CHRISTIAN EMERSON ROSAS JORQUERA

**A INFLUÊNCIA DO DESAFIO COM O PARASITA SOBRE A
PATOLOGIA CARDÍACA DURANTE A FASE
CRÔNICA DA INFECÇÃO PELO *T. cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Imunologia).

**SÃO PAULO
2009**

CHRISTIAN EMERSON ROSAS JORQUERA

**A INFLUÊNCIA DO DESAFIO COM O PARASITA SOBRE A
PATOLOGIA CARDÍACA DURANTE A FASE
CRÔNICA DA INFECÇÃO PELO *T. cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

**SÃO PAULO
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rosas-Jorquera, Christian Emerson.

A influência do desafio com o parasita homólogo sobre a patologia cardíaca durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* / Christian Emerson Rosas Jorquera. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jose Maria Alvarez Mosig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia Celular.

Versão do título para o inglês: The influence of the challenge with the parasite on the heart disease during the chronic stage of infection by *T. cruzi*.

Descritores: 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Patologia cardíaca 4. Linfócito T CD8 5. Linfócito T CD4 6. I. Mosig, Jose Maria Alvarez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB18/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Christian Emerson Rosas-Jorquera.

Título da Dissertação: A influência do desafio com o parasita homólogo sobre a patologia cardíaca durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

Orientador(a): Jose Maria Alvarez Mosig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com o auxílio financeiro do FAPESP (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), projeto Número 06/50054-6.

Dedico esta dissertação

Aos meus Pais, Velimir e Mary, por
todo amor e apoio.

À “Mis Abuelos” queridos, Naldo e
Ruth, que desde sempre, sonharam os
meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Maria Álvarez Mosig (Pepe) pela oportunidade, confiança e principalmente paciência. Sem dúvida foi muito gratificante tê-lo não só como orientador, mas como educador e amigo.

À Profa. Maria Regina D'Império Lima pelas contribuições na realização deste trabalho e pelas agradáveis aulas de imunologia durante o PAE.

Aos professores Karina Bastos, Maurício Rodrigues e Nancy Starobinas pelas relevantes sugestões apresentadas no exame de qualificação, que em muito melhoraram este trabalho.

Aos professores do Departamento de Imunologia ICB/USP que contribuíram para minha formação.

Ao meu amigo Rogério Nascimento (técnico) pela presteza como técnico e pelas agradáveis conversas durante os cafés que tornaram o convívio sempre muito agradável.

Ao amigo e colaborador Luiz Sardinha, obrigado por estar sempre disposto a ajudar e a ensinar.

À enérgica amiga Meire (técnica), obrigado por toda ajuda com experimentos e manutenção da ordem no laboratório, "arrumação".

Às gentis amigas "Sandrinha" Muxel e "Claudinha" Zago, que sempre se dispuseram não só a ouvir, como até a concordar com minhas "fantasiosas e loucas" teorias.

Aos “chagásicos” André, Dani, Fernando, Luis Natividad, Ricardo e Alexandra que além da do companheirismo contribuíram de maneira direta ou indireta com este projeto.

Aos “malariólogos” Henrique, Sheyla, Ana, Sergio, Dani e Raquel pelo convívio e auxílio diário.

À sensível Profa. Adriana Pires e ao Prof. Cláudio Marinho por toda força inicial e incentivo.

Aos doidos Edson, Celina, Alisson, Renato, Michelle e Murilo pela amizade verdadeira e por sempre torcerem e acompanharem minha caminhada. O prazer é um dever.

À todos os amigos do Departamento de Imunologia, pelas animadas festas e ambiente sempre muito agradável, em especial Vanessa e Rebecca.

Aos funcionários dos Biotérios de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia pela manutenção e fornecimento dos camundongos.

À todo o pessoal da secretaria do Departamento Valéria, Amarildo, Eny, pela atenção e paciência.

Ao pessoal da portaria do ICB IV (Milton e Otacílio) e a galera do audiovisual (Moisés, Andres, Marcio) pelo tratamento respeitoso e auxílio durante todos esses anos de convivência.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito do desafio do animal crônico com uma única dose de <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 na frequência de subpopulações no baço.....	47
Figura 2: Efeito do desafio do animal crônico com uma única dose de <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 no número total de células das subpopulações do baço.....	48
Figura 3: Frequência dos linfócitos IFNγ+ no baço.....	49
Figura 4: Total dos linfócitos IFNγ+ no baço.....	51
Figura 5: Efeito do desafio de camundongos crônicos com dose única de <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 na frequência dos leucócitos CD4^{+}, CD8^{+} e B no sangue.....	52
Figura 6: Efeito do desafio de camundongos crônicos com dose única de <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 na frequência de linfócitos CD4^{+} e CD8^{+} produtores de IFNγ+ no sangue.....	54
Figura 7: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos 10 e 60 dias após um único desafio com parasitas Sylvio X10/4.....	55
Figura 8: Análise do parasitismo subpatente no sangue de animais crônicos e crônicos após desafio único com parasita homólogo.....	56
Figura 9: Análise de parasitismo subpatente no coração de animais crônicos e crônicos após desafio único com parasita homólogo.....	57
Figura 10: Avaliação da patologia cardíaca de camundongos crônicos controle e crônicos desafiados após desafio único com parasita homólogo.....	58

Figura 11: Avaliação da patologia cardíaca, muscular e hepática de camundondos crônicos controles e crônicos desafiados após desafio único com parasita homólogo.....	58
Figura 12: Efeito do desafio sustentado na frequência e no número total de linfócitos no baço de animais crônicos.....	60
Figura 13: Efeito do desafio sustentado na frequência e no número total de linfócitos no baço de camundongos crônicos.....	62
Figura14: Efeito do desafio sustentado na frequência dos esplenócitos CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos produtores de IFNγ de camundongos crônicos.....	63
Figura 15: Total de linfócitos IFNγ⁺ no baço do animal crônico após desafio sustentado.....	64
Figura 16: Média da frequência de linfócitos no sangue de animais crônicos (machos) após desafio sustentado com parasita homólogo.....	65
Figura 17: Aumento da frequência de linfócitos CD8⁺ produtores de IFNγ no sangue dos animais crônicos (machos) após desafio sustentado.....	65
Figura 18: Média da frequência de linfócitos no sangue de animais crônicos (fêmeas) após desafio sustentado com parasita homólogo.....	66
Figura 19: Aumento da frequência de linfócitos CD8⁺IFNγ⁺ no sangue de animais crônicos (fêmeas) após desafio sustentado com parasita homólogo.....	66
Figura 20: Aumento da frequência de linfócitos em proliferação nos animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo.....	68
Figura 21: Aumento da frequência de linfócitos em proliferação nos animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo.....	69

Figura 22: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	70
Figura 23: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado.....	71
Figura 24: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado.....	72
Figura 25: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda), muscular e hepática (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos.....	73
Figura 26: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda), muscular e hepática (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos.....	74
Figura 27: Avaliação da patologia cardíaca no conjunto de machos e fêmeas crônicos após desafio sustentado.....	74
Figura 28: Frequência de linfócitos em proliferação no animal crônico após desafio sustentado.....	77
Figura 29: Frequência de linfócitos em proliferação no animal crônico após desafio sustentado.....	78
Figura 30: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	79
Figura 31: Análise através do ensaio CBA da produção de citocinas Th1 e Th2 de animais crônicos machos após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	81

Figura 32: Análise através do ensaio CBA da produção de citocinas Th1 e Th2 de animais crônicos fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	82
Figura 33: Análise através do ensaio de Elisa de captura da produção de IL-10 por esplenócitos de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	83
Figura 34: Análise da produção do óxido nítrico pelos esplenócitos de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4.....	84
Figura 35: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado.....	85
Figura 36: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado.....	86
Figura 37: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda) e do número de ninhos no coração (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos.....	87
Figura 38: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda) e do número de ninhos no coração (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos.....	87

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>.....	22
A Doença de Chagas – Aspectos Gerais.....	23
1.1 A Patologia na doença de Chagas.....	24

1.2 O sistema imune na infecção.....	26
1.3 O sistema imune na geração de memória.....	28
1.4 Terapia para a doença de Chagas crônica.....	29
<u>2 OBJETIVO</u>.....	33
2.1 Objetivo Principal.....	34
2.2 Objetivos Complementares.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Delineamento experimental.....	36
3.2 Animais.....	37
3.3 Parasitas.....	37
3.4 Meios de cultura e tampões.....	37
3.5 Anticorpos e conjugados fluorescentes.....	37
3.6 Infecção e desafio único.....	38
3.7 Infecção e desafio sustentado.....	38
3.8 Isolamento de populações celulares do baço.....	38
3.9 Isolamento de leucócitos do sangue.....	39
3.10 Citometria de fluxo (FACS).....	39
3.11 Marcação Intracelular.....	40
3.12 Marcação de células esplênicas com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE).....	40
3.13 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Indireto.....	41
3.14 Determinação de citocinas através do kit CBA TH1/TH2).....	42
3.15 Determinação do nível de Óxido Nítrico (NO).....	42
3.16 Avaliação da parasitemia na fase crônica.....	42
3.17 Exame Histopatológico.....	43
3.18 Análise Estatística.....	43
<u>4 RESULTADOS</u>.....	44
<u>4.1 Experiência I: Efeito de um único desafio com parasita homólogo</u>.....	45
4.1.1 Aumento da resposta imune anti-<i>T. cruzi</i> do camundongo crônico após um único desafio com o parasita homólogo.....	46
4.1.2 Produção de IFNγ por células do baço do camundongo crônico após um único desafio com parasita homólogo.....	49

4.1.3 Aumento dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e das células produtoras de IFN_γ no sangue de camundongo crônico após um único desafio com <i>T. cruzi</i> homólogo.....	52
4.1.4 Avaliação da produção de anticorpos <i>T. cruzi</i>-específicos de animais crônicos após desafio único.....	54
4.1.5 A carga parasitária dos camundongos crônicos não diminui após um único desafio com parasita homólogo.....	55
4.1.6 A patologia cardíaca de camundongos crônicos não é reduzida após desafio único com parasita homólogo.....	57
<u>4.2 Experiência II: Efeito do desafio sustentado com parasita homólogo I.....</u>	59
4.2.1 Um aumento da resposta anti-<i>T. cruzi</i> é também obtida após desafio sustentado com parasita homólogo.....	60
4.2.2 Aumento da produção de IFN_γ por esplenócitos do animal crônico após desafio sustentado com parasita homólogo.....	62
4.2.3 Aumento da produção de IFN_γ por células CD8⁺ do sangue de animais crônicos após desafio sustentado.....	65
4.2.4 Aumento da capacidade proliferativa dos linfócitos T esplênicos específicos de camundongos machos crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo.....	67
4.2.5 Aumento da produção de anticorpos <i>T. cruzi</i>-específicos nos animais crônicos após desafio sustentado.....	70
4.5.6 Redução da carga parasitária no sangue do camundongo crônico após desafio sustentado.....	71
4.2.7 A patologia cardíaca dos camundongos crônicos é reduzida após desafio sustentado.....	72
<u>4.3 Experiência III: Efeito do desafio sustentado com parasita homólogo II.....</u>	76
4.3.1 Aumento da capacidade proliferativa específica das células CD4⁺ de animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo.....	77
4.3.2 Produção de anticorpos <i>T. cruzi</i>-específicos nos animais crônicos após desafio sustentado.....	79
4.3.3 Produção de citocinas <i>in vitro</i> de camundongos crônicos após desafio sustentado.....	80
4.3.4 Análise da produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> de animais crônicos após desafio sustentado.....	84

4.3.5 Aumento da carga parasitária sangüínea nos animais crônicos desafiados de modo sustentado.....	85
4.3.6 A patologia cardíaca não é reduzida em animais crônicos após desafio sustentado.....	86
<u>5. DISCUSSÃO.....</u>	89
<u>6. CONCLUSÕES.....</u>	97
6.1 Desafio Único.....	98
6.2 Desafio Sustentado I e II.....	98
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	100

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA** – Albumina de soro bovino (Bovine Serum Albumin)
- CD**- Grupos de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CFSE**- (*Carboxifluorescein Diacetate Succinimidil Ester*)
- CTLA-4**- Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*)
- Cy**- (Cy-chrome)
- ELISA**- Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*)
- FACS**- Ensaio de citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorter*)
- FITC**- Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
- Foxp3** – Fator de transcrição da família “forhead” (*forkhead box p3*)
- FSC**- Parâmetro de tamanho (*Forward scatter*)
- IL** – Interleucina (*interleukin*)
- i.p** – Intraperitoneal
- i.v** - Intravenoso
- IFN-γ**- Interferon gama
- Ig**- Imunoglobulina
- Mab** – Anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)
- MACS**- (*Magnetic cell sorting*)
- ME**- Mercaptoetanol
- PBS**- Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)
- PE**- Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
- RPMI**- Meio McCoy de cultura modificado
- SBF**- Soro fetal bovino (*Fetal calf serum*)
- SCID** – Imunodeficiência combinada severa (*Severe Combined Immunodeficiency*)
- TCR** – Receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)
- TGF**– Fator indutor de crescimento (*Transforming growth factor*)
- Th**- Linfócito T auxiliador (*Lymphocyte T helper*)
- TNF**- Fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor*)
- T_{reg}** – Células Treguladoras (*regulatory T cell*)

RESUMO

Rosas-Jorquera CE. A influência do desafio com o parasita sobre a patologia cardíaca durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A doença de Chagas, moléstia causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, resulta freqüentemente em um quadro de miocardite crônica que pode levar à morte do paciente. As causas que determinam a afetação cardíaca não estão totalmente esclarecidas, mas resultados recentes sugerem seja devido à reação imune aos parasitas que persistem no coração. Camundongos C3H/HePAS infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4 apresentam, na fase crônica, lesões no tecido cardíaco com infiltrados inflamatórios e raros ninhos de amastigotas. Utilizando este modelo experimental, o presente trabalho tem analisado o impacto sobre a miocardite do desafio do animal crônico com parasita homólogo vivo. A nossa hipótese de trabalho é que o desafio poderia aumentar a ação efetora do sistema imune frente ao *T. cruzi*, resultando em redução da carga parasitária sistêmica e local, e, em longo prazo, na diminuição da patologia. Inicialmente verificamos que no décimo dia após o desafio do camundongo crônico com uma dose única do parasita observa-se um aumento no número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço e sangue, e um aumento na produção espontânea ou induzida por anti-CD3/CD28 de IFN γ ($P<0.05$). No entanto, aos sessenta dias do desafio, estes parâmetros tornam-se semelhantes aos dos animais crônicos não desafiados. Quando avaliadas a capacidade de um único desafio em reduzir a carga parasitária no sangue e diminuir a patologia, os resultados esperados em função ao aumento da resposta imune não se concretizaram. Assim, no grupo desafiado, o parasitismo no sangue não se reduziu e a patologia permaneceu com grau elevado de infiltrados inflamatórios. Em uma segunda etapa, persistindo no nosso objetivo de reduzir a patologia, procuramos manter otimizada a resposta anti-*T. cruzi* por um período prolongado. Para isso, grupos de camundongos C3H/HePAS crônicos, machos e fêmeas, foram desafiados com quatro doses de tripomastigotas com intervalos de três semanas. Duas experiências foram realizadas. Nossos resultados mostram que após o último desafio, ocorrem aumentos no número de linfócitos CD4⁺ produtores de IFN γ e na resposta proliferativa destas células a antígeno de *T. cruzi*, além de um aumento da secreção de IgG1 parasita-específica. O desafio sustentado também

resulta em aumento das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e da produção de óxido nítrico. Com relação à carga parasitária dos grupos desafiados, houve uma pequena redução desta na primeira experiência e um discreto aumento na segunda. Em correspondência direta com os resultados de parasitismo, a análise histopatológica mostrou que o desafio foi capaz de reduzir a patologia cardíaca na primeira experiência, enquanto que na segunda determinou um discreto aumento. Nossos dados mostram que o nosso protocolo de desafio sustentado não permite reduzir em forma consistente a patologia cardíaca dos animais crônicos. Os motivos que podem ter determinado tal fato são discutidos.

Palavras Chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Patologia cardíaca. Linfócito T CD8⁺. Linfócito T CD4⁺.

ABSTRACT

Rosas-Jorquera CE The influence of the challenge with the parasite in the heart pathology during the chronic stage of *T. cruzi* infection [dissertação (Mestrado em Imunologia)] São Paulo : Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Chagas' disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and often results in chronic myocarditis, which can lead the patient to the death. The causes that determine damages on heart tissue are not fully clarified, but recent reports suggest it is due to the host immune reaction to the parasites that persist in the heart. C3H/HePAS mice infected with *T. cruzi* strain of the Sylvio-X10/4 clone present, in the chronic phase, lesions in the cardiac tissue with inflammatory infiltrates and rare nests of amastigote forms. Using this experimental model, the present work examined the impact of the challenge with homologous alive parasites on myocarditis presented by chronic mice. Our working hypothesis was that the challenge could increase the action of the effector immune system against *T. cruzi*, resulting in a reduction of systemic and local parasitism, and at a long term, in the reduction of the pathology. Initially, we noted that at the tenth day after the chronic challenge with a single dose of the protozoan, there was an increase in the number of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the spleen and the blood, and an increase in the spontaneous or CD3/CD28-induced production of IFN- γ ($p < 0.05$). However, at the sixtieth day after the challenge, these parameters became similar to those seen on unchallenged chronic mice. When we evaluated the capacity of a single challenge to reduce the parasite load in the blood and to diminish the cardiac pathology, the expected results due to the increased immune response did not occur. Thus, in the challenged group the parasitism in the blood was not reduced and the pathology remained presenting high degree of inflammatory infiltrates. In the second stage, we continued focusing on our objective of reducing the illness, trying to maintain optimized the anti-*T. cruzi* immune response for a prolonged period. For this, groups of both male and female chronic C3H/HePAS mice were challenged with four doses of trypomastigotes with intervals of three weeks each. Two experiments were performed. Our results showed that after the last challenge, there were increases in a) the number of CD4⁺ IFN- γ -producing lymphocytes, b) in the proliferative response of these *T. cruzi* specific T cells and c) in the parasite-specific IgG1 release. The sustained challenge also resulted in the increase of the production of the cytokines

IL-4, IL-5 and IL-10 and of nitric oxide. With regard to the parasite load in challenged groups, there was a small reduction in the first experiment and a slight increase in the second. In direct correlation with the outcome of the parasitism, the histopathological analysis revealed that the challenge was able to reduce the heart disease in the first experiment, while in the second one it caused a slight increase. Our data show that the sustained challenge protocol does not allow, in a consistent way, the reduction of the heart disease in the chronic animals. The reasons that may have determined this fact are discussed.

Key-words: Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*. Heart pathology. CD8 T lymphocyte. CD4 T lymphocyte.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas – Aspectos Gerais

A Doença de Chagas, originalmente descrita em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é endêmico do continente americano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (W.H.O.) [1], 9-12 milhões de pessoas estão infectadas com o protozoário. O principal problema de saúde pública que resulta da Doença de Chagas é a cardiopatia chagásica, que sendo originalmente uma forma comum de cardiopatia na população rural, propagou-se para as cidades com o aumento da migração urbana [2, 3].

A principal forma de transmissão da doença ocorre através da penetração das formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos), presentes nas fezes do inseto vetor. Outras formas de transmissão, no entanto, podem ocorrer, e entre elas, transfusão sanguínea, transmissão congênita, ingestão de alimentos contaminados e acidentes de laboratório [4].

O ciclo de transmissão doméstico do *T. cruzi* inicia-se no momento que o triatomídeo infectado suga o sangue do hospedeiro e deposita suas fezes na pele lesada ou na mucosa. Os tripomastigotas metacíclicos presentes invadem diferentes tipos celulares e se transformam na forma amastigota. As formas intracelulares se multiplicam por divisão binária simples, diferenciam-se em tripomastigotas e, após rompimento da célula hospedeira, infectam células adjacentes ou ganham a corrente sanguínea invadindo tecidos distantes.

A infecção humana pelo *T. cruzi* freqüentemente apresenta uma fase aguda que se estende por volta de 50 dias e se caracteriza por um elevado número de parasitas no sangue e nos tecidos. Na maioria dos casos e coincidindo com o fim da fase aguda, a parasitemia é reduzida, mas não erradicada pela resposta imune. O paciente evolui para a fase indeterminada ou assintomática da doença que pode persistir por muitos anos e até por toda a vida. Cerca de 30% dos indivíduos infectados, entretanto, desenvolvem a fase crônica caracterizada pela manifestação de quadros patológicos como esofagopatia, colonopatia ou a cardiomiopatia, que pode conduzir à morte.

1.2 A Patologia na doença de Chagas

Finalizada a fase aguda, os parasitas só podem ser detectados por xenodiagnóstico, hemocultura e amplificação enzimática do DNA do parasito [5, 6].

Na fase indeterminada da doença de Chagas, o indivíduo não apresenta nenhum tipo de manifestação clínica, mas naqueles que desenvolvem os sintomas crônicos da doença após 10-20 anos [2], uma redução da expectativa de vida de nove anos em média é observada [3].

A destruição do miocárdio é característica fundamental da forma clínica cardíaca da doença de Chagas crônica, e parece ser o resultado de uma reação inflamatória local [7] que irá se somar à destruição direta causada pelo parasita das fibras musculares cardíacas.

Existem discrepâncias sobre a natureza da reação inflamatória cardíaca, sendo que a resposta auto-imune e a reação aos parasitas que persistem no coração constituem as hipóteses mais cogitadas para explicá-la [2]. O desequilíbrio da inervação autônoma do coração pode estar também envolvido no déficit funcional cardíaco. Uma disfunção da inervação autonômica do coração pode resultar de diferentes processos patológicos, tais como parasitismo direto de neurônios, degeneração causada pela inflamação periganglionar e reação auto-imune antineural [8, 9]. Além disso, uma miocardite intensa com fibrose pode conduzir a interrupção da inervação autônoma, levando diretamente a arritmia, disfunção cardíaca e eventualmente à morte [10].

Na visão autoimune [7, 11-13], a patologia cardíaca crônica é o resultado da ação de anticorpos ou linfócitos T auto-reativos que sofreriam uma quebra do seu estado de tolerância como resultado de uma reação cruzada entre os antígenos próprios e os do parasita. Anticorpos de reação cruzada entre *T. cruzi* e a proteína P ribossomal, ou o receptor β_1 adrenérgico tem sido detectados em pacientes com Chagas na fase indeterminada da doença [14]. A reatividade cruzada é também observada em pacientes com cardiomiopatia onde clones de linfócitos T CD4⁺ derivados de biopsias do endocárdio reconhecem tanto a proteína B13 do *T. cruzi* como a miosina cardíaca [15, 16]. Em estudos que avaliam se a magnitude da auto-imunidade é diretamente proporcional ao dano tecidual causado pelo parasita, observou-se uma ligação direta entre os níveis de *T. cruzi* e a presença do quadro

auto-reativo, sugerindo que, a eliminação do parasita pode conduzir à redução ou eliminação da auto-imunidade na fase crônica da infecção [17].

Por outro lado, com a hipótese da reatividade aos parasitas que persistem no tecido, Zhang e Tarleton [18] propuseram que clones linfocitários parasita-específicos, ao agirem sobre os parasitas remanescentes no coração, causariam as lesões características da patologia chagásica [18]. A base experimental para esta hipótese foi propiciada pelo aumento da sensibilidade das técnicas para a detecção do *T. cruzi* como imunohistoquímica e PCR. Este avanço tecnológico permitiu constatar que a incidência de patologia cardíaca [19, 20], ou digestiva [21], no hospedeiro crônico, correlaciona-se com a presença de DNA ou antígeno do parasita no próprio local da lesão. Mais ainda, através de um estudo mostrando a persistência de amastigotas íntegros em 22 das 26 biópsias endomiocárdicas de pacientes crônicos, confirmou-se que a patologia correlaciona-se com a presença de *T. cruzi* vivo [22]. Marinho *et al.*, utilizando camundongos crônicos infectados por parasitas da cepa Sylvio X10/4, mostraram que o desenvolvimento de patologia cardíaca correlaciona com a presença de ninhos ou culturas LIT positivas neste órgão [23]. Por outro lado, estes mesmos autores observaram que na infecção por parasitas da cepa Y, a patologia do animal crônico reflete a carga parasitária na fase aguda, uma vez que camundongos infectados com alto inóculo de *T. cruzi* mostravam na fase crônica uma parasitemia residual, e infiltrado no coração mais intensos do que os animais infectados com inóculo cem vezes menor [24].

Desta forma, o conjunto dos trabalhos mais recentes, sem descartar a participação de um componente auto-imune, focaliza o desenvolvimento da patologia chagásica na permanência do parasita. Neste contexto, os elementos do hospedeiro que influenciam no tamanho da carga parasitária local teriam papel decisivo. Assim, diferenças individuais na eficiência da resposta imune em destruir o *T. cruzi* deixariam níveis de parasitismo residual diferentes. Neste sentido, a intensidade e a qualidade da resposta imune correlacionariam em forma inversa com a intensidade da lesão. Entretanto, não devemos esquecer que na óptica de uma patologia causada pela persistência local do parasita, o sistema imune passa a ter um papel duplo na indução da patologia, uma vez que os mesmos clones estariam envolvidos no controle local do *T. cruzi* e no desenvolvimento das lesões. Por outro lado, levando em consideração a natureza inflamatória das lesões chagásicas crônicas, é provável que diferenças individuais na regulação dos mecanismos

efetores do sistema imune sejam cruciais para estabelecer o ponto de equilíbrio entre atividade inflamatória e carga parasitária.

Na fase crônica da infecção o hospedeiro mantém altos níveis de ativação do seu sistema imune, o que garante o controle não estéril do *T. cruzi*. No entanto, estudos do nosso laboratório mostraram que, a despeito deste alto nível de ativação, o sistema imune do hospedeiro crônico não está totalmente otimizado na sua atividade antiparasita. Isto foi concluído ao observarmos que a re-estimulação de camundongos crônicos com parasita vivo ou antígeno de *T. cruzi* resulta em aumento do título de anticorpos séricos parasita-específicos, aumento da capacidade de produzir IFN- γ no baço e, o que é mais importante, redução significativa nos níveis de parasitemia subpatente dos animais re-estimulados [25].

Já em relação às complicações digestivas da doença, que se manifestam pela dilatação do cólon ou esôfago, existe um relativo consenso em relação à sua etiopatogenia, acreditando-se que sejam consequência de um processo de denervação por perda de células ganglionares dos plexos que inervam estes órgãos do sistema digestivo [26, 27].

1.3 O sistema imune na infecção

O modelo murino da doença de Chagas tem contribuído para a elucidação dos fenômenos imunológicos envolvidos na infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que muitos de seus aspectos podem ser diretamente correlacionados com a doença em humanos. A infecção experimental demonstrou que um eficiente controle da carga parasitária e a sobrevivência do hospedeiro são dependentes de uma resposta imune inata com ativação de macrófagos e células Natural Killer (NK), e da indução de uma resposta imune adquirida mediada por células T, CD4⁺ e CD8⁺, e produção de anticorpos.

A ativação de macrófagos por citocinas parece ser fundamental no controle do parasita. Golden e Tarleton (1991) mostraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos com IFN- γ resulta em um aumento da morte de amastigotas intracelulares [28]. Mais ainda, animais que carecem de imunidade adquirida, tais

como os camundongos RAG-KO, são capazes de reduzir a proliferação do parasita através da produção de IL-12 e IFN- γ [29]. A proteção imune contra parasitos intracelulares como o *T. cruzi* parece ser dependente da produção de óxido nítrico (NO). No início da infecção, células NK produzem IFN- γ [30] e direcionam um mecanismo microbicida frente ao *T. cruzi*, ao induzir a síntese de NO nas células da estirpe macrófaga. Assim como o IFN- γ , o TNF- α também é capaz de induzir a ativação de macrófagos [31], enquanto que o TGF- β [32] e a IL-10 inibem esta ativação [33].

Após ativação da resposta imune específica, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativam vários mecanismos efetores frente ao *T. cruzi* (revisto por Abrahamsohn, 1998, [34]). Desta forma, as citocinas secretadas pelos linfócitos T CD4⁺ com padrão de diferenciação funcional Th1 atuam ativando mecanismos protetores, o que foi elegantemente demonstrado por Kumar e Tarleton (2001) através de experimentos de transferência de clones Th1 [35]. Além da produção de IFN γ , a ação dos linfócitos T CD4⁺ inclui o auxílio aos linfócitos B na produção de anticorpos específicos, os quais têm um papel fundamental na eliminação dos parasitas extracelulares. No modelo murino, os anticorpos IgG anti-*T. cruzi* predominantes são das subclasses IgG2a [36, 37] e IgG2b [38], que conferem proteção no sangue e tecidos ao propiciarem a remoção dos tripomastigotas por células fagocitárias, como polimorfonucleares, macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear, que expressam receptores para a porção Fc de IgG [39, 40]. Além dos linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ apresentam importante função no controle da infecção por *T. cruzi*. Estes linfócitos reconhecem peptídeos do parasita apresentados em moléculas de MHC de classe I e são capazes de causar a morte da célula infectada por citotoxicidade. Além disto, as células T CD8⁺ também secretam IFN- γ que irá ativar os macrófagos e potencializar sua atividade microbicida, assim como quimiocinas. Em 1995, Rottenberg mostrou a importância dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em experimentos utilizando animais nocautes [41]. Nos resultados foi concluído que camundongos deficientes de linfócitos CD4⁺ são incapazes de controlar o parasito no coração. Neste trabalho, o não envolvimento das células CD8⁺ foi explicado pela baixa expressão das moléculas de MHC-I pelos cardiomiócitos [42]. Contudo, resultados opostos foram publicados por Zhang e Tarleton mostrando que na fase crônica da doença as células cardíacas têm aumento na expressão das moléculas

do MHC, de maneira que as células CD8⁺ poderiam estar atuando neste local [43]. Neste mesmo trabalho, assim como em outros realizados em humanos ou com modelo murino, os autores verificaram a presença dos linfócitos T CD8⁺ no tecido cardíaco lesionado.

1.4 O sistema imune na geração de memória

A memória imunológica é a capacidade do sistema imune de responder mais rápido e efetivamente aos patógenos que foram encontrados previamente, e em parte reflete a pré-existência de uma população expandida de clones de linfócitos T e B antígeno-específicos. A memória é mantida por linfócitos de vida longa induzidos durante a resposta primária e que persistem num estado de repouso até um segundo encontro com o antígeno. A manutenção das células de memória é favorecida pela persistência do patógeno em pequenas quantidades, suficientes para induzir um nível baixo de re-estimulação às células ativadas [44]. Na doença de Chagas, entretanto, o fato do parasito persistir em níveis baixos nas fases indeterminada e crônica sugere que a maior parte dos clones T parasito-específicos deve persistir como células efetoras e células de memória efetora e não como células de memória central [45, 46]. Contudo, nas infecções, o processo inflamatório inicial resulta em alta proliferação de linfócitos, enquanto que, numa fase mais tardia e sob condições que limitam o estímulo antigênico, há redução no número de células ativadas ou de memória [47-49].

Estudos recentes indicam que os eventos envolvidos durante o estágio inicial da infecção, incluindo a disponibilidade do antígeno, o estímulo inflamatório, moléculas co-estimuladoras, linfócitos T CD4⁺ e a secreção de citocinas têm efeitos na quantidade e qualidade das células T de memória [49-51]. Shaula e Krishna, utilizando um modelo em que combinaram a influência do antígeno e inflamação, demonstraram por transferência adotiva que exposições simultâneas e sustentadas de antígeno, somadas ao processo inflamatório, contribuem para uma expansão das células T CD8⁺, assim como para alta diferenciação de memória [52].

A memória na doença de Chagas foi evidenciada na fase crônica da doença pelos altos índices de células CD8⁺ esplênicas que apresentam em sua superfície alta expressão de moléculas CD44 (molécula de adesão – “homing”) e CD11a (LFA-1 – molécula de adesão ao endotélio; família das integrinas). Nesta fase da infecção, as células CD8⁺ mostram-se capazes de produzir IFN γ em resposta ao antígeno de *T. cruzi*, e mantêm conservadas as propriedades citolíticas [46], bem como a sua capacidade protetora. Assim, a atividade citotóxica das células CD8⁺ específicas para células infectadas ou pulsadas com peptídeos de *T. cruzi* tem sido evidenciada em humanos e murinos infectados [53, 54]. No entanto, Leawey e Tarleton mostraram que células T CD8⁺ de memória isoladas do músculo de animais crônicos, têm atividade citotóxica e produção de IFN γ reduzidas [55]. Mais tarde Martin *et al.* publicariam que o TGF- β não contribui para o estado não respondedor (disfuncional) das células CD8⁺ no tecido [56].

Modular aumentando a resposta imune frente ao *T. cruzi* se torna interessante quando o objetivo é aumentar o “pool” das células parasita-específicas, na tentativa em longo prazo de diminuir o processo inflamatório cardíaco como resultado direto da redução da carga parasitária no órgão e/ou da parasitemia. Entender os fatores que contribuem para uma geração otimizada de células efectoras/memória é importante para o desenvolvimento de melhores vacinas e estratégias terapêuticas anti-*T. cruzi*.

1.5 Terapia para a doença de Chagas crônica

Atualmente não há tratamento curativo para a doença de Chagas crônica. Drogas tripanocidas como o benzonidazol (Rochagan) ou o nifutimox (Lampit) são indicados na fase aguda da infecção e quando a reativação da fase crônica ocorre durante condições imunossupressoras. Por outro lado, apesar da maioria dos estudos revelarem uma baixa eficiência destes fármacos durante a terapia de pacientes crônicos, avaliações mais recentes preconizam o tratamento na tentativa de conter a evolução progressiva da doença crônica. Contudo, o uso

destes fármacos ainda é restrito e inadequado uma vez que possuem sérios efeitos colaterais, baixo efeito na fase crônica da doença e mais ainda, ação limitada sobre cepas/populações de parasitos resistentes [57, 58].

Considerando os dados acima e o fato de que tratamentos com fármacos (benzonidazol e nifutimox) são ineficientes em eliminar o parasita do hospedeiro que está progredindo para a doença cardíaca, vêm sendo desenvolvidas terapias para o tratamento de pacientes cronicamente infectados.

Proteínas recombinantes associadas a motivos CpG estão sendo fortemente aplicadas como ótimos adjuvantes na geração de novas vacinas, embora o seu mecanismo de ação não tenha sido totalmente elucidado. Recentemente, utilizando camundongos deficientes em IFN γ , foi mostrado que esta citocina tem um papel crítico na atividade adjuvante do CpG, e conseqüentemente na indução das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD86 [59]. Em 2007, Holf *et al.* mostraram que a administração intranasal da combinação antígeno de TS (trans-sialidase de *T. cruzi*) recombinante solúvel com oligodeoxynucleotideo CpG pode induzir imunidade de mucosa e sistêmica de camundongos, além de que a hiper-imunização por repetidos desafios com TS também pode gerar uma imunidade protetora por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos nas fases, aguda e crônica da infecção [60].

Semelhantemente, camundongos ICR infectados com *T. cruzi* foram tratados 5 e 12 dias após a infecção com vacinas de DNA que codificam antígenos de *T. cruzi*, tais como ASP-2, TS, TSA-1, Tc52 e Tc24. O tratamento com DNA de ASP-2 não reduziu a carga parasitaria, contudo o tratamento com DNA de Tc52 reduziu significativamente a parasitemia e a carga parasitária cardíaca embora não tenha reduzido a miocardite. Finalmente, os DNAs de Tc24 e TSA-1 se mostraram melhores candidatas à vacinas por controlarem a parasitemia, a carga parasitária do coração e a miocardite chagásica [61].

Em um outro protocolo de vacinação, a imunidade protetora ocasionada principalmente por linfócitos T CD8⁺ foi observada em camundongos da linhagem A/Sn, suscetíveis a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, quando vacinados com a proteína de fusão GST representando aminoácidos de ASP-2 (proteína da superfície de amastigotas) somados a presença dos adjuvantes alumínio e CpG [62].

Também utilizados como bons candidatos a vacinas, os adenovírus recombinantes que expressam seqüências específicas de antígenos TS e ASP-2 de *T. cruzi* foram capazes de induzir, 14 semanas após a última imunização, altos

níveis de anticorpos específicos, polarização dos linfócitos CD4⁺ para uma resposta TH1, assim como acionar uma resposta imune mediada por linfócitos CD8⁺, sendo que os camundongos imunizados mostraram uma importante proteção após infecção pelo *T. cruzi* [63].

As vacinas na doença de Chagas poderiam ser preventivas, para evitar que o indivíduo se infecte, ou terapêuticas, para impedir a progressão da doença nos indivíduos infectados. Considerando a segunda possibilidade, diversas abordagens podem ser utilizadas para aumentar a atividade efetora frente ao parasita, tais como vacinas constituídas por proteínas predominantes do *T. cruzi* e vacinas de DNA recombinante que codificam algumas destas proteínas, parasita inteiro vivo, morto ou inativado. Uma vez que tanto os anticorpos como as células CD4⁺ e CD8⁺ parasita-específicas participam no controle do *T. cruzi*, a escolha da vacina deve considerar qual ferramenta(s) do sistema imune, a vacina visa potencializar.

Como citado anteriormente, em nosso laboratório temos realizado experiências para avaliar se o desafio com o parasito homólogo seria capaz de ativar a resposta imune do camundongo crônico. Nestas experiências, que utilizaram animais A/J infectados por *T. cruzi* da cepa Y, constatou-se, uma semana após o desafio, um aumento das populações CD4⁺ e CD8⁺ esplênicas, aumento dos anticorpos específicos no soro e aumento da produção de citocinas pelos esplenócitos. Mais importante, constatou-se que os animais desafiados mostravam uma redução da carga parasitária sistêmica em relação aos animais crônicos controle [25]. Não foi possível estudarmos nesse modelo o impacto do desafio sobre a patologia cardíaca, uma vez que na infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y a patologia cardíaca de fase crônica é praticamente inexistente.

Consideramos que os efeitos do desafio com *T. cruzi* homólogo deveriam ser avaliados em um modelo experimental que apresentasse patologia cardíaca intensa na fase crônica da infecção. Utilizando um modelo com estas características, poderíamos estimar o impacto de uma re-estimulação da resposta específica do animal crônico sobre a carga parasitária e a patologia cardíaca.

Para as experiências de desafio partimos da hipótese da patologia cardíaca crônica decorrer da reatividade aos parasitas que persistem no local. Caso esta hipótese esteja correta, o aumento da resposta imune após-desafio poderá

eventualmente resultar na redução da carga parasitária no coração, e esta diminuição, poderá secundariamente se traduzir em queda da infiltração inflamatória e redução da patologia tissular.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Principal:

Avaliar se a evolução da patologia cardíaca no animal cronicamente infectado pelo *T. cruzi* pode ser alterada mediante uma re-estimulação específica da resposta imune.

2.2 Objetivo Complementar:

Confirmar no modelo de infecção crônica de camundongos C3H/HePAS por parasitas Sylvio X10/4, se o desafio com parasita homólogo resulta no aumento da atividade efetora sistêmica frente ao *T. cruzi*, e se determina uma redução da carga parasitária sistêmica e local.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Camundongos C3H/HePAS foram infectados com 10^5 ou 10^6 tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio-X10/4, obtidos em culturas celulares LLCMK2 e contendo menos de 20% de amastigotas. Neste modelo experimental a infecção cursa sem parasitemia, mas determina altos índices de patologia cardíaca em fase tardia da infecção [23].

Aproximadamente 120 dias depois da infecção, e após confirmação de que os animais apresentavam patologia cardíaca, a metade dos camundongos foi inoculada com uma ou quatro doses de 5×10^6 de *T. cruzi* homólogos (vivos) por animal, caracterizando o grupo desafio. A outra metade dos camundongos não recebeu tratamento algum e constituiu o grupo controle.

Nos diferentes tempos após o desafio (nos dias 10 e 60 pós-desafio, na experiência de inoculação com uma única dose de *T. cruzi*, e nos dias 35 e 45 ou, 55 e 68 dias pós-desafio, nas experiências I e II de inoculação com quatro doses de *T. cruzi*), os camundongos dos grupos crônicos controles e grupos crônicos desafiados foram sacrificados e analisados com relação a:

- a) parâmetros imunológicos: celularidade diferencial ($CD4^+$, $CD8^+$ e $B220^+$) do sangue e baço estimada através de citometria de fluxo (FACs); produção do $IFN\gamma$ intracelular por células $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço e sangue; proliferação antígeno-específico das células $CD4^+$ e $CD8^+$ do baço; reconhecimento específico por anticorpos IgG1 e IgG2a; produção de citocinas TH1 (IL-2; $IFN\gamma$; $TNF\alpha$) e TH2 (IL-4; IL-5, IL-10); dosagem do óxido nítrico (NO).
- b) nível da carga parasitária subpatente: estimado por culturas do sangue e coração em meio LIT;
- c) avaliação da patologia cardíaca: Através de exame histopatológico de lâminas coradas com hematoxilina-eosina.

3.2 Animais

Camundongos machos e fêmeas da linhagem isogênica C3H/HePAS, com 6 a 8 semanas de vida, foram obtidas do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP.

3.3 Parasitas

A cepa Sylvio (clone X10/4) de *Trypanosoma cruzi* foi originalmente obtida na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) e os parasitas mantidos por passagens semanais em monocamadas de células LLC-MK2 (American Type Culture Collection - ATCC - CCL7.1).

3.4 Meios de cultura e tampões

Para o cultivo de células foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) contendo 10 mM de HEPES (Gibco), 0,05 mM de 2-Mercaptoetanol (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 2 mM de piruvato (Sigma), 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 5% de FCS (Gibco). Para o cultivo de LLC-MK₂, foi utilizado meio RPMI 1640 com 3% de FCS.

Para o processamento de células nos ensaios de citometria de fluxo foi usado PBS (tampão salino fosfatado, pH 7,2), suplementado com 1% de BSA (soro albumina bovina; (Sigma) e 0,05% de azida sódica (Sigma).

3.5 Anticorpos e conjugados fluorescentes

Foram utilizados nos experimentos os seguintes anticorpos dos respectivos clones conjugados a FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina) ou Cy-Chrome, obtidos da companhia Pharmingen (San Diego, USA): anti-CD4 (H129.19), anti-CD8α (53-6.7), anti-CD45R/B220 (clones RA3-6B2) e anti-IFN γ .

3.6 Infecção e desafio único

Camundongos fêmeas C3H/HePAS foram infectados i.p. com 10^6 parasitas. Posteriormente, a metade dos camundongos foi desafiada uma única vez i.v. com 5×10^6 /animal durante a fase crônica da doença, no dia 120 pós-infecção. No décimo dia após o desafio parte dos camundongos controles e parte dos camundongos desafiados foram sangrados e sacrificados. Sessenta dias após o desafio o restante dos camundongos foi igualmente sangrado e sacrificado.

3.7 Infecção e desafio sustentado

Camundongos machos e fêmeas C3H/HePAS foram infectados i.p. com 10^5 parasitas. Posteriormente, parte dos camundongos foi desafiado durante a fase crônica da doença por quatro vezes (2 i.v. e 2 i.p.) com 5×10^6 parasitas/animal, do dia 120 ao 150 pós-infecção. Para o grupo dos machos, os camundongos controles e camundongos desafiados foram sangrados e sacrificados 35 (Experimento I) ou 55 (Experimento II) dias após a última dose do desafio. Para o grupo das fêmeas, os camundongos foram sangrados e sacrificados 45 (Experimento I) ou 68 dias (Experimento II) após a última dose do desafio.

3.8 Isolamento de populações celulares do baço

Após sacrifício do camundongo o baço foi processado por ruptura mecânica, o macerado transferido para um tubo Falcon de 15ml e adicionado com meio RPMI 1% SBF até completar 5ml. Da suspensão, 3ml foram transferidos para outro tubo, que foi completado com meio RPMI 1% SBF e centrifugado (8 minutos, a 4°C , a 1200 rpm). Repetiu-se a lavagem, contado o número de células e na sequência utilizadas nos diferentes ensaios.

3.9 Isolamento de leucócitos do sangue

Os camundongos foram anestesiados com éter e em seguida sangrados por punção cardíaca com uma seringa contendo 40µl de EDTA 0,2M e em seguida sacrificados. Um volume de 0,4mL de sangue foi misturado com 1mL de meio de cultura, homogeneizado lentamente e transferido para um tubo Falcon de 15ml contendo 3mL de percoll 70%. O tubo foi então centrifugado (20 minutos, em temperatura ambiente, 1500 x g) e em seguida as células que estavam presentes na interface formada entre o percoll 70% e o meio foram retiradas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Adicionou-se às células 5 mL de meio de cultura e logo em seguida, estas foram centrifugadas (10 minutos, 4° C, 800 x g). O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensionado em 0,5 mL de meio de cultura, e as células contadas e utilizadas nos diferentes ensaios.

3.10 Citometria de fluxo (FACS)

Células do sangue e baço foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em U (Corning, New York, USA) na concentração de 10^6 células/100µL/poço. Após a centrifugação (5 minutos, 4°C, 250 g), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 0,5µg de anticorpos anti-CD16/CD32 (Fc Block). As placas de cultura foram mantidas a 4° C por 20 minutos e seguidamente foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos FITC, PE e CyChrome em concentrações ótimas previamente estabelecidas. A seguir, as amostras foram incubadas a 4° C por 30 minutos em local com pouca luminosidade, e então lavadas com uma solução de PBS suplementada com 1% de FCS e 0,05% de azida sódica por 3 vezes e ressuspensionadas em 0,5 mL de uma solução de PBS em tubos de poliestireno com fundo em U (Falcon - Becton Dickinson, Mountain View, USA). As suspensões de células marcadas foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACScan - Becton Dickinson, Mountain View, USA), de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL2 e FL3) e a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso.

3.11 Marcação Intracelular

Os ensaios de detecção intracelular de citocinas foram realizados conforme protocolo sugerido no kit de permeabilização Cytofix/Cytoperm (Pharmingen). Em resumo, após o isolamento dos esplenócitos e dos leucócitos do sangue, estes foram lavados por duas vezes com meio de cultura RPMI suplementado. Então, 10^6 células foram diluídas em 0,2 ml de meio de cultura RPMI suplementado contendo Stop Golgi (monensina) para bloquear a secreção das citocinas presentes no complexo de Golgi. As células foram incubadas em placas de 96 poços de fundo chato (Becton Dickinson), previamente sensibilizados, ou não, com anti-CD3 (10 µg/ml) e anti-CD28 (2 µg/ml) por 10 horas a 37° C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas por duas vezes e, em seguida foi feita a marcação extracelular, conforme já descrito. Após esta etapa, as células foram fixadas com Cytofix (Pharmingen) por 20 minutos, antes da permeabilização celular, realizada através de duas lavagens com Cytoperm (Pharmingen). A seguir, as células foram incubadas com concentrações ideais de anticorpos anti-IFN- γ , lavadas novamente com Cytoperm (por 2 vezes) e ressuspendidas em uma solução de PBS suplementada com 1% de SBF e 0,05% de azida sódica. Os anticorpos utilizados para marcação externa foram: Anti-CD4, anti-CD8 α

3.12 Marcação de células esplênicas com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE)

Para os experimentos de proliferação celular *in vitro* as células esplênicas dos camundongos machos crônicos e crônicos desafiados de modo sustentado foram “marcadas” com CFSE (do inglês CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester, Molecular Probes, OR, EUA). Esta técnica permite a marcação e visualização de células por citometria de fluxo. As células esplênicas (3×10^7) foram incubadas em PBS contendo 0,1% de BSA e 5 µM de CFSE, por 15 minutos a 37° C, ao abrigo da luz. Após este passo, as células foram lavadas duas vezes (centrifugação por 5 minutos, 4° C, 250 g) em meio RPMI contendo 10% de SBF e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram ressuspendidas em meio RPMI contendo 10% de SBF na concentração de 1×10^7 células/ml e incubadas na ausência de estímulos, ou na presença de mAb anti-CD3 (1,25 µg/ml), ou antígeno de *T. cruzi*.

Após 72 e 96 horas em cultura, a proliferação celular foi estimada por citometria de fluxo quantificando a frequência de células com fenótipo CFSE^{LOW}.

3.13 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Indireto

Volumes de 50µl do antígeno de *T. cruzi* da cepa Sylvio na concentração de 1600µl/ml de tampão carbonato/bicarbonato foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Maxsorp, Nunc, Denmark) para a sensibilização. Após 12 horas na geladeira, o material não aderido ao plástico foi descartado e foram adicionados 0,2ml de PBS 1X BSA 1% por poço para o bloqueio dos espaços não preenchidos pelo antígeno, por um período de 2 horas em temperatura ambiente. A microplaca foi lavada por 3 vezes com PBS 1X Tween 20 0,05%, e em seguida foram distribuídos na microplaca os soros dos animais experimentados diluídos 400, 1600 e 12000 vezes em PBS 1X BSA 1% Tween 20 0,05%, num volume de 50µl (anticorpos primários). Após incubação de 1 hora, a placa foi novamente lavada por três vezes com PBS 1X Tween 20 0,05% e acrescentado o conjugado (anticorpo secundário). Anticorpos de cabra anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongos conjugados com estreptoavidina peroxidase (Southen Biotechnology Associates, Inc USA) e diluídos 2000 vezes em PBS 1X BSA 1% Tween 20 0,05% foram adicionados à placa no volume de 50µl, para incubação em temperatura ambiente sob agitação constante durante 1 hora. Logo após, a placa foi novamente lavada por três vezes e adicionado 100µl do reagente TMB (Invitrogen) e trinta minutos depois foi realizada a leitura da densidade Óptica (D.O.) em espectrofotômetro à 650nm e analisada no software Softmax Pró versão 4.0.

3.14 Determinação de citocinas através do kit CBA TH1/TH2)

IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5 foram quantificados simultaneamente através do *Cytometric Bead Array* (CBA; PharMingen) dos sobrenadantes obtidos

das culturas de esplenócitos totais mantidos por 48 e 72 horas em estufa úmida. Esta técnica usa a citometria de fluxo para mensurar analitos solúveis através de imunoensaio baseado em partículas, e foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O limite mínimo de detecção para todas as citocinas neste ensaio é de 20 pg/mL.

3.15 Determinação do nível de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é indiretamente mensurado estimando a concentração de nitrito nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos totais dos animais experimentados mantidos por 48 e 72 horas em estufa úmida. O nitrito usado como indicador da síntese de Óxido Nítrico é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0,1% naftil-etileno-diamina em 2,5% H_3PO_4 (Ding *et al*, 1988). Desta forma, um volume de 50µl do sobrenadante das culturas foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura da Densidade Óptica nas placas foi realizada em espectrofotômetro à 540nm. A concentração do óxido nítrico dos sobrenadantes das amostras foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressa em µM.

3.16 Avaliação da parasitemia na fase crônica

A presença de parasitas no sangue e coração foi avaliada em alíquotas de sangue ou tecido cardíaco homogeneizado cultivadas em triplicatas, a 28°C, por um mês, em meio LIT. Para evitar que as amostras de tecido cardíaco pudessem ser contaminadas com parasitas presentes no sangue, todos os animais foram perfundidos através da veia cava inferior. Esta foi seccionada sobre o diafragma e conectada através do ventrículo esquerdo a uma bomba de infusão de duas seringas KDS 200 (KD Scientific, New Hope, PA), que infundia PBS estéril por 5 minutos, a um fluxo de 2mL/minuto.

3.17 Exame Histopatológico

Após sangria e sacrifício dos camundongos, os órgãos foram imediatamente coletados e fixados por 24 h em solução de formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente processados para inclusão em blocos de parafina. O coração foi cortado sagitalmente em duas partes, cada uma contendo as quatro cavidades. Seis cortes sagitais de 5 μ m, não consecutivos, foram obtidos do coração, fígado e do músculo esquelético (quadríceps), corados por hematoxilina-eosina e posteriormente analisados qualitativamente na sua totalidade por microscopia óptica na forma de cruces (0= ausência de lesões; 1= leve; 2= moderada; 3= média; 4= intensa e 5= severa).

3.18 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o t test (student). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma 4 (Graph Pad Software) e as diferenças entre os três grupos foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

EXPERIÊNCIA I

Efeito de um único desafio com parasita homólogo

4.1.1 Aumento da resposta imune anti-*T. cruzi* do camundongo crônico após um único desafio com parasita homólogo

Na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, o hospedeiro mantém altos níveis de ativação do seu sistema imune, o que garante um controle não estéril do parasita. No entanto, estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que camundongos A/J com infecção crônica por parasitas da cepa Y, quando desafiados, apresentam aumento da resposta imune e conseqüente redução dos níveis de parasitemia subpatente [25].

Seguindo por este caminho, nos fomos avaliar os efeitos a um único desafio em um modelo de infecção crônica indutor de miocardiopatia. Desta forma, camundongos da linhagem C3H/HePAS com infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio X10/4 foram desafiados uma única vez via i.v, com 5×10^6 parasitas homólogos. Dez e 60 dias depois, os animais crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados e os baços e sangue processados para mensurar os níveis de ativação do sistema imune.

Aos dez dias do desafio, os camundongos desafiados apresentam um aumento na frequência dos linfócitos $CD4^+$ ($p < 0.001$) e $CD8^+$ ($p < 0.005$), e uma redução aproximada de 40% de linfócitos B ($CD45R$, $B220^+$) ($p < 0.001$). Outras duas populações celulares, divididas por tamanho pequeno ou grande, que não são $CD4^+$, $CD8^+$ e tampouco B, estão aumentadas no baço do animal crônico desafiado. A presença da população de tamanho menor é expressiva ($p < 0.05$) (Figura 1).

Contudo, 60 dias após o desafio as frequências dos linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e B, bem como as outras subpopulações, estão equivalentes nos dois grupos, e apenas a frequência da população de linfócitos $CD8^+$ mostra uma leve queda não significativa (Figura 1).

Dia 10 **Dia 60**

Figura 1: Efeito do desafio do animal crônico com uma única dose de *T. cruzi* Sylvio X10/4 na frequência de subpopulações no baço. Animais crônicos e crônicos desafiados com 5×10^6 tripomastigotas (desafio único) foram sacrificados após 10 e 60 dias para análise da frequência de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e B no baço. Animal crônico controle (■), animal crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

Em relação aos números de células no baço aos dez dias do desafio, observamos que o número de linfócitos $CD4^+$ aumenta de 24×10^6 para 65×10^6 ($p < 0.001$). De forma similar, o número de linfócitos $CD8^+$ no baço do camundongo crônico aos dez dias do desafio sofre um aumento de três vezes comparado com o camundongo crônico controle ($p < 0.001$). O número de linfócitos B não apresenta mudança após o desafio, porém as subpopulações não B, não T, sim. Assim, a população $CD4^-CD8^-B220^-$ de células pequenas mostra uma tendência para o aumento ($p = 0.09$), e aquela com tamanho maior mostra níveis bem acima à dos animais crônicos controles ($p < 0.005$) (Figura 2).

Sessenta dias após o desafio, os números de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e B, assim como os das populações não T não B, se assemelham aos do grupo crônico

controle (Figura 2). O total de linfócitos B nos animais crônicos e crônicos desafiados, apesar de heterogêneo, mantém-se com as médias próximas nos dias dez e 60 do desafio (Figura 2). Estes resultados demonstram que o desafio de camundongos crônicos com o parasita leva a ativação do sistema imune, e que esta perdura pelo menos até o décimo dia; mas no dia 60 encontra-se em níveis equivalentes aos dos animais crônicos controles.

Dia 10

Dia 60

Figura 2: Efeito do desafio do animal crônico com uma única dose de *T. cruzi* Sylvio X10/4 no número total de células das subpopulações do baço. Animais crônicos e crônicos desafiados com 5×10^6 tripomastigotas (desafio único) foram sacrificados após 10 e 60 dias para análise do número de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e B no baço. Animal crônico controle (■), animal crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

4.1.2 Produção de IFN γ por células do baço do camundongo crônico após um único desafio com parasita homólogo

Para assegurar que uma única re-estimulação seria capaz de ativar o sistema imune, fomos avaliar os níveis do importante mediador IFN γ produzido por linfócitos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ no baço dos animais crônicos e crônicos desafiados. Para isso, a frequência de células produtoras de IFN γ^{+} entre os linfócitos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ foi mensurada, assim como os números totais de células CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} e CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} no baço. Dez e 60 dias após o desafio, camundongos crônicos, controles e desafiados, foram sacrificados e seus baços processados. Na sequência, as células foram mantidas por 12 horas em cultura à 37°C, sem estímulo (produção de IFN γ espontânea), ou na presença de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (produção de IFN γ estimulada).

Dia 10

Dia 60

Figura 3: Frequência dos linfócitos IFN γ^{+} no baço. Camundongos crônicos foram sacrificados 10 e 60 dias após desafio com uma única dose de *T. cruzi* Sylvio X10/4 e analisada a frequência de linfócitos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ produtores de IFN γ em forma espontânea e/ou após estimulação por 12h com anti-CD3 e anti-CD28. Camundongo crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes (* $p<0.05$).

A análise dos camundongos 10 dias após o desafio mostra que a re-estimulação em dose única mantém freqüências semelhantes de células CD4⁺ produtoras de IFN γ , com ou sem estímulo. Para as células CD8⁺ observamos nos camundongos desafiados uma tendência a sofrerem aumento na freqüência de células que produzem IFN γ em forma espontânea ($p=0.09$). Surpreendentemente, após estimulação *in vitro* com anti-CD3, as células CD8⁺ no baço dos animais do grupo desafiado exibem uma redução significativa na freqüência de células produtoras de IFN γ ($p<0.05$) (Figura 3).

No dia 60, a produção espontânea e estimulada de IFN γ pelos linfócitos CD4⁺ não difere significativamente entre o camundongo crônico e crônico desafiado. O mesmo ocorre com as células CD8⁺ dos camundongos desafiados, que no caso da produção espontânea apresentam uma média de freqüência de células produtoras de IFN γ maior que a dos crônicos, porém com grande variabilidade entre os animais do grupo (Figura 3).

Dia 10 **Dia 60**

Figura 4: Total dos linfócitos IFN γ ⁺ no baço. Camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 10 e 60 dias após desafio com uma única dose de *T. cruzi* Sylvio X10/4 e analisados os números totais de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ em forma espontânea e/ou após estimulação por 12h com anti-CD3 e anti-CD28. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes (** p<0,01; *** p<0.005).

A análise do total de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ positivos para IFN γ intracelular mostra que o nível de ativação do sistema imune é afetado após o desafio. Dez dias após este, há um aumento significativo no número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ em forma espontânea (respectivamente, p<0.005 e p<0.01) nos animais do grupo crônico desafiado (Figura 4). Após estimulação *in vitro* ocorre igualmente aumento no número de células produtoras de IFN γ nos animais desafiados, sendo que o número de células CD4⁺ IFN γ ⁺ aumenta 2,6 vezes (p<0.01) e o de células CD8⁺ IFN γ ⁺ cerca de duas vezes (p=0.05) (Figura 4)

Embora tenha havido significância para os resultados do décimo dia, no dia 60 pós-desafio, os níveis de linfócitos $\text{IFN}\gamma^+$ do grupo desafiado recuaram, indicando que o sistema imune voltou ao nível de ativação basal do animal crônico (Figura 4).

4.1.3 Aumento dos linfócitos CD4^+ e CD8^+ e das células produtoras de $\text{IFN}\gamma$ no sangue de camundongo crônico após um único desafio com *T. cruzi* homólogo

Após mostrarmos o notável aumento do número de linfócitos CD4^+ e CD8^+ , bem como do número destas células que produzem $\text{IFN}\gamma$ no baço do animal crônico após um único desafio com *T. cruzi* homólogo, fomos analisar no sangue dos mesmos animais, a frequência de linfócitos CD4^+ e CD8^+ (estimada individualmente) e a produção de $\text{IFN}\gamma$ (no “pool” de células de cada um dos grupos).

Figura 5: Efeito do desafio de camundongos crônicos com dose única de *T. cruzi* Sylvio X10/4 na frequência dos leucócitos CD4^+ , CD8^+ e B no sangue. Animais crônicos e crônicos desafiados com 5×10^6 tripomastigotas (desafio único) foram sacrificados após 10 e 60 dias para análise da frequência de linfócitos CD4^+ , CD8^+ e B no sangue. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: **** $p < 0.001$.

Similarmente ao que acontece no baço, a frequência das populações de linfócitos T CD4^+ e CD8^+ circulantes aumenta no décimo dia após o desafio. Contudo, é importante ressaltar o aumento dos linfócitos CD8^+ ($p < 0.001$), importantes na destruição do parasita intracelular, que tem um aumento médio de 2

vezes e atinge frequência similar à dos linfócitos T CD4⁺. Para a população de linfócitos B é visto o inverso, ou seja, uma redução maciça da frequência ($p < 0.001$) (figura 5). No dia sessenta do desafio, há recuo da ativação da resposta imune nos animais crônicos desafiados, que é evidenciado nas frequências das diferentes subpopulações linfocitárias que se apresentam próximas à dos crônicos controles (figura 5).

Para avaliar a capacidade efetora dos leucócitos do sangue, estimamos as frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN γ . Em função do pequeno número de células isoladas de cada animal, a quantificação das células produtoras de IFN γ foi realizada em “pools” (total de 10⁶ de células por grupo, a partir de um número igual de células de cada um dos indivíduos do grupo) de células dos diferentes grupos. Na seqüência, as células foram mantidas por 12 horas em cultura à 37° C, sem estímulo (produção de IFN γ espontânea), ou na presença de anti-CD3/CD28 (produção de IFN γ estimulada).

No décimo dia após desafio não encontramos diferenças na produção espontânea de IFN γ pelas células CD4⁺ e CD8⁺ dos dois grupos. No entanto, o aumento na frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN γ que resulta após estimulação *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 mostrou-se mais intenso no pool de células do sangue dos animais crônicos desafiados do que naquele dos animais crônicos (Figura 6).

Sessenta dias após o desafio, e em relação ao grupo crônico controle, o grupo crônico desafiado apresentou um leve aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que produzem espontaneamente IFN γ . No entanto, quando estimulados *in vitro* por anti-CD3/CD28, ambos os grupos atingem frequências similares de células CD4⁺IFN γ ⁺ e CD8⁺IFN γ ⁺. Este resultado pode indicar que o desafio não resulta em ativação duradoura.

Dia 10 **Dia 60**

Figura 6: Efeito do desafio de camundongos crônicos com dose única de *T. cruzi* Sylvio X10/4 na frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ no sangue. Camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 10 e 60 dias após desafio único. Foram feitos "pools" de células sanguíneas para cada grupo e analisada a média de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ em forma espontânea e/ou após estimulação por 12h com anti-CD3 e anti-CD28. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□).

4.1.4 Avaliação da produção de anticorpos *T. cruzi*-específicos de animais crônicos após desafio único

Uma vez que a resposta humoral é extremamente importante no estabelecimento de uma imunidade protetora durante a infecção crônica pelo *T. cruzi*, decidimos avaliar se haveria mudanças na produção de anticorpos parasita-específicos aos 10 e 60 dias após desafio único com *T. cruzi* homólogo. Para verificarmos isto, utilizamos extratos totais do parasita como antígeno e analisamos por ensaio imunoenzimático (ELISA) a presença de anticorpos específicos do tipo

IgG1 e IgG2a no soro dos animais crônicos e crônicos desafiados. Observando a figura 7, podemos perceber que o desafio melhorou a resposta humoral no dia 10, já que aumentos consideráveis de imunoglobulinas IgG1 ($P<0.05$) e IgG2a ($P<0.005$) foram encontrados nos soros dos animais desafiados. Embora os níveis séricos destes anticorpos estiverem elevados logo após o re-estímulo, aos 60 dias do desafio a comparação dos grupos crônicos e crônicos desafiados não revelou grandes diferenças, mostrando que o desafio único não exerce uma mudança prolongada na resposta protetora por anticorpos.

Dia 10

Dia 60

Figura 7: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos 10 e 60 dias após um único desafio com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sangrados 10 e 60 dias após desafio único e os soros coletados para determinação da presença de anticorpos *T. cruzi*-específicos IgG1 e IgG2a. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes (* $p<0,05$; *** $p<0.005$).

4.1.5 A carga parasitária dos camundongos crônicos não diminui após um único desafio com parasita homólogo

Para determinar a carga parasitária subpatente no sangue de camundongos crônicos controles e crônicos desafiados, realizamos culturas em meio LIT suplementado de alíquotas (5µl) de sangue dos diferentes animais (três culturas por animal) por ocasião do sacrifício destes nos dias 10 e 60 do desafio. As culturas foram analisadas duas vezes por semana quanto ao crescimento de epimastigotas.

Sangue

Figura 8: Análise do parasitismo subpatente no sangue de animais crônicos e crônicos após desafio único com parasita homólogo. Nos dias 10 e 60 pós-desafio, os animais foram sacrificados e 3 alíquotas de sangue de cada animal cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitas nas culturas nas semanas subsequentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Crônico controle (■) e crônico desafiado (■)

No dia 10 após o desafio a carga parasitária mostrou-se superior nos animais do grupo crônico desafiado. Isto foi observado em relação à frequência de animais que deram culturas positivas, e, em menor intensidade, em relação à frequência de culturas positivas no conjunto de animais do grupo (Figura 8). No dia 60 pós-desafio, entretanto, a positividade das culturas LIT foi semelhante no grupo crônico e grupo crônico desafiado (Figura 8), indicando não haver maiores diferenças nesta data na carga parasitária sanguínea dos dois grupos de animais.

Carga Parasitária no Coração

Figura 9: Análise de parasitismo subpatente no coração de animais crônicos e crônicos após desafio único com parasita homólogo. Nos dias 10 e 60 pós-desafio, os animais foram sacrificados e 3 alíquotas de macerado cardíaco de cada animal cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitas nas culturas nas semanas subsequentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Cada grupo crônico controle representado pela figura (■) e crônico desafiado pela figura (■).

Em relação à carga parasitária cardíaca, níveis discretamente inferiores de parasitismo foram revelados pelas culturas em meio LIT nos animais do grupo crônico desafiado, aos 60 dias pós-desafio (Figura 9).

4.1.6 A patologia cardíaca de camundongos crônicos não é reduzida após desafio único com parasita homólogo

No que se refere ao infiltrado inflamatório no coração, um dos principais expoentes da patologia cardíaca, numa análise provisória avaliada por cruzes (0; nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: média; 4: intensa e 5: severa), não observamos diferenças entre os grupos crônico controle e crônico desafiado (Figura 10). Isto foi patente tanto aos dez dias do desafio como aos sessenta.

Patologia cardíaca
Dia 10

Dia 60

Figura 10: Avaliação da patologia cardíaca de camundongos crônicos controle e crônicos desafiados após desafio único com parasita homólogo. Camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados nos dias 10 e 60 após um único desafio e o coração avaliado qualitativamente em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□).

Para a patologia muscular (quadríceps), observamos que os animais do grupo crônico desafiado apresentam infiltrados similares aos dos animais crônicos controle. Entretanto, no dia 10 pós-desafio, os animais do grupo desafiado apresentaram níveis de hepatite discretamente superiores aos do grupo crônico (Figura 11). No dia 60, a média de intensidade da infiltração leucocitária no músculo e fígado foi equivalente em ambos os grupos (Figura 11).

Patologia Dia 10

Figura 11: Avaliação da patologia cardíaca, muscular e hepática de camundongos crônicos controles e crônicos desafiados após desafio único com parasita homólogo. Camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 10 e 60 dias após o desafio e a intensidade de patologia no coração, músculo estriado (quadríceps) e fígado avaliada semi-quantitativamente pela presença de infiltrados celulares. Camundongo crônico controle (■) e crônico desafiado (□).

EXPERIÊNCIA II

Efeito do desafio sustentado com parasita homólogo I

4.2.1 Um aumento da resposta anti-*T. cruzi* é também obtida após desafio sustentado com parasita homólogo

Os resultados acima mostram que aos 60 dias após do animal crônico ter recebido um único desafio com *T. cruzi* homólogo não há redução da inflamação nos diferentes órgãos, e a diminuição da carga parasitária no sangue e coração é pequena. Isto poderia ser interpretado como indicativo da inabilidade do desafio único em manter otimizada a resposta imune por tempo prolongado. Seguindo por este caminho, decidimos verificar o que aconteceria no animal crônico se prolongássemos a exposição ao antígeno. Camundongos C3H/HePAS machos e fêmeas cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio X10/4 foram desafiados com doses de 5×10^6 tripomastigotas vivos, por quatro vezes (as 2 primeiras i.v e as 2 últimas i.p), com intervalos de 3 semanas. Os machos foram sacrificados 35, e as fêmeas 45 dias após o último desafio para mensurar os níveis de ativação do sistema imune, carga parasitária e patologia.

Machos

Figura 12: Efeito do desafio sustentado na frequência e no número total de linfócitos no baço de animais crônicos. Animais C3H/HePAS machos crônicos e crônicos desafiados por quatro vezes com 5×10^6 tripomastigotas Sylvio X10/4 foram sacrificados 35 dias após a última dose para análise da frequência (acima) e do número total (abaixo) de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e B no baço. Camundongos crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□).

Trinta e cinco dias após o último desafio, os camundongos machos crônicos desafiados apresentam frequências de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e B, assim como de outras populações não T e B, equiparáveis às dos camundongos crônicos controles. Na avaliação do número total de células no baço, observamos nos animais desafiados discretos aumentos que não são significativos nas três subpopulações linfocitárias, contudo mais evidentes na população T CD4⁺ ($p=0.06$). Nas populações não T não B os números de células por baço se mostraram inalterados após o desafio sustentado (Figura 12).

Para as fêmeas, sacrificadas aos 45 dias do último desafio, os resultados da frequência e do número total de células por baço diferem em pouco aos obtidos nos machos. As diferenças entre as fêmeas desafiadas e as controles foram mais intensas que as dos machos. Assim, a tendência observada nos machos desafiados em apresentarem um número maior de linfócitos T CD4⁺, passa a ser uma diferença estatisticamente significativa nas fêmeas desafiadas ($p<0.01$) (Figuras 13). Os discretos aumentos observados nos números totais dos animais crônicos submetidos a quatro desafios indicam que a potenciação na ativação do sistema ainda persiste após 35-45 dias.

Figura 13: Efeito do desafio sustentado na frequência e no número total de linfócitos no baço de camundongos crônicos. Camundongos C3H/HePAS fêmeas crônicos e crônicos desafiados por quatro vezes com 5×10^6 tripomastigotas Sylvio X10/4 foram sacrificados 45 dias após a última dose para análise da frequência (acima) e do número total (abaixo) de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e B no baço. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2.2 Aumento da produção de $IFN\gamma$ por esplenócitos do animal crônico após desafio sustentado com parasita homólogo

Para determinar se o desafio sustentado com parasita homólogo eleva a capacidade efetora do sistema imune frente ao *T. cruzi*, estimamos as frequências de linfócitos produtores de $IFN\gamma$ nas populações T $CD4^+$ e $CD8^+$ nos camundongos crônicos controles e crônicos desafiados, aos 35 e 45 dias do último desafio, respectivamente, para machos e fêmeas.

Nos camundongos crônicos machos, as frequências dos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ esplenócitos produtores de $IFN\gamma$ se mantêm inalteradas após os desafios. Isto

é observado tanto para a produção espontânea como na estimulação com anti-CD3/CD28.

Figura 14: Efeito do desafio sustentado na frequência dos CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos produtores de IFN γ de camundongos crônicos. Camundongos machos e fêmeas crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 35 e 45 dias após o último desafio respectivamente, e analisados quanto à frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ de forma espontânea e/ou após 12h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□).

É importante notar que, em ambos os grupos de animais, crônicos e crônicos desafiados, a produção espontânea de IFN γ é semelhante nos linfócitos CD4⁺ e linfócitos CD8⁺. No entanto, após 12 horas de estimulação com anti-CD3/CD28 observa-se nos dois grupos de animais que aproximadamente 40% dos linfócitos CD8⁺ esplênicos produzem IFN γ , e somente 15% dentre as células CD4⁺ (Figura 14). Isto é observado tanto nos machos como nas fêmeas, o que sugere a existência de uma maior frequência de células de memória entre os linfócitos CD8⁺, do que entre os linfócitos CD4⁺ (Figura 14).

O número total de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ esplênicos produtores de IFN γ foi também avaliado nos camundongos crônicos, machos e fêmeas. Em relação à produção espontânea, os camundongos machos desafiados mostram tendência a

exibirem números de células $CD4^+ IFN\gamma^+$ superiores aos dos crônicos controles ($p=0.05$), mas os números de células $CD8^+ IFN\gamma^+$ não são diferentes entre os grupos. Após estímulo com anti-CD3/CD28, torna-se mais evidente o aumento das células $CD4^+ IFN\gamma^+$ no grupo dos animais machos desafiados ($p<0.05$) e observa-se um discreto aumento no número de células $CD8^+ IFN\gamma^+$ ($p=0.07$) (Figura 15).

Machos

Fêmeas

Figura 15: Total de linfócitos $IFN\gamma^+$ no baço do animal crônico após desafio sustentado. Camundongos machos e fêmeas, crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 35 e 45 dias após último de quatro desafios, e analisados quanto ao número total de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ produtores de $IFN\gamma$ de forma espontânea ou após 12h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p<0.05$, **** $p<0.001$.

Para as fêmeas (Figura 15), não se observam diferenças entre os animais crônicos controles e crônicos desafiados quanto ao número de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ que produzem $IFN\gamma$ de maneira espontânea. Entretanto, de modo similar aos machos, após o estímulo *in vitro* com anti-CD3/CD28, as fêmeas desafiadas apresentam elevação significativa do número de células $CD4^+ IFN\gamma^+$ ($P<0.001$) e um discreto aumento sem significância na média do número de células $CD8^+ IFN\gamma^+$.

4.2.3 Aumento da produção de $IFN\gamma$ por células $CD8^+$ do sangue de animais crônicos após desafio sustentado

Visto o aumento de linfócitos produtores de $\text{IFN}\gamma$ no baço dos animais crônicos submetidos à desafios sustentados, decidimos verificar se tal efeito seria promovido nos leucócitos do sangue. Para isso, camundongos crônicos desafiados, machos e fêmeas, foram sacrificados respectivamente 35 e 45 dias após o último desafio, e avaliados em relação à frequência das subpopulações CD4^+ e CD8^+ no sangue, assim como em relação à frequência das células produtoras de $\text{IFN}\gamma$, sendo que esta última análise foi realizada com “pools” de sangue dos animais de cada grupo.

Machos

Figura 16: Média da frequência de linfócitos no sangue de animais crônicos (machos) após desafio sustentado com parasita homólogo. Camundongos machos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 35 dias após o último desafio, e a frequência dos linfócitos CD4^+ , CD8^+ e B analisada no sangue. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□).

Figura 17: Aumento da frequência de linfócitos CD8^+ produtores de $\text{IFN}\gamma$ no sangue dos animais crônicos (machos) após desafio sustentado. Camundongos machos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 35 dias após o último desafio. Foram feitos “pools” de células para cada grupo, e analisados quanto à frequência de linfócitos CD4^+ e CD8^+ que produzem $\text{IFN}\gamma$ de forma espontânea e após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 por 12h. Grupo crônico controle (■) e crônico desafiado (□).

A frequência de linfócitos CD4^+ , CD8^+ e B no sangue, avaliada de maneira individual (dados não mostrados) e pela média, é similar nos camundongos crônicos machos e crônicos desafiados (Figura 16). Por outro lado, as porcentagens

dos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue que produzem $IFN\gamma$ de forma espontânea do grupo crônico desafiado mostram-se inferiores daquelas no grupo crônico controle. No entanto, após estimulação com anti-CD3 e anti-CD28 *in vitro*, o aumento nas porcentagens de células $CD4^+IFN\gamma^+$ e $CD8^+IFN\gamma^+$ do grupo crônico desafiado ultrapassa os observados no grupo controle (figura 17), fenômeno que é particularmente expressivo no compartimento das células T $CD8^+$.

Fêmeas

Figura 18: Média da frequência de linfócitos no sangue de animais crônicos (fêmeas) após desafio sustentado com parasita homólogo. Camundongos fêmeas crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 45 dias após o último desafio, e a frequência de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$ e B analisada no sangue. Grupo crônico controle (■) e grupo crônico desafiado (□)

Figura 19: Aumento da frequência de linfócitos $CD8^+IFN\gamma^+$ no sangue de animais crônicos (fêmeas) após desafio sustentado com parasita homólogo. Camundongos fêmeas crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 45 dias após o último desafio. Foram feitos "pools" de células para cada grupo, e analisados quanto a frequência de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ que produzem $IFN\gamma$ de forma espontânea e após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 por 12h. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□).

Para as fêmeas, as frequências de linfócitos $CD4^+$ e B no sangue dos animais em ambos os grupos. Uma pequena redução é, entretanto, observada para os linfócitos $CD8^+$ dos animais crônicos desafiados (figura 18). A frequência de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue que produzem espontaneamente $IFN\gamma^+$ é

discretamente inferior no grupo crônico desafiado. Mais ainda, após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, a porcentagem de linfócitos CD4⁺ produtores de IFN γ é menor no grupo crônico desafiado do que no grupo crônico controle. Contudo, de forma análoga ao observado nos camundongos machos, após a estimulação com anti-CD3/CD28, a frequência de células CD8⁺ produtoras de IFN γ no grupo crônico desafiado mostra um forte aumento, que reflete no dobro do alcançado no grupo crônico controle (Figura 19). Estes resultados sugerem que, analogamente ao observado no baço, a frequência de células de memória CD8⁺ encontra-se aumentada no sangue.

4.2.4 Aumento da capacidade proliferativa dos linfócitos T esplênicos específicos de camundongos machos crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo

Outra abordagem utilizada para avaliar a resposta imune frente ao *Trypanosoma cruzi* foi através do ensaio de proliferação. Camundongos crônicos e crônicos desafiados machos foram sacrificados 35 dias após o último desafio, e tiveram o baço processado, as células marcadas com CFSE e posteriormente, mantidas em cultura por 72 e 96 horas com meio RPMI apenas, anticorpos anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi*. A frequência de células que sofreram divisão foi determinada por citometria de fluxo pela baixa expressão do CFSE em esplenócitos CD4⁺ e CD8⁺ marcados com anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺.

72 horas

CD4⁺

CD8⁺

Figura 20: Aumento da frequência de linfócitos em proliferação nos animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo. Camundongos machos crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 35 dias após o último de quatro desafios, tiveram o baço processado, as células mantidas por 72h em cultura com RPMI apenas, anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi* e depois analisadas quanto à porcentagem de linfócitos CD4⁺ (esquerda) ou CD8⁺ (direita) CFSE^{LOW}. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * p<0.05, *** p<0.005.

No ensaio de proliferação por 72h, os resultados mostram que nos splenócitos do grupo crônico desafiado a porcentagem de células CD4⁺ que expressam níveis reduzidos de CFSE é relativamente mais alta do que nos animais crônicos. Isto foi observado tanto na ausência de estímulo (p<0.005), como após estimulação com anti-CD3 (p<0.05) ou antígeno de *T. cruzi* (p<0.005). As células CD8⁺ dos animais desafiados também mostraram maior proliferação às 72 horas que as dos animais crônicos. Isto foi observado na presença de apenas meio (p<0.05) e quando estimuladas com anti-CD3 (p<0.05) ou com antígeno de *T. cruzi*, apesar que neste último caso foi uma tendência ao aumento (p=0.07) (Figura 20)

96 horas

CD4⁺CD8⁺

Figura 21: Aumento da frequência de linfócitos em proliferação nos animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo. Camundongos machos crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 35 dias após o último de quatro desafios, tiveram o baço processado, as células mantidas por 96h em cultura com RPMI apenas, anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi*, e depois analisadas quanto à porcentagem de linfócitos CD4⁺ (esquerda) ou CD8⁺ (direita) CFSE^{LOW}. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: *** p<0.005.

Após 96 horas de cultura a análise nos mostra que a porcentagem de células CD4⁺ em proliferação nos animais desafiados é significativamente mais alta do que nos animais crônicos, com exceção da proliferação espontânea. Na resposta a anti-CD3, aproximadamente 48% das células CD4⁺ dos camundongos desafiados tem queda da expressão de CFSE contra aproximadamente 28% nas células dos camundongos crônicos (p=0.08). Na presença do antígeno de *T. cruzi*, a diferença entre os grupos é altamente significativa, com aproximadamente 38% das células CD4⁺ dos animais desafiados expressando baixo nível de CFSE (p<0.005). Com relação às células CD8⁺, a proliferação após 96 horas de cultura mostra um discreto aumento nos animais crônicos desafiados em relação aos crônicos, tanto em resposta ao anti-CD3, como ao antígeno de *T. cruzi*, mas as diferenças não são significativas (Figura 21).

4.2.5 Aumento da produção de anticorpos *T. cruzi*-específicos nos animais crônicos após desafio sustentado

Na experiência de desafio único dos animais crônicos, mostrada na primeira parte dos resultados, observamos aumento nos níveis de anticorpos de subclasses importantes para o “clearance” do *T. cruzi*. Lembrando que aos 10 dias após o desafio os anticorpos específicos das subclasses IgG1 e IgG2a estão aumentados nos animais desafiados, e que aos 60 dias do desafio não há grandes diferenças entre os grupos, nos faltava saber como iria se comportar a resposta humoral do animal crônico após desafio sustentado. Novamente utilizamos extratos do parasita como antígenos para análise dos níveis de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA) de camundongos crônicos sangrados 35 e 45 dias após o desafio, para machos e fêmeas respectivamente.

Figura 22: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos crônicos e crônicos desafiados, machos e fêmeas foram sangrados 35 e 45 dias respectivamente após desafio sustentado e os soros coletados para determinação da presença de anticorpos *T. cruzi*-específicos IgG1 e IgG2a. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$).

A figura 22 nos mostra que camundongos crônicos 35 dias após terem recebido o último desafio apresentam níveis aumentados das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a. Apesar do aumento ser maior para IgG1, os níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* de ambas as subclasses diferem significativamente nos animais crônicos e crônicos desafiados ($p < 0.05$). Já em relação aos níveis séricos de anticorpos presentes nas fêmeas crônicas sangradas 45 dias após o último desafio, apenas a imunoglobulina G1 está aumentada ($p < 0.05$). Estes resultados mostram que o desafio sustentado poderia resultar em uma proteção duradoura por anticorpos da subclasse IgG1 em animais crônicos.

4.2.6 Redução da carga parasitária no sangue do camundongo crônico após desafio sustentado

Para avaliar se o desafio sustentado é capaz de reduzir os níveis de parasitemia subpatente no sangue, camundongos C3H/HePAS crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados 35 e 45 dias após o último desafio, e o sangue coletado. Triplicatas de culturas em meio LIT com alíquotas de 5µl de sangue foram estabelecidas. Periodicamente estas foram analisadas quanto à sua positividade. A porcentagem de camundongos machos desafiados que tiveram culturas positivas foi expressivamente menor, mostrando uma redução de 60% em relação à dos camundongos crônicos controles. Quanto estes resultados são expressos em função da frequência do total de culturas positivas por grupo, os animais crônicos controles tiveram 60% de poços positivos, enquanto que nos animais crônicos desafiados este valor foi de 40% (Figura 23).

Figura 23: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado. No dia 35 pós-desafio, os animais machos foram sacrificados e 3 alíquotas de sangue de cada animal foram cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitas nas semanas subsequentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Grupo crônico controle (■) e crônico desafiado (■)

Para as fêmeas, os resultados obtidos são igualmente promissores. Enquanto que os animais crônicos controles mostram uma positividade de 50%, os crônicos desafiados positivaram apenas 18%. Na análise das culturas positivas por

grupo, o grupo crônico controle mostrou 30% de positividade, contra 5,6% no grupo crônico desafiado (Figura 24).

O resultado deste experimento sugere que diferentemente do ocorrido no experimento com desafio único, camundongos C3H/HePAS crônicos diminuem a carga parasitaria subpatente no sangue após desafio sustentado com parasita homólogo.

Fêmeas

Figura 24: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado. No dia 45 pós-desafio, os animais fêmeas foram sacrificados e 3 alíquotas de sangue de cada animal foram cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitas nas culturas nas semanas subseqüentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Grupo crônico controle (■) e crônico desafiado (■).

4.2.7 A patologia cardíaca dos camundongos crônicos é reduzida após desafio sustentado

Para avaliar o impacto que o aumento da resposta imune provocada pelo desafio sustentado exerce na patologia, camundongos crônicos controles e crônicos desafiados foram sacrificados nos dias 35 (machos) e 45 (fêmeas) após desafio e a infiltração leucocitária no coração, músculo estriado (quadríceps) e fígado, estimada de forma qualitativa por análise duplo cego (0: nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: média; 4: intensa e 5: severa).

Nos camundongos machos crônicos os repetidos desafios levam a uma diminuição no número de infiltrados no coração no seu aspecto global. A redução da

miocardite é leve, porém significativa ($p<0.05$). A pericardite também apresenta menor intensidade nos animais crônicos desafiados, enquanto que para o endocárdio não há diferença entre os grupos. No fígado não observamos diferenças entre os grupos e, em relação à patologia muscular, observamos um discreto aumento nos animais crônicos desafiados. (Figura 25).

Figura 25: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda), muscular e hepática (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos. Camundongos machos crônicos controles e crônicos desafiados por quatro vezes foram sacrificados 35 dias após o desafio e avaliados de forma qualitativa em relação à intensidade de patologia no coração, músculo esquelético e fígado pela presença de infiltrados celulares. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p<0.05$.

Com relação às fêmeas, os animais crônicos desafiados apresentam uma intensidade na patologia cardíaca global inferior a dos crônicos controles ($p<0.05$), embora apenas a diferença na pericardite seja significativa na análise segmentada ($p<0.05$). Contudo, é importante destacar que a patologia crônica cardíaca é menos intensa nos camundongos crônicos fêmeas do que nos machos. No músculo estriado e fígado dos camundongos fêmeas desafiados, uma redução da patologia também pode ser registrada ($p<0.05$) (Figura 26).

Fêmeas

Figura 26: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda), muscular e hepática (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos. Camundongos fêmeas crônicas controles e crônicos desafiados por quatro vezes foram sacrificados 45 dias após o desafio e avaliadas de maneira qualitativa em relação à intensidade de patologia no coração, músculo esquelético e fígado pela presença de infiltrados celulares. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$.

Em uma segunda análise da patologia cardíaca, juntamos os dados de patologia cardíaca dos camundongos machos e das fêmeas com o objetivo de aumentar o número, e tornar os dados mais precisos e significantes. Nesta análise observamos redução significativa da pericardite ($p < 0.01$) e da patologia total cardíaca (avaliação global do órgão) ($p < 0.05$) nos camundongos crônicos desafiados, embora as médias para a miocardite e endocardite também estejam inferiores neste grupo (Figura 27). O conjunto dos resultados torna patente a idéia de que o desafio sustentado como forma de otimizar a resposta imune ao *T. cruzi* possa ter impacto sobre a patologia cardíaca dos animais crônicos.

Figura 27: Avaliação da patologia cardíaca no conjunto de machos e fêmeas crônicos após desafio sustentado. Camundongos machos e fêmeas crônicos controles e crônicos desafiados por quatro vezes foram sacrificados 35 e 45 dias após o desafio e a patologia no coração avaliada de maneira qualitativa em relação à intensidade dos infiltrados celulares. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Quadro: Fotografias representativas das lesões no tecido cardíaco e da presença de ninhos. (A) Tecido cardíaco de animal não infectado livre de infiltrados celulares. (B) Intenso infiltrado celular grau 4,5 no miocárdio de camundongo fêmea crônico desafiado. (C) Pericardite de grau 4 de camundongo fêmea crônico desafiado. (D) Endocardite grave grau 5 de camundongo fêmea crônico desafiado. (E) Infiltrado inflamatório de grau 5 na região da aurícula do camundongo macho crônico. (F) Ninho de *Trypanosoma cruzi* com infiltrado celular no tecido cardíaco do camundongo macho crônico. As fotografias A, B, C, D e E foram feitas com a objetiva x20, e a fotografia F com a objetiva x100.

EXPERIÊNCIA III

Efeito do desafio sustentado com parasita

Homólogo II

4.3.1 Aumento da capacidade proliferativa específica das células CD4⁺ de animais crônicos após desafio sustentado com parasita homólogo

Para confirmar os resultados obtidos na primeira experiência de desafio sustentado do animal crônico (desafio sustentado II), decidimos avaliar em uma outra experiência alguns dos parâmetros principais obtidos na experiência anterior: a proliferação específica das células T CD4⁺ e CD8⁺ ao antígeno de *T. cruzi*, os níveis de anticorpos séricos, a carga parasitária no sangue e a patologia nos diferentes órgãos dos grupos crônicos e crônicos desafiados. Além destas avaliações, incluímos neste novo experimento uma avaliação da produção de citocinas *in vitro*.

Camundongos C3H/HePAS fêmeas com aproximadamente 120 dias de infecção foram desafiados por quatro vezes (2 i.v e 2 i.p) com inóculo de 5×10^6 do parasito homólogo vivo, sacrificados 68 dias após o último desafio e avaliados em relação a animais crônicos não desafiados.

Para o ensaio de proliferação, conforme procedido no experimento anterior, os camundongos tiveram o baço processado, as células marcadas com o fluorocromo CFSE e posteriormente mantidas em cultura por 72 e 96 horas com meio apenas, anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi*. Após este período a divisão celular foi estimada pela frequência de células CD4⁺ ou CD8⁺ com expressão diminuída de CFSE.

72 horas

CD4⁺

CD8⁺

Figura 28: Frequência de linfócitos em proliferação no animal crônico após desafio sustentado.

Camundongos fêmeas crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 68 dias após o último de quatro desafios, tiveram o baço processado, as células mantidas por 72h em cultura com RPMI apenas, anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi* e a seguir analisados quanto à porcentagem de linfócitos CD4⁺ (esquerda) ou CD8⁺ (direita) CFSE^{LOW}. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$.

No ensaio realizado por 72 horas em cultura, com ou sem estímulo, se observam porcentagens similares de células $CD4^+ CFSE^{LOW}$ entre os animais dos grupos crônico e desafiado. Em relação à proliferação das células $CD8^+$ neste mesmo período, as porcentagens novamente se assemelham nos animais dos grupos crônico e desafiado estimulados com anti-CD3 e antígeno de *T. cruzi*. Contudo, a proliferação espontânea (apenas com meio RPMI) mostrou-se superior no grupo crônico (Figura 28).

96 horas

CD4+

CD8+

Figura 29: Frequência de linfócitos em proliferação no animal crônico após desafio sustentado.

Camundongos fêmeas crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 68 dias após o último de quatro desafios, tiveram o baço processado, as células mantidas por 96h em cultura com RPMI apenas, anti-CD3 ou antígeno de *T. cruzi* e a seguir analisados quanto à porcentagem de linfócitos $CD4^+$ (esquerda) ou $CD8^+$ (direita) $CFSE^{LOW}$. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$.

Após 96 horas, as células $CD4^+$ dos animais desafiados apresentam uma porcentagem significativamente mais alta ($P < 0.005$) de células $CFSE^{LOW}$ em resposta à estimulação *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* que aquelas do grupo crônico controle, embora isso não ocorra na ausência de estímulo ou na estimulação com anti-CD3. Já as células $CD8^+$ apresentam médias equivalentes para ambos os grupos quando mantidas com ou sem estímulo (Figura 29).

4.3.2 Produção de anticorpos *T. cruzi*-específicos nos animais crônicos após desafio sustentado

Bem como no desafio sustentado anterior de animais crônicos, novamente fomos avaliar os níveis de anticorpos *T. cruzi*-específicos encontrados em animais crônicos e crônicos desafiados. Camundongos machos e fêmeas foram sacrificados respectivamente, 55 e 68 dias após o último desafio, e tiveram avaliados pelo método de ELISA os níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a.

Figura 30: Avaliação da resposta humoral de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos crônicos e crônicos desafiados, machos e fêmeas foram sangrados 55 e 68 dias respectivamente após desafio sustentado e os soros coletados para determinação da presença de anticorpos *T. cruzi*-específicos IgG1 e IgG2a. Crônicos controles (□) e crônicos desafiados (■). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$).

Como mostrado na figura 30, aos 55 dias do último desafio, os camundongos machos crônicos não apresentam mudanças significativas nos níveis de anticorpos antígeno-específicos IgG2a e IgG1. Contudo, as fêmeas crônicas desafiadas mantém potencializada a resposta humoral por mais tempo, já que mesmo tendo sido sacrificadas 68 dias após o último desafio, os níveis da imunoglobulina IgG1 permanecem elevados quando comparados com aqueles das fêmeas crônicas não desafiadas ($p < 0.05$). Isso corrobora com o fato das fêmeas serem mais resistentes às infecções do que os machos.

4.3.3 Produção de citocinas *in vitro* de camundongos crônicos após desafio sustentado

Levando em consideração o fato de nas duas experiências de desafio sustentado termos obtido uma maior proliferação ao antígeno de *T. cruzi* pelos esplenócitos CD4⁺ dos animais do grupo desafiado, mas havendo discordâncias na classe de anticorpos específicos aumentados no soro após desafio (IgG2a e IgG1 na primeira experiência e somente IgG1 na segunda), restava-nos saber qual o padrão de citocinas que poderia estar associado ao perfil de resposta aumentada desta segunda experiência. Camundongos crônicos machos e fêmeas foram sacrificados 55 e 68 dias após o último desafio, respectivamente, tiveram o baço processado, os esplenócitos coletados e mantidos em cultura por 48 e 72 horas na presença de antígeno de *T. cruzi*. Após esse período, coletamos os sobrenadantes para mensurar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ e TNF α pelo ensaio de CBA (Cytometric Bead Array). Avaliamos também por Elisa de captura, a produção da importante citocina reguladora, IL-10.

Machos

Figura 31: Análise através do ensaio CBA da produção de citocinas Th1 e Th2 de animais crônicos machos após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos machos crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 55 dias após o desafio, os esplenócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* por 48 e 72 horas, e os sobrenadantes das culturas processados para determinação da produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ e TNF α . Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. As linhas horizontais indicam os valores médios das citocinas produzidas, após 48-72 h de cultura na presença de antígeno de *T. cruzi*, pelos esplenócitos de animais não infectados.

Quando comparados aos animais crônicos, os camundongos machos crônicos desafiados mostram uma produção semelhante de IL-2 nos sobrenadantes das culturas de 48 horas. Com relação às citocinas do padrão Th2, IL-4 e IL-5, diferenças também são observadas. Nos machos desafiados a IL-4 tem um pequeno aumento não significativo, enquanto que para a IL-5, se observa aumento no grupo desafiado próximo do limite de significância. Quanto à produção do IFN γ , verificamos que em ambos os grupos, crônicos e crônicos desafiados, os níveis são bastante elevados, entretanto, os animais crônicos desafiados mais uma vez apresentam

níveis discretamente superiores, porém não significativos, aos encontrados nos animais crônicos. Diferentemente do $\text{IFN}\gamma$, o $\text{TNF}\alpha$ está presente em níveis mais altos nos sobrenadantes dos esplenócitos dos animais crônicos controles do que naqueles dos animais crônicos desafiados, fenômeno observado tanto as 48 como às 72 horas, mas que não atinge significância estatística (Figura 31).

Figura 32: Análise através do ensaio CBA da produção de citocinas Th1 e Th2 de animais crônicos fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos fêmeas crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 68 dias após o desafio, os esplenócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* por 48 e 72 horas, e os sobrenadantes das culturas processados para determinação da produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ e TNF α . Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. As linhas horizontais indicam os valores médios das citocinas produzidas, após 48-72 h de cultura na presença de antígeno de *T. cruzi*, pelos esplenócitos de animais não infectados.

Na avaliação das citocinas presentes nos sobrenadantes das fêmeas, podemos observar um aumento da produção de IL-2 nos animais desafiados apenas às 48 horas de cultura. Já para nossa surpresa, as citocinas IL-4 e IL-5 se apresentam em quantidades significativamente maiores nas fêmeas desafiadas ($P<0.05$), tanto as 48 como às 72 horas. Do mesmo modo o $\text{IFN}\gamma$ é superior nos animais desafiados, com médias equivalentes nos dois tempos, 48 e 72 horas. Contudo, contrário aos resultados dos machos desafiados, as fêmeas desafiadas apresentam níveis superiores do $\text{TNF}\alpha$ as 48 horas (Figura 32).

Figura 33: Análise através do ensaio de Elisa de captura da produção de IL-10 por esplenócitos de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos machos (esquerda) e fêmeas (direita), crônicos e crônicos desafiados, foram sacrificados 55 ou 68 dias após o desafio sustentado e a produção da citocina IL-10 determinada no sobrenadante das culturas dos esplenócitos estimulados por 48-72 horas na presença de antígeno de *T. cruzi*. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.001$. As linhas horizontais indicam os valores médios da citocinas produzida, após 48-72 h de cultura na presença de antígeno de *T. cruzi*, pelos esplenócitos de animais não infectados.

Na avaliação do nível da citocina IL-10 por Elisa, os camundongos machos desafiados apresentam níveis semelhantes aos dos crônicos às 48 horas, porém às 72 horas, ocorre um aumento expressivo desta citocina no sobrenadante dos esplenócitos dos animais desafiados ($p<0.05$). Já para as fêmeas, um aumento significativo na produção de IL-10 pôde ser demonstrado no sobrenadante de 48 horas dos animais do grupo desafiado ($p<0.005$) (Figura 33). Estes resultados podem indicar que mesmo os animais desafiados produzam quantidades discretamente mais elevadas do $\text{IFN}\gamma$, moléculas anti-inflamatórias são também induzidas pelo desafio, o que indica o alto nível de regulação da atividade efetora frente o parasito.

4.3.4 Análise da produção de óxido nítrico *in vitro* de animais crônicos após desafio sustentado

Embora o desafio possa induzir um pequeno aumento da capacidade de produzir IFN γ em resposta ao antígeno de *T. cruzi* pelos esplenócitos do animal crônico, as citocinas com função antagônica IL-5 e IL-10, também se apresentaram elevadas. Considerando a possibilidade da IL-10 interferir nas atividades pró-inflamatórias dos macrófagos, decidimos avaliar a presença do óxido nítrico (NO) de maneira indireta pela estimativa das concentrações de nitrito nos sobrenadantes de camundongos machos e fêmeas, crônicos e crônicos desafiados. Esplenócitos totais coletados após 55 e 68 dias do último desafio de machos e fêmeas respectivamente foram mantidos em cultura com, ou sem a presença de antígeno de *T. cruzi* e 48 e 72 horas depois os sobrenadantes foram aliqotados e os níveis de NO mesurados.

Figura 34: Análise da produção do óxido nítrico pelos esplenócitos de animais crônicos machos e fêmeas após desafio sustentado com parasitas Sylvio X10/4. Camundongos machos e fêmeas, crônicos e crônicos desafiados foram sacrificados 55 e 68 dias após o desafio sustentado respectivamente e os baços processados para determinação da produção do NO pelos esplenócitos após cultura por 48 e 72 horas na presença de antígeno de *T. cruzi*. Crônicos controles (■) e crônicos desafiados (□). O asterisco indica resultados estatisticamente diferentes: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Os sobrenadantes dos esplenócitos de camundongos machos desafiados apresentaram níveis comparáveis de NO aos dos animais crônicos, ou seja, o desafio não causou o aumento da atividade microbicida dos macrófagos, avaliada pela produção do NO. Isto pode ser observado tanto nas culturas de 48 como nas de 72 horas, espontaneamente ou estimuladas com antígeno de *T. cruzi*. Por outro lado, as fêmeas desafiadas produzem níveis mais altos de NO as 48 e 72 horas de modo espontâneo, e às 48h com estímulo antigênico (Figura 34).

4.3.5 Aumento da carga parasitária sangüínea nos animais crônicos desafiados de modo sustentado

Camundongos C3H/HePAS, machos e fêmeas, crônicos foram desafiados por quatro vezes, e sacrificados 55 e 68 dias após o último desafio respectivamente para terem o nível de parasitismo sangüíneo avaliado através de culturas em meio LIT. Foram coletados 15µl de sangue por animal e distribuídos em 3 poços (5µl por poço contendo 1ml de LIT).

Figura 35: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado. No dia 55 pós-desafio, os animais machos foram sacrificados e 3 alíquotas de sangue de cada animal foram cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitas nas semanas subsequentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Crônico controle (■) e crônico desafiado (■)

Os camundongos machos crônicos, 55 dias após serem desafiados pela última vez, apresentam porcentagens superiores de culturas positivas (% de animais com culturas LIT positivas e % de culturas LIT positivas por grupo) do que os camundongos crônicos controles (Figura 35). Com resultado semelhante, as fêmeas do grupo crônico desafiado revelam uma quantidade maior de parasito no sangue do que as fêmeas do grupo crônico controle (Figura 36).

De forma inesperada, estes resultados não concordam com os realizados na experiência anterior de desafio sustentado em que os animais eram sacrificados 35 dias (machos) e 45 dias (fêmeas) após o último desafio.

Fêmeas

Figura 36: Análise de parasitismo subpatente no sangue de camundongos crônicos após desafio sustentado. No dia 68 pós-desafio, os animais fêmeas foram sacrificados e 3 alíquotas de sangue de cada animal foram cultivadas em meio LIT, verificando-se a presença de parasitos nas culturas nas semanas subseqüentes. Os resultados foram expressos em função da frequência de animais que deram culturas positivas, assim como pela frequência de culturas positivas por grupo. Grupo crônico controle (■) e crônico desafiado (■).

4.3.6 A patologia cardíaca não é reduzida em animais crônicos após desafio sustentado

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos no experimento de desafio sustentado anterior em que animais crônicos desafiados reduziam moderadamente os níveis de patologia, optamos novamente por realizar a análise histopatológica de animais machos e fêmeas, crônicos e crônicos desafiados. Os camundongos machos foram sacrificados 55 dias após o último desafio, enquanto as fêmeas após 68 dias. A patologia foi avaliada estimando de maneira qualitativa a presença de infiltrados inflamatórios no coração (0; nenhuma; 1: leve; 2: moderada; 3: média; 4: intensa e 5: severa).

Machos

Figura 37: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda) e do número de ninhos no coração (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos. Camundongos machos crônicos controles e crônicos desafiados por quatro vezes foram sacrificados 55 dias após o desafio e avaliados de maneira qualitativa em relação à intensidade da patologia no coração pela presença de infiltrados celulares e número de ninhos. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□). O asterisco indica resultado estatisticamente diferente: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Em relação à patologia, os resultados obtidos com os camundongos machos desafiados não confirmam os resultados do experimento de desafio sustentado anterior, no qual era observada uma sutil regressão da patologia. Assim, de forma contrária, nesta segunda experiência o desafio exacerba significativamente a patologia na aurícula e pericárdio. Contudo, de maneira global as patologias de ambos os grupos não diferem estatisticamente. Na avaliação da presença de ninhos no tecido cardíaco, o número de ninhos observados nas lâminas dos camundongos desafiados, surpreendentemente é superior à dos camundongos crônicos, apesar das diferenças não serem significativas (Figura 37).

Fêmeas

Figura 38: Avaliação da patologia cardíaca (esquerda) e do número de ninhos no coração (direita) após desafio sustentado dos camundongos crônicos. Camundongos fêmeas crônicos controles e crônicos desafiados por quatro vezes foram sacrificados 68 dias após o desafio e avaliados de maneira qualitativa em relação à intensidade da patologia no coração pela presença de infiltrados celulares e número de ninhos. Crônico controle (■) e crônico desafiado (□).

Nas fêmeas, o desafio exerceu leves mudanças. Apesar das fêmeas exibirem uma tendência para o aumento nos níveis de pericardite, miocardite e

endocardite, assim como na avaliação global, as diferenças não se tornam significantes (Figura 38). Quanto à presença de ninhos no tecido cardíaco das fêmeas, não há grande diferença. Desconsiderando algumas exceções, mais precisamente uma das fêmeas crônicas e duas do grupo desafiado, a maior parte dos animais de ambos os grupos apresentam poucos ou nenhum ninho (Figura 38).

Estes resultados indicam que apesar do aumento da resposta imune específica dos animais crônicos, o desafio sustentado não se mostra eficiente para diminuir a carga parasitária sistêmica e promover uma redução da patologia dos animais crônicos em um tempo mais tardio.

5 DISCUSSÃO

Seguindo o caminho inicialmente trilhado por Marinho *et al.*, que estudaram o desafio de camundongos da linhagem A/J crônicos com *T. cruzi* da cepa Y [25], temos avaliado o efeito do desafio com parasita homólogo no modelo

de infecção de camundongos C3H/HePAs cronicamente infectados por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4.

No modelo com camundongos A/J, Marinho *et al.* observaram elevação dos níveis séricos de anticorpos, do número de linfócitos esplênicos CD4⁺ e CD8⁺, da produção de IFN γ e, mais ainda, redução da parasitemia sistêmica, contribuindo para idéia de que no animal crônico a resposta do sistema imune ao parasito não se encontra otimizada. Uma vez que o modelo A/J-Y não apresenta patologia cardíaca, prosseguimos por esta mesma linha de pesquisa, agora utilizando uma diferente cepa do parasito e linhagem de camundongo. Para os experimentos realizados neste projeto, optamos pela infecção crônica de camundongos C3H/HePAS com a cepa Sylvio X10/4 do *T. cruzi*. Neste modelo, os animais não apresentam parasitemia sistêmica, embora o parasito possa ser detectado no sangue em baixas quantidades através de hemocultura, mas sofrem patologia crônica cardíaca que parece depender da presença local do parasito, se assemelhando em boa parte à doença crônica observada em pacientes infectados pelo *T. cruzi*. Adotamos como hipótese de trabalho aquela que presume que a patologia chagásica resulta da reatividade aos parasitas remanescentes no coração. Neste contexto, considerando que um aumento da atividade efetora específica frente ao parasita poderia reduzir ou até eliminar os parasitas presentes no tecido cardíaco, cogitamos que numa primeira etapa se observariam infiltrados celulares mais intensos nos animais desafiados em comparação aos crônicos, porém, em longo prazo, com a redução do número de *T. cruzi* no coração, ocorreria progressivamente uma diminuição da patologia.

Visando aumentar a resposta imune específica, numa primeira experiência desafiámos camundongos fêmeas cronicamente infectados pelo *T. cruzi* com uma única dose de 5×10^6 parasitas homólogos vivos. O desafio único dos camundongos crônicos mostrou que a resposta imune pode ser aumentada no modelo C3H/HePAS / Sylvio X10/4. A modulação positiva da resposta imune foi evidenciada no grupo desafiado pelo aumento no número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no baço e aumento da frequência das mesmas subpopulações no baço e sangue. Nos animais desafiados ambas as populações de linfócitos T mostraram capacidade aumentada de produzir IFN γ , importante citocina no controle da infecção pelo *T. cruzi* [64, 65], como de outros parasitos intracelulares [66, 67]. O aumento da produção de IFN γ mostrou-se evidente apenas aos 10 dias pós-desafio, mas não no dia 60, o que nos levou a crer que talvez fosse necessário um estímulo sustentado

para prolongar a potenciação da resposta específica. Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que os níveis séricos de anticorpos dos animais crônicos são suficientes para a remoção de altas doses do tripomastigotas quando inoculados na veia. Os parasitas inoculados no animal crônico são possivelmente recobertos por anticorpos, o que facilita sua remoção do sangue no pulmão, fígado e baço. Com este panorama, pode-se afirmar que a apresentação do antígeno esteja ocorrendo via MHC classe II para as células T CD4⁺. Entretanto, nossos resultados mostrando o aumento da população de CD8⁺ corroboram com a possibilidade das APCs estarem também apresentando o antígeno do parasito via MHC de classe I, a chamada apresentação cruzada. Alternativamente, o aumento das células CD8⁺ poderia estar acontecendo em resposta às citocinas (como IL-15) liberadas por outras populações celulares.

No dia 10 do desafio único, a expansão clonal, o aumento de células efectoras/memória produtoras de IFN γ e o aumento das IgG1 e IgG2a parasito-específicas não foram suficientes para aumentar a remoção / eliminação de parasitos do sangue e tecido cardíaco, e a patologia cardíaca (e muscular) se manteve semelhante à dos animais crônicos. Contudo, a ausência de uma redução da parasitemia subpatente foi um resultado surpreendente, pois difere daquele observado por Marinho *et al.* no modelo de camundongos A/J infectados por parasitas da cepa Y. Os resultados obtidos após desafio único no modelo C3H/HePAS/Sylvio X10/4 sugere que os parasitas que persistem no sangue dos animais crônicos desafiados são relativamente resistentes ao aumento no nível de anticorpos. Por outro lado, o pequeno aumento da hepatite observado nos animais desafiados pode ser facilmente explicado em função do fígado ser um dos locais de remoção dos parasitos opsonizados por anticorpos [30].

A falha na tentativa de reduzir a patologia cardíaca desafiando camundongos crônicos com uma única dose do parasita, junto ao fato dos parâmetros citados acima retornarem aos níveis basais do animal crônico aos 60 dias do desafio único, nos levou a cogitar a necessidade de testarmos um protocolo de desafio sustentado na tentativa de reduzir ou controlar a patologia. Este consistiu em aplicar quatro doses do parasito homólogo vivo (as 2 primeiras i.v. e as 2 últimas i.p.). A hipótese por trás desta nova proposta, é que neste modelo, a eliminação do parasito no coração poderia ocorrer principalmente quando uma célula infectada (ninho) se rompe. Levando em conta a possibilidade de isso acontecer em

momentos incertos (transitórios ou em períodos longos), surgiu o desafio sustentado como estratégia para manter a resposta imune otimizada por um longo tempo, o que poderia gradualmente forçar uma diminuição do ciclo do *T. cruzi* no coração e no hospedeiro vertebrado como um todo.

O primeiro experimento de desafio sustentado (experimento de desafio sustentado I), realizada em camundongos machos e fêmeas, 35 e 45 dias após o último desafio respectivamente, mostrou que no baço dos animais desafiados o aumento dos linfócitos CD4⁺ perdura por mais tempo do que o das CD8⁺. A capacidade efetora destas duas subpopulações foi mensurada quanto à produção do IFN γ . As análises de FACS mostraram que as células T CD4⁺ são mais eficientes em produzir esta citocina no baço, enquanto que no sangue são as células T CD8⁺. Por outro lado, os ensaios de proliferação realizados nos camundongos machos do desafio sustentado I mostraram que após o desafio sustentado há aumento da capacidade proliferativa das células CD4⁺ esplênicas frente ao estímulo específico. Resultado idêntico foi obtido na experiência do desafio sustentado II, confirmando que o desafio sustentado leva a um aumento das células CD4⁺ de memória. Entretanto, o fato de não termos achado aumento da proliferação antígeno-específica das células CD8⁺ após 96 horas de cultura não pode ser tomado como prova do desafio sustentado ativar mais intensamente o compartimento CD4⁺ do que o compartimento CD8⁺. Isto não pode ser concluído pelo fato do nosso ensaio de proliferação, que utiliza antígeno de *T. cruzi* solúvel, privilegiar a apresentação antigênica para as células CD4⁺.

Além do aumento da capacidade efetora/memória das células CD4⁺, em ambos experimentos sustentados, I e II, o desafio sustentado promoveu um aumento do nível sérico de anticorpos anti-*T. cruzi*. Porém, enquanto que o aumento de IgG1 anti-*T. cruzi* foi observado nos machos e fêmeas desafiadas de ambas as experiências, o aumento de IgG2a (que presume uma estimulação tipo TH1) foi somente observado para os machos do desafio sustentado I.

Considerando a necessidade de uma avaliação funcional detalhada dos efeitos do tratamento sustentado realizamos no desafio sustentado II uma análise das citocinas produzidas após estimulação antígeno-específica dos esplenócitos dos animais crônicos e crônicos desafiados. Na experiência realizada, a análise dos sobrenadantes dos animais crônicos desafiados revelou aumento da produção de citocinas, tanto do perfil TH1, como do perfil TH2. Desta forma, os animais

desafiados mostraram produção aumentada, não somente de IFN γ , mas de IL-4, IL-10 e de IL-5. Além disso, um aumento da produção espontânea de óxido nítrico foi também revelado. Contudo, com exceção do aumento da IL-5 e IL-10, observado tanto nos machos como nas fêmeas, o aumento dos outros mediadores foi somente detectado nas fêmeas.

Prosseguindo com nosso estudo dos efeitos do desafio sustentado avaliamos a sua influência sobre a carga parasitária sistêmica e a patologia dos animais crônicos, objetivo central do presente projeto. Nos animais crônicos desafiados observamos mudanças discretas nestes parâmetros. Entretanto, e para nosso desapontamento, nas duas experiências realizadas o desafio sustentado induziu efeitos contrários nestes dois parâmetros. Desta forma, no desafio sustentado I, a inoculação reiterada de altas doses do parasita vivo levou a uma redução da parasitemia subpatente no sangue dos camundongos crônicos machos e fêmeas. Mais ainda, uma redução moderada e significativa da infiltração linfocitária cardíaca foi também observada neste experimento. Desta forma, os resultados os resultados do experimento de desafio sustentado I apresentam concordância com os estudos apresentados recentemente por Sanchez-Burgos *et al.* [61] onde a vacinação terapêutica com plasmídeos que codificam as proteínas Tc24 and TSA-1 de *T. cruzi* induz uma redução significativa da parasitemia, mortalidade, miocardite e carga parasitária no coração. Na tentativa de confirmar os nossos resultados, repetimos o desafio sustentado e verificamos novamente a parasitemia e a patologia cardíaca. Entretanto, os resultados da experiência do desafio sustentado II não confirmaram os resultados obtidos na primeira experiência. Assim, nos camundongos machos e fêmeas, sacrificados 55 e 68 dias após o último de quatro desafios, mostraram (em relação aos animais crônicos não desafiados) um discreto aumento do parasita no sangue e um pequeno agravamento da patologia.

A discrepância observada nos resultados de carga parasitaria/patologia cardíaca das duas experiências pode ser encarada de formas diferentes. Numa primeira interpretação, a discrepância pode estar indicando que a inoculação reiterada de tripomastigotas exerce um efeito muito discreto sobre a carga parasitária e a patologia cardíaca, a diferença entre as experiências expressando variabilidade experimental de pouca importância. Alternativamente, a discrepância entre os resultados dos experimentos de desafio prolongado I e II, pode indicar que

a carga parasitária e a patologia podem ser moduladas pelo desafio sustentado, mas que a modulação pode acontecer nos dois sentidos, de melhora ou de agravamento. Nesta visão, os desafios sustentados I e II seriam a expressão de modulações incipientes (ou discretas) nas duas direções, sendo extremamente importante esclarecer quais as condições que levam às diferentes modulações.

Na óptica da primeira interpretação devemos nos perguntar porque o desafio sustentado não consegue reduzir a carga parasitária local e a patologia do animal crônico. Dentre as possíveis respostas para esta pergunta, pode-se cogitar: a) que a inoculação com tripomastigotas (via i.v ou i.p) não é estímulo suficiente para potenciar os mecanismos efetores necessários para a destruição dos parasitas no tecido cardíaco. Neste contexto, desconhecemos se nas nossas experiências houve indução de células CD8⁺ citotóxicas, supostamente envolvidas na destruição de cardiomiócitos infectados; b) que o aumento sistêmico da atividade efetora frente ao *T. cruzi* não se acompanha forçosamente de um aumento da migração celular ao tecido cardíaco infectado, processo que depende exclusivamente de sinalização local; c) Além disso, a indução de mecanismos de regulação poderia estar contrabalançando o aumento da resposta imune nos animais desafiados contribuindo à discreta/nula eficiência do desafio sustentado na redução da patologia. Neste contexto, Fernando D. Pretel do nosso laboratório utilizando esplenócitos dos animais do experimento desafio sustentado I mostrou que nos animais crônicos desafiados o número de linfócitos T_{reg} CD25⁺FoxP3⁺ é maior do que no baço dos camundongos crônicos.

Já na óptica da segunda interpretação, seria importante determinar o porque do diferente comportamento dos experimentos dos desafios sustentados I e II. Neste sentido e apesar do nosso estudo ser incompleto, pode se cogitar que a resposta imune induzida pelo desafio sustentado foi qualitativamente diferente nas duas experiências. Desta forma, a resposta imune anti-*T. cruzi* poderia ter se aprofundado para TH1 no desafio sustentado I e para um perfil misto TH1/TH2 no desafio sustentado II, modulando diferentemente o padrão de citocinas e imunoglobulinas secretadas. Dados em modelos murinos mostram que citocinas inflamatórias tem um papel central no controle da infecção pelo *T. cruzi* [68]. Assim, as citocinas inflamatórias IL-12, IFN γ e TNF α estão associadas com a resistência à infecção [69]. Já as citocinas do padrão Th2 conduziriam para um aumento de suscetibilidade na infecção, como mostrado por Abrahamson et al (1996), com

ensaios de transferências de células Th2 *T.cruzi*-específicas em que os animais não conseguem controlar os níveis de parasitemia [70]. A título ilustrativo da existência de diferenças qualitativas na resposta imune nas duas experiências, a indução de IFN γ e de IgG2a (isótipo de imunoglobulina que corresponde ao padrão TH1) foram mais expressivos no desafio sustentado I, que no desafio sustentado II, sendo que desta última experiência os machos crônicos desafiados secretaram níveis de IFN γ equivalentes aos dos machos crônicos. A possibilidade de ter se estabelecido na experiência do desafio sustentado II um padrão de citocinas mais próximo do perfil TH2 pode ser também cogitado pelo aumento de IL-5, e IL-4. No entanto, esta possibilidade carece de validade uma vez que as citocinas TH2 não foram avaliadas na experiência 2. Já em relação ao aumento da produção de IL-10, observado nos animais tratados do desafio sustentado II, o cenário é ainda mais complexo, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que células efectoras Tbet⁺ (Th1) também são fontes da produção de IL-10 em infecções por *Toxoplasma gondii* [71] e *Leishmania major* [72]. Isto poderia conferir as células TH1 o autocontrole da regulação [73], como forma de minimizar o dano tecidual ao passo que restringe a habilidade de eliminar totalmente o parasita.

Em um contexto geral, podemos dizer que a patologia cardíaca nos animais com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* não foi reduzida mediante um aumento da resposta imune frente ao parasito induzido pelo desafio sustentado com parasito homólogo vivo. Experiências adicionais tornam-se necessárias para esclarecer se o controle do *T. cruzi* no coração pode ser promovido por uma manipulação da resposta imune. Acreditamos que deva ser apoiado o desenvolvimento de vacinas terapêuticas que considerem a otimização da resposta imune quanto à geração de linfócitos de memória CD8⁺ e CD4⁺ e o aumento da produção de IFN γ , deva ser apoiada. Contudo, para que esses elementos contribuam nos mecanismos de eliminação do parasito e uma conseqüente redução patologia, os mecanismos de regulação e tolerância na doença de Chagas precisam ser mais estudados.

6 CONCLUSÕES

6.1 Desafio Único

Nossos estudos mostram que o desafio único com parasita homólogo de camundongos C3H/HePAS crônicos infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 causa um aumento passageiro da resposta imune:

No décimo dia do desafio, as populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ encontram-se aumentadas no baço e sangue dos camundongos desafiados. No entanto, o aumento da resposta não é mais perceptível no dia 60 após desafio.

Os animais desafiados têm aumento da resposta humoral parasita-específica após 10 dias do desafio com a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. No entanto, no dia 60 pós-desafio as diferenças entre os grupos não são mais significativas.

O aumento da resposta imune induzido pelo desafio único não reduz a carga parasitária sistêmica nos camundongos crônicos desafiados, embora aos 60 dias a carga parasitária cardíaca esteja diminuída nestes animais.

Os camundongos crônicos desafiados com uma única dose de *T. cruzi* não apresentam diferenças na patologia cardíaca quando comparados aos animais crônicos.

6.2 Desafio Sustentado I e II

O desafio sustentado de camundongos machos e fêmeas crônicos resulta em um aumento da resposta imune:

No experimento de desafio sustentado I, os camundongos crônicos machos e fêmeas desafiados apresentam aumento no número de linfócitos

esplênicos CD4⁺ produtores de IFN γ , enquanto que os linfócitos esplênicos CD8⁺ IFN γ ⁺ mostram uma tendência para o aumento.

Em ambos os experimentos realizados, o desafio sustentado de camundongos crônicos machos e fêmeas causa um aumento da proliferação dos linfócitos CD4⁺ em resposta ao antígeno de *T.cruzi*.

Nos animais desafiados machos e fêmeas a produção de anticorpos IgG1 também se mostra aumentada nos dois experimentos de desafio sustentado.

No experimento de desafio sustentado II observamos que nos camundongos machos desafiados há aumento da produção de citocinas de perfil TH2, como IL-5 e IL-10, enquanto que nos camundongos fêmeas desafiados, o aumento ocorre tanto para as citocinas de perfil TH2, IL-4, IL-5 e IL10, como para as de perfil TH1, como IFN γ , TNF α e IL-2.

Neste mesmo experimento, as fêmeas desafiadas aumentam a produção de óxido nítrico (NO) de maneira espontânea e após estimulação com antígeno de *T. cruzi*.

No desafio sustentado I, o tratamento sustentado de camundongos crônicos machos e fêmeas com parasito homólogo resulta na redução dos níveis da carga parasitária do sangue, embora no experimento de desafio sustentado II os animais tratados apresentarem níveis mais altos do parasita.

Finalmente, nos dois experimentos realizados, o desafio sustentado de camundongos crônicos machos e fêmeas causou mudanças na patologia cardíaca de signo diferente. Assim, enquanto que nos animais tratados do desafio sustentado I há uma discreta redução da patologia, no desafio sustentado II, os animais machos desafiados aumentam a patologia cardíaca enquanto as fêmeas desafiadas não mostram alterações significativas neste parâmetro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organizations TDR *Technical Report Series Control of Chagas Disease*. W.H.O Publications, Geneva, 2005.
Disponível em: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/ [2008 Oct 01].
2. Punukollu G., et al., *Clinical aspects of the Chagas' heart disease*. Int J Cardiol., 2007. 115(3): p. 279-83.
3. Prata A., *Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease*. Lancet Infect Dis., 2001. 1(2): p. 92-100.
4. Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, *Parasitologia Humana*. Ed. Atheneu, 1995.
5. Brener Z, Andrade ZA, *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987: p. 6-10.
6. Guhl F, et al., *Molecular characterization and diagnosis of trypanosoma cruzi and T. rangeli*. Arch Med Res., 2002. 33(4): p. 362-70.
7. Engman DM, JS Leon, *Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity*. Acta Trop., 2002. 81(2): p. 123-32.
8. Marin-Neto JA, et al., *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease*. Circulation., 2007. 115(9): p. 1109-23.
9. Ribeiro dos S, L Hudson, *Denervation and the immune response in mice infected with Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol., 1981. 44(2): p. 349-54.
10. Ribeiro dos Santos R, et al., *Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease*. Tropenmed Parasitol., 1979. 30(1): p. 19-23.
11. Kalil J, E Cunha-Neto, *Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last?* Parasitol Today., 1996. 12(10): p. 396-9.
12. Leon JS, et al., *Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease*. Infect Immun., 2001. 69(9): p. 5643-9.
13. Cunha-Neto E, et al., *Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry*. Autoimmunity., 2006. 39(1): p. 41-54.
14. Cunha-Neto E, et al., *Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1995. 92(8): p. 3541-5.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 09]

15. Abel LC, J Kalil, E Cunha-Neto, *Molecular mimicry between cardiac myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin*. Braz J Med Biol Res., 1997. 30(11): p. 1305-8.
16. Iwai LK, et al., *T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between Trypanosoma cruzi B13 and cardiac myosin heavy chain*. J Autoimmun., 2005. 24(2): p. 111-7.
17. Hyland KV, et al., *Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease*. Infect Immun., 2007. 75(7): p. 3641-50. Epub 2007 May 7.
18. Zhang L, RL Tarleton, *Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease*. J Infect Dis., 1999. 180(2): p. 480-6.
19. Tarleton RL, *Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease*. Int J Parasitol., 2001. 31(5-6): p. 550-4.
20. Palomino SA, VD Aiello, ML Higuchi, *Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens*. Ann Trop Med Parasitol., 2000. 94(6): p. 571-9.
21. Vago AR, et al., *PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease*. Lancet., 1996. 348(9031): p. 891-2.
22. Anez N, et al., *Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients*. Am J Trop Med Hyg., 1999. 60(5): p. 726-32.
23. Marinho CR, 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., 2004. 72(4): p. 2350-7.
24. Marinho CR, et al., *Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease*. Infect Immun., 1999. 67(1): p. 308-18.
25. Marinho CR, et al., *Challenge of Trypanosoma cruzi chronically infected mice with trypomastigotes activates the immune system and reduces subpatent parasitemia levels*. J Parasitol., 2004. 90(3): p. 516-23.
26. Earlam RJ, *Gastrointestinal aspects of Chagas' disease*. Am J Dig Dis., 1972. 17(6): p. 559-71.
27. Campos JV, WL Tafuri, *Chagas enteropathy*. Gut., 1973. 14(11): p. 910-9.
28. Golden JM, RL Tarleton, *Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity*. Exp Parasitol., 1991. 72(4): p. 391-402.

29. Abrahamsohn IA, RL Coffman, *Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol., 1995. 155(8): p. 3955-63.
30. Sardinha LR, et al., *Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against Trypanosoma cruzi*. Infect Immun., 2006. 74(4): p. 2031-42.
31. Munoz-Fernandez MA, MA Fernandez, M Fresno, *Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism*. Immunol Lett., 1992. 33(1): p. 35-40.
32. Silva JS, DR Twardzik, SG. Reed, *Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta)*. J Exp Med., 1991. 174(3): p. 539-45.
33. Silva JS, et al., *Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection*. J Exp Med., 1992. 175(1): p. 169-74.
34. Abrahamsohn IA, *Cytokines in innate and acquired immunity to Trypanosoma cruzi infection*. Braz J Med Biol Res., 1998. 31(1): p. 117-21.
35. Kumar S., RL. Tarleton, *Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol., 2001. 166(7): p. 4596-603.
36. Kumar S. and RL. Tarleton, *The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol., 1998. 20(5): p. 207-16.
37. Spinella S, P Liegeard, M Hontebeyrie-Joskowicz, *Trypanosoma cruzi: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease*. Exp Parasitol., 1992. 74(1): p. 46-56.
38. Minoprio PM, et al., *Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses*. Scand J Immunol., 1986. 24(6): p. 661-8.
39. Alcantara A, Z Brener, *The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages*. Acta Trop., 1978. 35(3): p. 209-19.
40. Tambourgi DV, TL Kipnis, W Dias da Silva, *Trypanosoma cruzi: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells*. Exp Parasitol., 1989. 68(2): p. 192-201.
41. Rottenberg ME, et al., *Outcome of infection with different strains of Trypanosoma cruzi in mice lacking CD4 and/or CD8*. Immunol Lett., 1995. 45(1-2): p. 53-60.

42. Berah M, J Hors, J Dausset, *A study of HL-A antigens in human organs. Transplantation.*, 1970. 9(3): p. 185-92.
43. Zhang L, RL Tarleton, *Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production.* Eur J Immunol., 1996. 26(1): p. 102-9.
44. Janeway CA, TP, Walport M, Shlomchik M J, *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença.* Artmed, 2006(6 Ed.).
45. Grisotto MG, et al., *Most parasite-specific CD8+ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha-beta and CD8 molecules.* Immunology., 2001. 102(2): p. 209-17.
46. Martin DL, RL Tarleton, *Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent Trypanosoma cruzi infection.* J Immunol., 2005. 174(3): p. 1594-601.
47. Valenzuela J, C Schmidt, M Mescher, *The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells.* J Immunol., 2002. 169(12): p. 6842-9.
48. Curtsinger JM, et al., *Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation.* J Immunol., 2005. 174(8): p. 4465-9.
49. Kolumam GA, et al., *Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection.* J Exp Med., 2005. 202(5): p. 637-50. Epub 2005 Aug 29.
50. van Stipdonk, MJ, et al., *Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses.* Nat Immunol., 2003. 4(4): p. 361-5. Epub 2003 Mar 17.
51. Sun JC, MA Williams, MJ Bevan, *CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection.* Nat Immunol., 2004. 5(9): p. 927-33. Epub 2004 Aug 8.
52. Shaulov A, K Murali-Krishna, *CD8 T cell expansion and memory differentiation are facilitated by simultaneous and sustained exposure to antigenic and inflammatory milieu.* J Immunol., 2008. 180(2): p. 1131-8.
53. Wize B, M Nunes, RL Tarleton, *Identification of Trypanosoma cruzi trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses.* J Immunol., 1997. 159(12): p. 6120-30.
54. Wize B, et al., *Human infection with Trypanosoma cruzi induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses.* J Clin Invest., 1998. 102(5): p. 1062-71.

55. Leavey JK, RL Tarleton, *Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol., 2003. 170(5): p. 2264-8.
56. Martin DL, et al., *TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental Trypanosoma cruzi infection*. Eur J Immunol., 2007. 37(10): p. 2764-71.
57. Villar JC, et al., *Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection*. Cochrane Database Syst Rev., 2002(1): p. CD003463.
58. Mendez GF, MR Cowie, *The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature*. Int J Cardiol., 2001. 80(2-3): p. 213-9.
59. Rosa DS, et al., *Role of interferon-gamma during CpG oligodeoxynucleotide-adjuvanted immunization with recombinant proteins*. Vaccine., 2007. 25(32): p. 6007-17. Epub 2007 Jun 6.
60. Hoft DF, et al., *Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming*. J Immunol., 2007. 179(10): p. 6889-900.
61. Sanchez-Burgos G, et al., *Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against Trypanosoma cruzi in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol., 2007. 50(3): p. 333-41. Epub 2007 May 23.
62. Araujo AF, et al., *CD8+-T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2*. Infect Immun., 2005. 73(9): p. 6017-25.
63. Machado AV, et al., *Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase*. Hum Gene Ther., 2006. 17(9): p. 898-908.
64. Torrico F, et al., *Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol., 1991. 146(10): p. 3626-32.
65. Tarleton RL, MJ Grusby, L. Zhang, *Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with Trypanosoma cruzi*. J Immunol., 2000. 165(3): p. 1520-5.
66. Louis J, et al., *Regulation of protective immunity against Leishmania major in mice*. Curr Opin Immunol., 1998. 10(4): p. 459-64.
67. Denkers EY, RT Gazzinelli, *Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection*. Clin Microbiol Rev., 1998. 11(4): p. 569-88.

68. Teixeira MM, RT Gazzinelli, JS Silva, *Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection*. Trends Parasitol., 2002. 18(6): p. 262-5.
69. Aliberti JC, et al., *Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection*. Am J Pathol., 2001. 158(4): p. 1433-40.
70. Barbosa de Oliveira LC, et al., *Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to Trypanosoma cruzi infection*. Cell Immunol., 1996. 170(1): p. 41-53.
71. Jankovic D, et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp Med., 2007. 204(2): p. 273-83. Epub 2007 Feb 5.
72. Anderson CF, et al., *CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis*. J Exp Med., 2007. 204(2): p. 285-97. Epub 2007 Feb 5.
73. Trinchieri G, *Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control*. J Exp Med., 2007. 204(2): p. 239-43. Epub 2007 Feb 12.