. 45, p. 90-96. 2013.

LIDIANI, K. C. F., et al. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front. Microbiol.**, v. 8, p.1662-1669, 2017.

MACEDO, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem Inst Osw Cruz.**, v. 99, n. 1, p.1-12, 2004.

MARINHO, C. R. F. A infecção murina pelo clone Sylvio X10/4 de *Trypansoma cruzi*: um modelo para estudo da patogenia da doença de Chagas crônica. 149f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

MARINHO, C. R., et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2350-2357, 2004.

MARINHO, C. R., et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. **Microbes Infect**., v. 11, n. 13, p. 1037-1045, 2009.

MARIN-NETO, J. A., et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **Am Heart J.**, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARTIN, D. L., et al. CD8<sup>+</sup> T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**., v. 2, n. 8, e77, 2006.

MOSIG. J. M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. Med of Inflam., e912965, 2014.

MEDZHITOV, R. et al. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, p. 936-941, 2012.

MURRAY, P., WYNN, T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immunol**., v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

MILES, M. A. Letter: cloning *Trypanosoma cruzi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**., v. 68, n. 256, 1974.

NAVARRO, I. C. et al. MicroRNA Transcriptome Profiling in heart of *Trypanosoma cruzi* infected mice: parasitological and cardiological outcomes. **Plos Negl Trop Dis**., v. 9, n. 6, 3828, 2015.

NISHIMURA, H., et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity**, v. 11, n. 2, p. 141-151, 1999.

NOGUEIRA, N., COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, v. 143, n. 6, p. 1402-1420, 1976.

NOMAN, M. Z. et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1a, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated t cell activation. **J. Exp. Med.**, v. 211, p. 781-790, 2014.

OESTREICH, K.J., et al. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. J. Immunol., v. 181, n. 7, p. 4832-4839, 2008.

PALEY, M. A., et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. **Science**, v. 338, p. 1220-1225, 2012.

PALOMINO, S.A., et al. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, n. 6, p. 571-579, 2000.

PARSA, A. T. et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. **Nat. Med.**, v. 13, p. 84-88, 2007.

PAUKEN K.E., WHERRY, J. E. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. **Trends in Immun.**, v. 36, n. 4, 2015.

PENG, W. et al. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN-g inducible chemokines. **Cancer Res.**, v. 72, p. 5209-5218, 2012.

PEPPER, M. et al. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. **Immunity**, v. 35, p.583-595, 2011.

PEREIRA I. R. et al. Pentoxifylline Reverses Chronic Experimental Chagasic Cardiomyopathy in Association with Repositioning of Abnormal CD8<sup>+</sup> T-Cell Response. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 3, 2015.

PEREIRA-SEVERI, L.S. Papel das moléculas PD-1 e PD-L1 na regulação da resposta aguda dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> à infecção pelo *Plasmodium chabaudi*. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Inst. de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 69f. 2012.

PIRMEZ, R. S. Autoreactivity in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciênc e Cult**. v. 46, p. 418–422, 1994.

POSTAN, M., et al. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HeN- mice with two clones isolated from a common source. **Am J Trop Med Hyg**., v. 32, p.497-506, 1983.

RODRIGUES, M. M., et al. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 3, p. 220-223, 2009.

ROLPH, M.S., RAMSHAW, I.A. Interleukin-4-mediated downregulation of cytotoxic T lymphocyte activity is associated with reduced proliferation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells. **Microb and Inf**., v. 5, n. 11, p. 923-932, 2003.

SAGE, P. T, SHARPE, A. H. T follicular regulatory cells. **Immunol. Rev**., v. 271, p. 246–259, 2016.

SAKAGUCHI, S., et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains CD25. Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol**., v. 155, p.1151-1164, 1995.

SALLUSTO, F., et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708-712, 1999.

SANCHO, D. et al. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. **Trends in Immun.,** v. 26, n. 3, p. 136-140, 2005.

SATO, E. H. et al. CD8<sup>+</sup> cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1024–1030, 1994.

SAVINA, A., AMIGORENA, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. **Immun Rev.**, v. 219, p.143–156, 2007.

SCHENKEL, J.M., MASOPUST, D. Tissue-resident memory T cells. **Immunity**, v. 41, p. 886-897, 2014.

SHENYO, S. E., et al. Mamalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. **Nature**, v. 493, p. 433-437, 2013.

SHARPE, A. H., PAUKEN, K. E. The diverse function of the PD1 inhibitory pathway. **Nat Rev**., v. 12, p. 1-14, 2017.

SILVA, J. S., et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**., v. 63, n. 12, p. 4862-2867, 1995.

SILVEIRA, F. et al. Nono caso autocne da doença de Chagas registrado no estado do Para, Brasil. **Hil Med.,** v. 1, p.61-62, 1979.

SILVERIO, J.C. et al. CD8<sup>+</sup> T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-Elicited cardiomiopathy. **Plos Path.**, v. 8, n. 4, e1002645, 2012.

SONG, M.Y., et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. **J. Immunother**., v. 34, n. 3, p. 297-306, 2011.

SOUZA, A.P. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benzonidazole chemotherapy. **Parasitol Res**., v. 86, p. 800-808, 2000.

STARON, M. M. et al. The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8+ T cells during chronic infection. Immunity. v. 41, p. 802-814, 2014.

SUN, J., TARLETON, R.L. Predominance of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 161–169, 1993.

SPRENT, J. et al. T cell proliferation in vivo and the role of cytokines. **Phil Trans R Soc** Land., v. 355, p. 317-322, 2000.

Steinman, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. **APMIS**., v. 111, p. 675–697, 2003.

TAMBOURGI, D. V., et al. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. **Exp Parasitol**., v. 68, n. 2, p. 192-201, 1989.

TAMBOURGI, D. V. et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3656-3663, 1993.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5, p. 550-554, 2001.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Immunol., 1 v. 9, n. 4, p.430-434, 2007.

TEAGUE, R. M. et al. Proliferation and differentiation of CD8+ T cells in the absence of IL-2/15 Receptor B-chain expression or STAT5 activation. **J Immun**., v. 173, n. 5, p. 3131-3139, 2004.

TOPALIAN, S.L., et al. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. **Curr.** v. 24, n. 2, p. 207-212, 2012.

TZELEPSIS, F. et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of Parasite-Specific CD8<sup>+</sup> T cells leading to immunodominance. **J. Immunol**., v. 180, p. 1737-1748, 2008.

TZELEPSIS, F. et al. Distinct kinetics of effector CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naïve or vaccinated mice. **Inf and Immun**., v. 74, n. 4, p. 2477-2481, 2006.

UNDERHILL, D., GOODRIDGE, H. Information processing during phagocytosis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 7, p. 492-502, 2012.

VAGO, A.R., et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**., v. 348, n. 9031, p. 891-892, 1996.

VASCONCELOS, J. R., et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and Trans-sialidase. **Hum Gen Ther**., v. 15, p. 878-886, 2004.

VASCONCELOS J. R., et al. Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal a CD8+ T cell response: reversal by adenoviral vaccine. **Plos Path**., v. 8, n. 5, p. 699-712, 2012.

VELU V. et al. Enhancing SIV-specific immunity *in vivo* by PD-1 blockade. **Nature**, v. 456, p.206-210, 2009.

VELU, V. et al. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. **Retrovirology**, v. 12, n. 14, 2015.

VIRGILIO, F.S. et al. CD8+ T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development? **Med of Inflamm**. e243786, 2014.

VORON, T. et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. **J. Exp. Med.**, v. 212, p.139-148, 2015.

WILKE, C.M., et al. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferongamma. **Can Immun Immun**., v. 60, n. 11, p.1529-41, 2011.

WONG, P., PAMER, E.G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. **Annu. Rev. Immun.**, v. 21, p. 29-70, 2003.

WHERRY, E.J., et al. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 670-684, 2007.

WHO - World Health Organization. Weekly epidemiological record. v. 6, n. 90, p. 33-44, 2015.

YAMAZAKI, et al. Expression of Programmed cell death 1 Ligands by murine T cells and APCs. **J. Immunol**., v. 169, p. 5538-5545, 2002.

YANG, J. et al. The novel coestimulatory pathway PDL1:B7.1 is functional in inhibiting alloimmune response in vivo. **J. Immunol**., v. 187, n. 3, p. 1113-1119, 2011.

YOUNÈS-CHENNOUFI, A.B., et al. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4<sup>+</sup>). **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg**., v. 82, p. 84–89, 1988.

YOUNGBLOOD, B. et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8+ T cells. **Immunity**, v. 35, p.265-276, 2011.

ZAJAC, A.J., et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 12, p. 2205-2213, 1998.

ZANG, X., J.P. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. **Clin. Cancer Res**., v. 13, n. 18, p. 5271-5279, 2007.

ZORGI, N. E. et al. Immunity in the spleen and blood of mice immunized with irraditated *T. gondii* tachyzoites. **Med Microbiol Immun**., v. 205, n. 4, p.297-314, 2016.

ZHANG, L., TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis**., v. 180, p.480-486, 1996.