

Rogério Silva do Nascimento

A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4:
A resposta humoral ao parasita na ausência do receptor CD28.

Trabalho de Dissertação apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2021

Rogério Silva do Nascimento

A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4:
A resposta humoral ao parasita na ausência do receptor CD28.

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Período de Abril de 2018 a Abril de 2021.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig.
Laboratório de imunologia das Doenças infecciosas.

Versão Original

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

do Nascimento, Rogerio Silva

A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi Sylvio X10/4 : A resposta humoral ao parasita na ausência do receptor CD28. / Rogerio Silva do Nascimento; orientador Prof. Dr. Jose Maria Álvarez Mosig. -- São Paulo, 2021.

95 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Chagas.. 2. Resposta Imune.. 3. Trypanosoma cruzi Sylvio X10/4.. 4. Molecula CD28.. 5. Resposta Humoral.. I. Mosig, Prof. Dr. Jose Maria Álvarez , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

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

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

- Departamento: *Imunologia*

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

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

CERTIFICATE

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

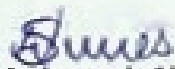
- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Maria Álvarez Mosig**


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

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

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	CD28KO	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	140
	CS7BL/6	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	1000
	A/J	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	100
	MerCreMer	Macho/Male	6-8 semanas/weeks	40
	MyD88KO	Macho/Male	6-8 semanas/weeks	20
	FoxP2GFP	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	60
	GTR-eGFP-FoxP3	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	280
	CS- <i>J</i> (background B6)	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	240
	B6J	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	40
	CD45.1	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	40
	CON/WPAS	Fêmea/Female	6-8 semanas/weeks	100

São Paulo, 17 de março de 2017.


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


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

Certificado do protocolo de uso de animais para experimentação.




Cidade Universitária - Armando de Sales Oliveira - Butantã - São Paulo - SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3091-7733 - e-mail: ceu@icb.usp.br

Decl. CEUA.034.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 002/2017/CEUA, datado de 07/03/2017, e por solicitação do Prof. Dr. **José Maria Alvarez Mosig**, do Departamento de Imunologia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Rogério Silva do Nascimento**, aprovado(a) no programa de Pós-graduação Imunologia, em nível de **mestrado**, ao Projeto de Pesquisa "*A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e no desenvolvimento da patologia cardíaca*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal.

São Paulo, 02 de abril de 2018.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig.

Dedico este trabalho a Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, por permitir eu estar em vida, com saúde e também permitir a presença de todas as pessoas que me rodeiam. Nos tempos atuais, na pandemia, saúde plena é muito valioso.

À minha família, onde tenho pessoas que me fortalecem, onde encontro motivos para seguir firme na minha caminhada. Minha esposa e companheira Ana Paula Silva de Queiroz, a quem amo muito e agradeço por me apoiar em tudo e por confiar em mim e por conceder a honra de ser a minha paixão. Aos meus filhos Roger Queiroz e João Pedro Queiroz que são a alegria da minha vida viver e neles encontro a motivação de que preciso e ainda dizer que por eles faria o possível e o impossível e sei que eles fariam o mesmo; Aos meus pais Raimundo Lopes e Azenália Silva que sempre me apoiam e são um exemplo de honra para minha vida; Aos meus irmãos queridos, Adriano, Arnaldo, Reinaldo, Reginaldo, Rosângela, Rosivaldo e ao meu sobrinho Wesley, a todos pela sua amizade e respeito;

Agradeço às amigas e companheiras Valeria Machado e Maria Eni Sacramento dos Santos, anjos que fazem a obra de Deus na Terra e que sempre acreditaram em meu potencial ao me sugerirem fazer uma pós graduação mesmo nos primeiros dias de amizade e me despertou a possibilidade de sonhar com esta realidade.

Ao meu orientador José Maria Álvarez Mosig (Pepe) por ter aberto todas as portas e confiado em meu potencial. Pelos ensinamentos, pela paciência neste guerreiro, mas essas sempre são características de um grande líder e verdadeiro mestre.

À professora, Maria Regina D'Império Lima pela grandes ajudas de conhecimento científico, todo apoio e dedicação, uma grande marca sua.

Aos professores da banca de qualificação, Niels Olsen Saraiva Câmara, Eliana Faquim de Melo Nascimento e Jacqueline de Fátima Jacysyn pela contribuição para a finalização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, Deborah Cantarini, Isabela Cunha, Maria Menezes, Caio Cezar Bonfim, Danny Santana, Eduardo Amaral, Henrique Borges, Igor Santiago, Joaquim Xavier, Paulo Henrique Lisboa e Mathueus Santos e também aos amigos da “velha guarda” Claudio Marinho, Luiz Sardinha, Karina Bastos, Rosa Maria, Marcos Grisotto, Daniella Bucci, Sheyla Castillo, Sandra Muxel e Claudia Zago por toda a troca de conhecimento, e a criação de um ambiente agradável de trabalho. Em especial, à Erika Salles, Paula Carolina e Gislane Almeida, que além de todo o apoio científico, foram, sem sombra de dúvida grandes referências para minha vida.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biológicas, Maria Áurea de Alvarenga, Meire Yoshie, Sanda Alexandre, Raquel Motta e Israel Lima, Jotelma, Amanda, João, Otacílio, Miltão, Delman, Rafael, Nilson, Damatta, Antônio, por todo o companheirismo e força durante o início desta caminhada, aumentando a cada dia essa amizade.

Ao apoio técnico de Maria Áurea, Paulo Bernardo e Silvana Silva e à toda equipe técnica do Bioterio de experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial à Sandra Alexandre e Dourival Mascarenhas por toda a assistência técnica prestada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Finalmente agradeço a todos os professores do Departamento de Imunologia que sempre de algum modo me deixaram mensagem de apoio ao que devo chamar de novos desafios. Professores Alexandre Barbutto, Gustavo Amarantes, Sonia Jancar, Lourdes Isaac, Denise Fonseca, Ana Paula Lepique, Alessandra Pontillo e ao Momtchillo Russo.

Gostaria, aqui e a todos o mencionados, demonstrar a minha gratidão em saber que tenho o carinho de vocês!

***“A sabedoria não vem do acerto,
mas do aprendizado
com os erros”.***

Monja Coen

Resumo

A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4: A resposta humoral ao parasita na ausência do receptor CD28. Nascimento R.S., 2021. 95f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A infecção murina pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, um parasita de baixa virulência, possibilita que camundongos CD28KO infectados sobrevivam por um longo período de tempo. Esta característica permite estudar o impacto da ausência de CD28 sobre vários aspectos da resposta dos linfócitos T e B. No presente trabalho, nosso principal objetivo foi verificar, em camundongos CD28KO e C57BL/6 (WT, utilizado como controle), infectados ou não pelo parasita, quais aspectos da resposta imune são preservados na ausência deste co-receptor. Comparados aos camundongos controle C57BL/6, os camundongos CD28KO se mostraram suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, resultando na morte dos animais no decorrer de um amplo período, que variou de algumas semanas a quase um ano. Os camundongos CD28KO exibiram taxas mais elevadas de parasitemia subpatente do que os camundongos C57BL/6, bem como infiltrados inflamatórios mais intensos e duradouros no coração (miocárdio e pericárdio).

Acompanhando os camundongos CD28KO em diferentes momentos da infecção, encontramos uma expansão inicial do compartimento linfocitário seguida de sua contração com o início da fase crônica, não destacando nenhuma diferença significativa na frequência e número total de linfócitos T e B no baço, se comparadas à dos camundongos C57BL/6 infectados. Além disso, observamos que linfócitos TCD4 e TCD8 de camundongos CD28KO infectados produzem IFN-gamma. Por outro lado, apesar de observarmos uma diminuição da produção de IL-2 pelos linfócitos TCD4 e TCD8 de camundongos CD28KO infectados, é inegável que a produção desta citocina ocorre na ausência de CD28.

Diferentemente, no dia 16 da infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, a análise dos linfócitos T auxiliares foliculares, TFH (do inglês "Follicular Helper T cells"), mostrou que, ao contrário do observado no camundongo C57BL/6, não houve geração destas células nos camundongos CD28KO infectados. Em forma análoga, não observamos nestes animais a presença da população de células B de Centros Germinativos, GC-B (do inglês, "Germinal Center B cells").

A nível sérico, observamos que na fase aguda da infecção, além de anticorpos parasita-específicos da classe IgM, os camundongos CD28KO infectados produzem níveis discretos, embora significativos, de anticorpos IgG2c frente ao *T. cruzi*, semelhantes aos dos camundongos C57BL/6 neste momento da infecção. Porém, na fase crônica, enquanto o nível de IgG2c frente ao *T. cruzi* teve um grande aumento no soro do camundongo C57BL/6 infectado, no camundongo CD28KO infectado, o seu nível sérico permaneceu análogo àquele observado na fase aguda.

Os resultados do presente estudo levantam a possibilidade de que anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM, assim como aqueles da classe IgG (produzidos em pequenas quantidades nos camundongos CD28KO infectados devido à ausência dos elementos necessários para a mutação somática), poderiam ser suficientes para determinar o controle parcial das formas circulantes do parasita, permitindo a sobrevivência do camundongo CD28KO por muito tempo. Isto seria possível no caso de infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 por se tratar de um parasita que determina níveis subpatentes de parasitemia. No presente trabalho discutimos a possível origem desses anticorpos extrafoliculares, procurando desvendar o quadro denominado "ativação policlonal do sistema imunológico", presente em diversos processos infecciosos e ainda pouco esclarecido.

Palavras Chaves: *T. cruzi*, resposta imune, CD28, ativação policlonal.

Abstract

Murine infection by *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4: The humoral response to the parasite in the absence of the CD28 receptor.

Nascimento.R.S. 95f. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,2020.

The murine infection by *T. cruzi* Sylvio X10/4, a low virulence parasite, allows infected CD28KO mice to survive for a long period of time. This characteristic permits us to study the impact of the absence of CD28 on various aspects of the T and B lymphocyte response. In the present study, our main objective was to verify, in CD28KO and C57BL/6 (WT, used as control) mice, infected or not by the parasite, which aspects of the immune response are preserved in the absence of CD28.

Compared to control C57BL/6 mice, CD28KO mice were susceptible to infection by *T. cruzi* Sylvio X10/4, resulting in the animals' death over a wide period, which ranged from a few weeks to almost a year. CD28KO mice exhibited higher rates of subpatent parasitemia than C57BL/6 mice, as well as more intense and lasting inflammatory infiltrates in the heart (myocardium and pericardium).

Accompanying the CD28KO mice at different times of the infection, we found an initial expansion of the lymphocyte compartment followed by its contraction with the beginning of the chronic phase, not displaying significative differences in the frequency and the total number of T and B spleen lymphocytes, when compared to those in the infected C57BL/6 mice. In addition, we observed that both TCD4 and TCD8 lymphocytes from infected CD28KO mice produce IFN-gamma. Moreover, although we observed a decrease in IL-2 production by TCD4 and TCD8 lymphocytes from infected CD28KO mice, it is undeniable that the production of this cytokine occurs in the absence of CD28.

Differently, on day 16 of the infection by *T. cruzi* Sylvio X10/4, the analysis of follicular auxiliary T lymphocytes, TFH (from the English "Follicular Helper T cells") showed, that, unlike that observed in the infected C57BL/6 mouse, there was no formation of these cells in infected CD28KO mice. Similarly, we did not observe in these animals the presence of the Germinal Center B cell population, GC-B (from the English, "Germinal Center B cells").

At the serum level, we observed that in the acute phase of infection, in addition to parasite-specific antibodies of the IgM class, infected CD28KO mice produce discrete, although significant, levels of IgG2c antibodies to *T. cruzi*, similar to that of C57BL/6 mice at this time of infection. However, in the chronic phase, while the level of IgG2c against *T. cruzi* displayed a large increase in the serum of the infected C57BL/6 mouse, in the infected CD28KO mouse, its levels did not differ from that observed in the acute phase.

The results of the present study raise the possibility that anti-*T. cruzi* antibodies of the IgM class, as well as those of the IgG class (produced in small quantities in infected CD28KO mice due to the absence of the necessary elements for the somatic mutation), could be sufficient to determine the partial control of the circulating forms of the parasite, allowing the survival of the CD28KO mouse for a long time. This would be possible in the case of infection by *T. cruzi* Sylvio X10/4, as it is a parasite that determines subpatent levels of parasitemia. In the present work, we discussed the possible origin of these extra-follicular antibodies, seeking to unravel the picture called "polyclonal activation of the immune system", present in several infectious processes and still poorly clarified.

Keywords: *T. cruzi*, immune response, CD28.

Lista de Figuras.

Figura 1. Grafico de mortalidade cumulativa.	38
Figura 2. Análise da parasitemia subpatente.....	39
Figura 3. Cinetica de parasitemia subpatente. Analise dos dias 27 e 120 de infecção.	41
Figura 4. Cinética da parasitemia subpatente em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados pelo <i>T.cruzi</i> Sylvio X10/4.....	42
Figura 5. Analise histopatológica do tecido cardíaco.....	44
Figura 6. Análise da celularidade esplênica.	46
Figura 7. Análise de frequência de linfócitos TCD4, CD8 e B220.	48
Figura 8. Gráfico de número total de linfócitos TCD4, CD8 e B220.....	48
Figura 9. Frequência e número de blastos em linfócitos TCD4+ esplênicos.....	50
Figura 10. A Frequência e número de blastos em linfócitos TCD8+ esplênicos.	51
Figura 11. Frequência e número de blastos em linfócitos B220 esplênicos.....	52
Figura 12. Expressão de ICOS em linfócitos T CD4 esplênicos.	54
Figura 13. Produção de IL-2 por linfócitos T CD4.....	56
Figura 14. Produção de IL-2 por linfócitos T CD8.....	58
Figura 15. Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4..	60
Figura 16. Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8	62
Figura 17. Análise de células TFH em camundongos CD28KO	63
Figura 18. Análise da geração de células B de centros germinativos.	65
Figura 19. Reatividade sérica (revelada por ELISA) dos anticorpos da classe IgM.	67
Figura 20. Reatividade sérica (revelada por ELISA) dos anticorpos da classe IgG..	70
Figura 21. Níveis séricos de anticorpos IgM em diferentes tempos de infecção.	72
Figura 22. Níveis séricos de anticorpo IgG2c em diferentes tempos de infecção	74

Lista de siglas e abreviaturas.

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

APC: Célula apresentadora de antígeno.

CTLA-4: do inglês “Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4”.

CCC: Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

DC: Doença de Chagas.

USP: Universidade de São Paulo.

ICB/USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

UNIFESP: Escola Paulista de Medicina.

LLC-MK2: Linhagem celular mantida em cultura derivada do Rim do Macaco Rhesus.

RPMI: do inglês “Roswell Park Memorial Institute” – Meio de cultura celular.

L.I.T: do inglês “Liver infusion triptose”.

MHC: do inglês “Major Histocompatibility Complex” Complexo Maior de histocompatibilidade.

PBS: do inglês ‘Phosphate Buffer Saline’.

FACS: do inglês “Fluorescence-Activated Cell Sorting”.

BD: Becton Dickinson.

SBF: Soro Bovino Fetal.

ELISA: do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” - Ensaio imunossorvente ligado à enzima.

GCs-B cell: do inglês “Germinal Center B cell” - Células B do Centro Germinativo.

TFH-Cells: do inglês “Follicular Helper T Cells” - Células T Foliculares Auxiliares.

BSA: Albumina Sérica Bovina.

CCC: Cardiomiopatia chagásica crônica.

DAMPs: do inglês “Damage-associated molecular patterns” (padrões moleculares associados ao dano).

I.p.: via intraperitoneal.

Ig: imunoglobulina.

IL: interleucina.

INF- γ : do inglês, “interferon-gamma”.

LIT: do inglês “liver infusion tryptose”.

LLCMK2: do inglês “Rhesus Monkey Kidney Cell Line”.

NO: do inglês “nitric oxide” (óxido nítrico).

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PBS: do inglês “Phosphate Buffered Saline” (tampão fosfato salino).

p.i.: pós infecção.

PRR: do inglês “pattern recognition receptors” (receptores de reconhecimento de padrões).

SFB: Soro fetal bovino.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

TNF: fator de necrose tumoral.

WT: do inglês “wild type”.

TFH CELL : do inglês “T Follicular Helper” (Linfócitos T Foliculares Auxiliares).

GC B CELL: do inglês “Germinal Center B Cell” (Células B do Centro Germinativo).

Sumário

1. Introdução	19
1.1. A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2. A molécula CD28 e o sistema Imunológico	22
1.2.1. Os linfócitos TCD4+, TCD8+ e B (B220+) na resposta imunológica	24
1.3. A infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e a resposta imune	26
1.3.1. A ativação policlonal do sistema imune	28
1.3.2. A infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> ou outros parasitas, e a molécula CD28	29
2. Justificativa	30
3. Objetivos	31
4. Material e métodos	31
4.1. Modelo experimental	31
4.2. Manutenção da Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.3. Desenho Experimental/ Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	33
4.4. Avaliação da parasitemia patente	33
4.5. Avaliação da parasitemia subpatente: Análise microscópica da cultura em meio L.I.T (LIVER INFUSION TRIPTOSE)	33
4.6. Detecção de anticorpos por ELISA	34
4.7. Análise por Citometria de Fluxo	35
4.8. Análise histopatológica	36
4.9. Análise estatística	36
5. Resultados	37
5.1. Taxa de mortalidade	37
5.2. Parasitemia subpatente na fase crônica	38
5.3. Análise histopatológica	43
5.4. Análise da celularidade esplênica	45
5.5. Análise de células T e B esplênicas	47
5.6. Frequência e número de blastos das populações esplênicas de linfócitos T CD4, CD8 e B220	49
5.7. Análise Expressão de ICOS em linfócitos T CD4	53
5.8. Análise de produção de IL-2 por células esplênicas	55
5.9. Análise de produção de IFN- γ por linfócitos TCD4 e TCD8	59

5.10.	A infecção pelo <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 não induz a formação de linfócitos T auxiliares foliculares (TFH, do inglês “Follicular Helper T cells”) no baço do camundongo CD28KO.....	62
5.11.	A infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> Sylvio X10/4 no camundongo CD28KO não induz células B de centros germinativos (“GC-B cells”) esplênicas.....	64
5.12.	Análise de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> no soro.....	66
5.12.1.	A infecção por <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 estimula a ativação policlonal de anticorpos de classe IgM.....	66
5.12.2.	A infecção por <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 estimula a ativação policlonal para anticorpos da classe IgG.....	68
5.12.3.	A infecção por <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 em animais CD28KO exibe produção de anticorpos da classe IgM frente ao parasita no decorrer da infecção.....	70
5.12.4.	A infecção crônica por <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 nos animais CD28KO apresenta uma baixa produção de anticorpos parasita-específicos da subclasse IgG2c, que é entretanto superior, à observada nos camundongos CD28KO não infectados.....	73
6.	Discussão	76
7.	Conclusões	84
8.	Referências Bibliográficas	87

1. Introdução.

1.1. A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*.

A Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido por insetos hematófagos da família Reduviidae (DE SOUZA, 2002). Os reservatórios naturais do parasita se estendem a uma ampla variedade de marsupiais e mamíferos placentários autóctones do continente americano, com os quais o parasita tem co-evoluído por mais de dez milhões de anos (URBINA, 2010). Essa infecção foi descrita em humanos pela primeira vez há cento e onze anos por Carlos Ribeiro Justiniano da Chagas, médico, cientista, pesquisador e sanitarista brasileiro em Minas Gerais (CHAGAS, 1909). Estima-se que exista, atualmente, de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, a maioria na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO, 2010). Nas regiões endêmicas, a infecção humana ocorre como consequência da presença do vetor no ambiente peridomiciliar, elemento que frequentemente se associa à precariedade das moradias humanas em decorrência da condição de pobreza das populações rurais (URBINA, 2010). A transição do parasita entre insetos triatomíneos e mamíferos silvestres caracteriza o ciclo silvestre (enzoótico); enquanto que o ciclo peridoméstico ocorre entre animais domésticos de áreas típicas das habitações humanas e os triatomíneos peridomiciliares, ocorrendo, ocasionalmente, intercâmbios com o ciclo silvestre (COURA; DIAS, 2009). Neste contexto, o ciclo domiciliar é considerado de maior relevância epidemiológica, uma vez que este ciclo perpetua a doença no homem. O ciclo domiciliar é mantido por triatomíneos que se adaptaram ao domicílio humano, preferencialmente em casas de "pau-a-pique", as quais possuem paredes com frestas utilizadas pelos artrópodes como esconderijo, assim como em galinheiros, chiqueiros, estábulos e casas de madeira (COURA; DIAS, 2009). A considerar pelo hábito noturno, onde tanto os machos quanto as fêmeas e ninfas buscam o repasto sanguíneo nos animais domésticos e seres humanos (FREITAS, 2014).

A transmissão vetorial é de fato a principal forma de transmissão em humanos e ocorre através do depósito de fezes do inseto vetor, contaminadas (com formas infectantes de *T. cruzi* - tripomastigotas metacíclicas), no local de picada ou em mucosas. Isto ocorre

quando o indivíduo coça o local da picada provocando microfissuras que permite a entrada de parasitas pela pele direto na corrente sanguínea. (DIAS, 2000; STREIGER et al., 2004). Contudo, existem outras diversas formas de transmissão que ocorrem pela via oral, transfusão sanguínea ou transplacentária (COURA, 2007; TEIXEIRA et al., 2006; URBINA, 2010; WHO, 2016). Mecanismos de transmissão mais incomuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e aleitamento materno (URBINA, 2010; WHO, 2010).

A evolução natural da Doença de Chagas inclui uma fase aguda seguida de uma fase crônica (BERMUDEZ et al., 2016). A fase aguda, ou inicial, é assintomática na maioria dos casos. Apenas cerca de 5% dos indivíduos com a infecção aguda apresentam sintomas como febre, dores nas articulações e musculatura, cefaleia e outros sintomas que podem ser confundidos com resfriado (TEIXEIRA, 2007; RASSI Jr. et al., 2010). Os quadros sintomáticos ocorrem principalmente em recém-nascidos e crianças (PITTELLA, 2009; COURA JR, 2007). A fase aguda é caracterizada pela presença do parasita circulante na corrente sanguínea, geralmente em grandes quantidades, podendo ser facilmente detectado por exame direto do sangue fresco e indiretamente pela presença de anticorpos IgM (FREITAS, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Quando há desenvolvimento de sintomas, as principais manifestações clínicas são inespecíficas, tais como febre, reações alérgicas, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, ocorrendo miocardite e meningoencefalite nos casos mais graves (BERMUDEZ et al., 2016; FREITAS, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

O ciclo biológico começa quando um inseto triatomíneo infectado se alimenta do hospedeiro mamífero por sucção de sangue. Durante esta alimentação sanguínea, as formas tripomastigotas metacíclicas. (formas infectivas) são liberadas nas fezes do inseto penetrando no hospedeiro vertebrado através da lesão da picada. Após alcançarem a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas escapam do sistema imune invadindo vários tipos celulares (a exemplo dos fagócitos e outras células do sistema retículo endotelial, células musculares do coração, além de células nervosas do trato gastrointestinal). Após a invasão celular, os parasitas escapam dos vacúolos fagolisossomais; e no citoplasma se diferenciam em amastigotas, forma na qual proliferam por vários ciclos de fissão binária, podendo

tomar todo o citoplasma da célula hospedeira. Em seguida, as amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, os quais lisam a célula hospedeira e alcançam a corrente sanguínea, sendo agora denominados tripomastigotas sanguíneos ou circulantes. Os tripomastigotas sanguíneos invadem outros tecidos ou células, podendo eventualmente serem ingeridos junto com o sangue durante a sucção por um outro inseto vetor, contaminando este e fechando o ciclo de transmissão (CESTARI, 2006; SOUZA, 2007; URBINA, 2010).

Clinicamente, as formas relevantes do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado são as amastigotas e as tripomastigotas. As amastigotas são as formas intracelulares replicativas, responsáveis pela manutenção da doença. Já as formas tripomastigotas são responsáveis pela transmissão, disseminação do parasita para outras células do hospedeiro vertebrado e dano tecidual por rompimento das células hospedeiras (CESTARI, 2006; SOUZA, 2007; URBINA, 2010). Por outro lado, as epimastigotas são as formas replicativas encontradas apenas no tubo digestório do inseto vetor.

No contexto terapêutico, várias tentativas realizadas para encontrar um tratamento eficaz para a Doença de Chagas surgiram no fim da década de 1960. Dois fármacos são até hoje os únicos utilizados: Benzonidazol [N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)acetamida] da Roche - originalmente comercializado com o nome de Rochagan, e hoje fabricado pelo Laboratório Lafepe - e o Nifurtimox {(RS)-3-metil-N-[(1E)-(5-nitro-2-furil)metileno] tiomorfolina-4-amina 1,1-dioxido}, com nome comercial de Lampit, da Bayer (PINTO DIAS, 2006). No Brasil, apenas o primeiro tem autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para ser comercializado (CELESTE A.N. SILVEIRA, EDWIN CASTILLO e CLEUDSON CASTRO, 2000). Utilizados preferencialmente para o tratamento da fase aguda da doença de Chagas, os dois fármacos continuam sendo atualmente utilizados na fase crônica inicial da doença (BERMUDEZ et al., 2016; COURA, 2009; MAYA et al., 2007; URBINA, 2010; URBINA, 2015). Apesar de nenhum destes quimioterápicos atenderem aos preceitos para um fármaco eficiente, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde, ainda trata-se dos quimioterápicos mais indicados para o tratamento da doença. Vale ressaltar que nosso grupo de pesquisa possui como critério trabalhar com cepas

susceptíveis ao tratamento com o benzonidazol, tais como o clone Sylvio X10/4 e o nosso isolado da cepa Y.

Em humanos, o benzonidazol é usado por via oral, durante 60 dias, com 2 ou 3 doses diárias que variam de acordo com a idade e o peso do paciente. Este medicamento é geralmente efetivo na fase aguda, mas ineficaz na fase crônica da doença. No modelo murino, o quimioterápico é ministrado em dose única, macerado e dissolvido em água potável, e administrado por gavagem no pico de parasitemia, a sua efetividade acompanhada através da contagem dos parasitas em lâmina de sangue fresco (BRENNER, 1962). No presente trabalho, o tratamento com benzonidazol foi realizado exclusivamente nos experimentos de análise das células TFH (em inglês, T Follicular Helpers) e GC-B (do Inglês, Germinal Center B Cell) para evitar a morte dos camundongos infectados com alta dose de *T. cruzi* Sylvio ou Y, doses elevadas que se tornaram necessárias para induzir uma resposta expressiva (por citometria de fluxo) das populações celulares acima. Assim, nesses experimentos, não visamos a cura do animal, mas teve apenas o objetivo de induzir uma redução da carga parasitária que permitisse estender a sobrevivência do camundongo por mais alguns dias.

1.2. A molécula CD28 e o sistema Imunológico.

A ativação das células T virgens requer o reconhecimento pelo TCR do conjunto peptídeo-MHC na superfície de uma célula apresentadora de antígeno profissional (APC) (IEZZI e col., 1998). Além deste sinal antígeno-específico, a ativação requer a provisão simultânea pela APC de um sinal co-estimulador, presente na superfície daquelas APCs que foram ativadas no processo de internalização do antígeno (MUELLER et al., 1989; IEZZI et al., 1998). As moléculas co-estimuladoras são as glicoproteínas B7.1 e B7.2, no seu conjunto denominadas complexo B7, que irão interagir com a molécula CD28 na superfície de células T, sendo esta uma interação necessária que somada à sinalização pelas citocinas produzidas na interação APC-T culminam na ativação completa das células T (LEVINSON, W; JAWETZ, E; MICROBIOLOGIA MEDICA E IMUNOLOGIA, 4ª Ed. PORTO ALEGRE: ARTES MÉDICAS, 1998. 246p.). Assim, a recepção dos sinais MHC-peptídeo e B7 pelos

receptores TCR e CD28 da célula T virgem promove a expansão de células T peptídeo-específicas. (MUELLER et al., 1989). Isto decorre da transcrição e secreção de interleucina 2 (IL-2), assim como da expressão de receptores de alta afinidade para esta citocina.

A interação da IL-2 com o seu receptor permite que as células T ativadas realizem a expansão clonal, ou seja, dividam-se duas a três vezes por dia durante vários dias, originando milhares de células filhas, todas portadoras de um mesmo receptor específico para o antígeno. (SMITH KA, 1990; WHITTINGTON R, FAULDS, 1993).

Na sua ativação, as células T passarão a exibir outra molécula - denominada CTLA - 4 semelhante ao receptor CD28, que entretanto apresenta maior afeição pelas moléculas B7 do que a molécula CD28. O CTLA-4 detém a função de controle da ativação das células T. Isto ocorre porque a interação B7-CTLA-4 implica em um sinal inibitório à célula T ativada para que a resposta proliferativa seja interrompida e regulada, resultando em uma menor produção de citocinas relacionadas à proliferação, como a IL-2. (LING et al., 2001; BUTTY et al., 2007).

Neste clássico processo inicial de ativação das células T existe participação de moléculas acessórias ou de adesão, isso porque a interação entre o TCR e moléculas de MHC não é muito forte. As moléculas acessórias são importantes para estabilizar a interação e incluem o fator de ativação de linfócitos (LFA-1 - integrina composta de CD11a e CD18) e a molécula de adesão intracelular (ICAM-1), as quais favorecem a manutenção desta adesão. Além destas, temos a interação CD40/CD40L que é importante para que macrófagos e células dendríticas produzam o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 12 (IL-12) que são citocinas pró inflamatórias e, no caso da IL-12, indutora de interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos T (CHAN et al., 1991; TRINCHIERI, 1994; SHU et al., 1995).

A molécula ICOS ("Inducible Costimulator Protein", co-estimulador indutível, molécula homóloga de CD28) tem sua expressão induzida na célula T após a ocupação do TCR. ICOS liga-se ao ligante de ICOS (ICOSL), expresso em células apresentadoras de antígeno, sendo esta uma interação importante na regulação de produção de citocinas por células T (Th1 e Th2) recém-ativadas (SHARPE & FREEMAN, 2002). Nas respostas Th2 de memória, a sinalização celular conduzida por ICOS/ICOSL é muito

importante, e é capaz de dispensar uma nova interação CD28/B7 (LEZZI et al., 1998). A sinalização ICOS/ICOSL controla principalmente a produção de citocinas por linfócitos T recém ativados, porém é pouco eficaz na ativação de linfócitos T virgens, cuja ativação inicial parece ser estritamente dependente da co-estimulação pela molécula CD28 (HUTLOFF et al., 1999, NURIEVA et al., 2003).

1.2.1. Os linfócitos TCD4+,TCD8+ e B (B220+) na resposta imunológica.

Os linfócitos T desempenham diversas funções na **resposta imune celular** podendo ser grosseiramente subdivididos nas categorias auxiliar e diretamente efetora. A função auxiliar é mediada primeiramente por células T CD4⁺ (Th: auxiliares ou “helpers”), as quais operam principalmente através da produção de citocinas. Assim, células T auxiliares produzem IL-2 que é responsável pela ativação/proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (GOLDSBY et al., 2002), e Interferon-gama (INF- γ), que ativa os macrófagos; (AKIRA, 2011). Além disto, os linfócitos CD4+, através da produção de diferentes citocinas, induzem nos linfócitos B a produção de determinadas classes de anticorpos (AKIRA, 2011). Por outro lado, uma função diretamente efetora é desempenhada pelas células T citotóxicas (CD8⁺) que eliminam as células infectadas por vírus, células tumorais e enxertos (GOLDSBY et al., 2002).

Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ têm grande importância no estabelecimento da resistência do hospedeiro a determinadas infecções. Esta relevância foi demonstrada utilizando camundongos deficientes de células T CD4⁺, T CD8⁺ ou ambas, que quando infectados com parasitas como *Plasmodium*, *Leshimania* ou *T. cruzi*, revelaram uma suscetibilidade aumentada, resultando em altos níveis de parasitismo e mortalidade. (LEVINSON & JAWETZ, 1998).

A **imunidade humoral** é mediada por anticorpos (Ac), glicoproteínas solúveis reativas com o antígeno indutor que são produzidas após ativação dos linfócitos B maduros (ABBAS AK, LITCHMAN AH, PILLAI S. CELULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 6ª ed, Editora Saunders 2007). Seu papel frente a patógenos extracelulares, tal e como as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é muito importante.

O processo de ativação de células B pode ser T (timo) dependente ou T (timo) independente. A ativação T independente das células B ocorre usualmente em resposta a moléculas não proteicas, tais como polissacarídeos, lipídeos ou outras macromoléculas, oriundas de reciclagem pelas células dendríticas e expostas nas membranas para reconhecimento direto pelo linfócito B, resultando na produção de anticorpos de baixa afinidade, pertencentes na sua maioria, à classe IgM (JUNIOR. M. D, 2010, e. JANEWAY CA et al. IMUNOLOGIA: O SISTEMA IMUNE NA SAUDE E NA DOENÇA. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006). Na ativação T-independente dos linfócitos B, não havendo ativação dos linfócitos T, não serão geradas sinalização necessária para a mudança de classe, maturação de afinidade ou formação de linfócitos B de memória. (GARCIA DE VINUESA, C, 1999).

Já a resposta T-dependente, além de interação antígeno-BCR, requer participação dos linfócitos T CD4+. Na cooperação T-B, peptídeos derivados do processamento do antígeno, que foi captado através do BCR pelo linfócito B, serão expressos na fenda das moléculas MHC-II expressas na sua superfície, para seu reconhecimento pelos linfócitos T auxiliares (CD4+). Como resultado da interação T-B, os linfócitos B irão se ativar, ocorrendo não somente a sua expansão clonal, mas também uma diferenciação funcional que irá resultar, de um lado, na mudança de classe, ou seja, na produção dos anticorpos das classes e subclasses mais eficientes (de IgM para IgA, IgG ou IgE), e do outro, na possibilidade de geração de memória imunológica.

Ainda, a interação T-B poderá permanecer restrita ao espaço extrafolicular (ativação extrafolicular das células B), ou poderá prosseguir no interior do folículo linfoide (ativação folicular). Na ativação folicular, a interação do linfócito B ativado com o linfócito T CD4+ é um processo demorado (pode levar duas semanas) que resulta na mutação somática dos genes de imunoglobulina do linfócito B, com o consequente ganho na afinidade do seu BCR pelo antígeno. Entretanto, para que esta ativação folicular ocorra, ambos os linfócitos B e os linfócitos T CD4+ deverão sofrer uma diferenciação funcional, se transformando em células CD4+ auxiliares foliculares (THF, do inglês "Follicular Helper T cells") e células B dos centros germinativos (GC-B, do inglês "Germinal Center B cells").

Em resumo, a ativação T-dependente das células B, esteja esta limitada à etapa extrafolicular, ou prosseguindo para a etapa folicular, permite obter uma diferenciação funcional dos anticorpos produzidos nas classes e subclasses mais adequadas/eficientes frente ao microorganismo, ou elemento indutor. Ainda, ao propiciar a mutação somática nos genes que codificam a porção variável das imunoglobulinas nos linfócitos GC-B, a ativação folicular permite um ganho na afinidade dos anticorpos produzidos, assim como a geração de plasmócitos e células de memória de longa duração (ABBAS AK, LITCHMAN AH, PILLAI S. *CELULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY*, 6ª ed, Editora Saunders 2007; JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT MARK, SHLOMCHIK M. *IMUNOLOGIA – O SISTEMA IMUNE NA SAUDE E NA DOENÇA*, 5ª ed, Editora Artmed, 2002).

1.3. A infecção pelo *Trypanossoma cruzi* e a resposta imune.

Em humanos, após período de incubação de 1 a 3 semanas, inicia a fase aguda que dura cerca de dois meses. Nesta fase é frequente encontrar números elevados do *T. cruzi* na corrente sanguínea e nos tecidos, que promovem uma expressiva resposta imune com altos níveis de citocinas e ativação de linfócitos B e T (JUNQUEIRA, 2010 e RODRIGUES, 2011). Cerca de 2% da população infectada (principalmente crianças) morrem na fase aguda devido à miocardite ou meningoencefalite. Contudo, a maioria dos indivíduos infectados sobrevive, pois o desenvolvimento da resposta imune determina o controle do parasita. Este é, entretanto, um controle não estéril, em tal forma que pequenos números de parasitas persistem nos tecidos pela vida do hospedeiro, aparecendo ocasionalmente no sangue onde podem ser detectados por diversas técnicas de amplificação. Na evolução natural da fase aguda, gradativamente, há redução de parasitemia e aumento de anticorpos IgG (BRASIL, 2009). Entretanto, em alguns casos a fase aguda pode cursar com manifestações mais severas, como as que acontecem na infecção oral, na qual podem ocorrer altos níveis de parasitemia, mortalidade, lesões no fígado e alta produção das citocinas pró-inflamatórias INF- γ e TNF- α (BERMUDEZ et al., 2016).

Na fase crônica, o diagnóstico é essencialmente sorológico (anticorpos IgG) devido à dificuldade na detecção do parasita no sangue periférico. Sem tratamento, por volta de 70% dos indivíduos permanecerão assintomáticos por toda a vida. Nessa fase assintomática (que foi denominada de indeterminada), o indivíduo não apresenta sintomas e nem sinais de comprometimento do coração e do aparelho digestivo; mas apresenta sorologia (IgG) e, eventualmente, demonstração parasitológica positiva por exames de amplificação. Esse quadro pode perdurar por toda a vida do indivíduo infectado ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (COURA, 2007; DIAS et al., 2009; PITTELA, 2009; TEIXEIRA et al., 2006; URBINA, 2010). A forma crônica cardíaca é a manifestação mais importante da Doença de Chagas devido à sua frequência (ocorre em torno de 30% dos chagásicos crônicos) e severidade (MACHADO et al., 2012). Os indivíduos desenvolvem arritmias, falência cardíaca e tromboembolismo em consequência da miocardite, fibrose miocárdica, destruição do sistema de condução e redução do número de neurônios cardíacos. Na forma digestiva há disfagia e/ou constipação severa resultante de alterações no peristaltismo do esôfago e/ou cólon (PITTELA, 2009; MACHADO et al., 2012).

Diversas são as ferramentas do sistema imune que permitem o controle não estéril do parasita. Os anticorpos da classe IgG são fundamentais no controle das formas extracelulares, os tripomastigotas. Sua ação opera em grande parte por ativação do sistema complemento, que permite a opsonização do parasita, aumentando a atividade fagocítica dos macrófagos e outras células da imunidade inata (FRANQUINI et al., 1996; UMEKITA LF, BARBARO KC & MOTA I, 1996). Já as células TCD8⁺ são fundamentais na eliminação das células infectadas (TARLETON, 1990). Por outro lado, as células CD4⁺, além de importantes para permitir o desenvolvimento da resposta humoral pelas células B, contribuem, junto às células CD8⁺, à produção de IFN- γ , uma citocina fundamental para o controle do parasita, principalmente pela sua ação ativadora de macrófagos que permite a destruição dos tripomastigotas fagocitados (MUNOZ FERNANDEZ et al., 1992).

O *T. cruzi* exibe ampla heterogeneidade. Neste trabalho, os nossos estudos foram realizados majoritariamente com parasitas da cepa Sylvio X10/4, clonado a partir de um

isolado obtido de insetos (“barbeiros”) utilizados no xenodiagnóstico de um paciente com miocardiopatia chagásica aguda do Pará (MARINHO et al., 2007). O *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 caracteriza-se pela baixa virulência (cursa com níveis subpatentes de parasitemia) e orientação miotrópica, e em determinadas linhagens de camundongos induz lesões cardíacas crônicas semelhantes às observadas em humanos; ou seja, infiltração por leucócitos, fibrose e presença de raros ninhos de amastigotas (MARINHO et al., 2009). Contudo, no camundongo C57BL/6, não promove lesão cardíaca crônica importante e a taxa de mortalidade é baixa (MARINHO et al., 2007). No nosso projeto realizamos também alguns experimentos com parasitas da cepa Y, uma cepa de alta virulência, que possui orientação reticulotrópica, e determina níveis patentes de parasitemia na fase aguda, assim como elevadas taxas altas de mortalidade em algumas linhagens de camundongos normo-imunes.

1.3.1. A ativação policlonal do sistema imune.

O Linfócito B possui uma imunoglobulina de superfície chamada de BCR cuja função é servir como receptor de antígeno. O BCR tem dois importantes papéis no contexto de ativação de linfócitos B. Primeiro é responsável pela transmissão de sinais ao interior da célula na ligação ao antígeno; e secundamente, o BCR entrega o antígeno aos sítios intracelulares para ser degradado e depois retornarem à superfície processados e ligados à molécula da classe II do MHC - conjunto que será reconhecido pelos linfócitos T auxiliares (Th, de T helpers) (ABBAS AK, LITCHMAN AH, PILLAI S. CELULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 6ª ed, Editora Saunders 2007).

No modelo murino, além da ativação clássica das células B, a infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* desencadeia uma ativação intensa e policlonal de linfócitos B com hiperprodução de imunoglobulinas com amplo leque de reatividades, sendo que grande parte mostra afinidade por antígenos aparentemente não relacionados ao *T. cruzi* (D’IMPÉRIO LIMA et al., 1985,1986). Esta ativação policlonal é um processo dependente das células T CD4+ (MUXEL, et al., 2010), e apesar de poder induzir mudança de classe para a IgG, não determina mutação somática e ganho de afinidade dos anticorpos. O mecanismo de indução da ativação policlonal não foi esclarecido,

assim como seu papel, sendo que para alguns pesquisadores trata-se de um erro do sistema imune que pode desencadear efeitos negativos, tais como autoimunidade.

Como indicado acima, em paralelo à ativação policlonal a interação linfocitária T-B se consolida para a produção de anticorpos de alta afinidade quando os linfócitos T auxiliares, agora diferenciados em células T foliculares, interagem no folículo linfóide com os linfócitos B através de moléculas na superfície, bem como através de citocinas produzidas pelas células T, processo nos quais há uma seleção dos linfócitos B mutados que apresentam maior afinidade para com o antígeno (JUNIOR. M D, 2010).

1.3.2. A infecção pelo *Trypanossoma cruzi* ou outros parasitas, e a molécula CD28.

Em trabalho anterior, Martins e colaboradores (2004) avaliaram a infecção de camundongos CD28-deficientes (CD28KO) pelo *T.cruzi* da cepa Y, um isolado de alta virulência. Neste trabalho foi mostrado que, durante a infecção, a ativação das células T é profundamente prejudicada nos camundongos CD28 deficientes, apresentando diminuição da resposta linfoproliferativa em comparação com os camundongos B6 infectados. Uma alta suscetibilidade à infecção, com maior parasitemia patente e parasitismo tissular, e menor infiltrado de células no coração, foram também observados. Os camundongos controle infectados sobreviveram à infecção aguda, enquanto os camundongos CD28 deficientes sucumbiram na sua totalidade nas primeiras semanas. O modelo mostrou que é primordial a presença da molécula CD28 para a ativação das células T, e também na indução dos mecanismos efetores que controlam o crescimento dos parasitas nos camundongos infectados.

Já há alguns anos tem sido descrita a importância da ativação celular dependente da molécula CD28 em diversas patologias. Contudo, em infecções por alguns vírus, os sinais mediados por CD28 têm pequena importância na diferenciação das subpopulações Th1 e Th2 de linfócitos (BROUN, et al., 1996). Por outro lado, Mathur e colaboradores (1999) relataram o papel central de CD28 na indução da resposta Th2 e na produção de anticorpos após a infecção, pelas vias aéreas, em camundongos infectados com o helminto *Shistosoma mansoni*.

Na toxoplasmose, estudos mostraram que, embora o CD28 seja necessário para as respostas de linfócitos T, a interação entre outras moléculas co-estimulatórias com ação semelhante à do CD28 poderia levar à produção de IFN- γ pelos linfócitos durante a fase aguda desta doença (VILLEGAS E.M, 2002).

Em nosso grupo de pesquisa, Elias et al. (2005), demonstraram que a molécula co-estimulatória CD28 é necessária para o desenvolvimento adequado da imunidade T e B específicas e protetoras ao *Plasmodium chabaudi chabaudi* (*P. chabaudi*). Estes pesquisadores investigaram o papel de CD28 na resposta imune primária e secundária a este parasita; e mais especificamente, na ativação policlonal linfocitária e na geração das respostas patógeno-específicas. Verificaram que a ausência de CD28 não altera a expansão de linfócitos T e B na fase aguda da doença. Ainda, observaram que a resposta policlonal com produção de IgM independe de CD28; verificou-se porém, que a produção policlonal de IgG2a é influenciada por este co-receptor. No presente trabalho, estudamos o papel de CD28 no desenvolvimento da resposta imune nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Mais especificamente, visamos esclarecer até que ponto esta molécula está envolvida na ativação celular e humoral induzidas pelo *T. cruzi* de baixa virulência Sylvio X10/4.

2. Justificativa.

A análise da resposta imune em modelo de camundongos CD28KO infectados com um parasita de baixa virulência, o *T. cruzi* Sylvio X10/4, justifica-se pelo fato dessa infecção provocar a morte destes camundongos em um período distendido. Este fato nos permite explorar criteriosamente quais mecanismos da resposta imunológica oferecem falhas ao responder à infecção na ausência de CD28 e também quais continuam eficazmente funcionais, permitindo ao camundongo infectado uma sobrevivência considerável. Neste contexto, estudos anteriores de infecção com os vírus LCMV (Linfocoriomeningite) e VSV (Vírus da estomatite vesicular) mostraram resultados diferentes no que se refere à dependência da molécula CD28. Assim, enquanto que na infecção por LCMV, que transcorre com alta viremia, a resposta CD8+ induzida é

CD28-independente; na infecção por VSV (que determina pouca replicação viral) a ativação das CD8+ específicas depende de CD28 (ORDING et al., J. IMMUNOL, 2000). Face destas observações, o estudo da interação da molécula CD28 na infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4 pode se tornar fundamental para investigar a relevância de CD28 no desenvolvimento das diferentes atividades funcionais.

3. Objetivos.

Verificar a importância da sinalização pelo co-receptor CD28, estimando no camundongo CD28KO infectado pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, e em relação ao camundongo B6 infectado, os seguintes parâmetros:

- Nível de parasitemia subpatente, assim como o nível de parasitismo tissular.
- Frequência e número total de linfócitos T CD4+, T CD8+ e B220 no baço.
- Expressão nas células TCD4+ e TCD8+ esplênicas de moléculas envolvidas na resposta imune ao *T. cruzi*, tal como ICOS que poderia estar também diminuída, ou alternativamente expressa, compensando ou não o déficit em CD28.
- Avaliação da produção de citocinas Il-2 e IFN- γ pelo baço.
- Presença de GCs B Cells (células B dos centros germinativos: Fas^{High} GL7^{High}) e células T_{FH} (células T Foliculares Auxiliares: CD4+ CXCR5^{High} PD1^{High}).
- Reatividade sérica frente a antígenos não relacionados ao *T. cruzi*, que sugere ativação policlonal da resposta imune humoral.
- Resposta humoral frente ao parasita, medida através do nível sérico de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM e das subclasses IgG2c e da subclasse IgG2c, assim como das imunoglobulinas totais destas classes e subclasses.

4. Material e métodos.

4.1. Modelo experimental.

Para a realização deste projeto foi utilizado o modelo murino. Utilizamos quatro grupos de camundongos fêmeas: (1) C57BL6 (Selvagem, Wild Type [WT]) Infectados pelo *T.*

cruzi Sylvio X10/4, e (2) não infectados; (3) CD28KO (Deficientes, em background C57BL6), infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, e (4) não infectados, de 6 a 8 semanas de idade, que foram obtidos no Biotério de camundongos Isogênicos, ICB/USP, São Paulo.

4.2. Manutenção da Cepa de *Trypanosoma cruzi*.

Os tripomastigotas do parasita Sylvio X10/4 (SILVEIRA et al, HILÉIA MEDICA, Belém, 1979), foram mantidos em cultura por meio de passagens semanais em monocamadas de células LLC-MK2 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC- CCL7.1). O sobrenadante coletado no sétimo dia de cultura, dia do pico ascendente da cultura contendo os parasitas, foi coletado e centrifugado a 4°C, 1200 RPM durante 7 minutos e o pellet de parasitas ressuspensos em meio de cultura RPMI1640 (Gibco). O número de parasitas na suspensão foi determinado por contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer) e ajustado para 1×10^6 parasitas/mL. Os camundongos foram inoculados pela via intravenosa (i.v.) com 2×10^5 parasitas em um volume de 0.2 mL. Entretanto, para a análise da subpopulação de linfócitos T Foliculares Auxiliares (do inglês T Foliculars Helpers – TFH) e da subpopulação de linfócitos B do centro germinativo (do inglês, Germinal Center B Cell – GC B cell), os camundongos foram inoculados pela via intravenosa (i.v.) com 0.2 mL da suspensão contendo 25×10^6 parasitas/mL.

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA & NUSSENZWEING, 1953), obtida originalmente do Centro de Imunologia do Instituto Butantã, é mantida no nosso laboratório em camundongos da linhagem A/J, através de passagens semanais de sangue infectado. Em resumo, após quantificarmos por contagem no hemocitômetro (câmara de Neubauer) o nível de parasitas no sangue no sétimo dia de infecção, a suspensão é ajustada para 5×10^5 parasitas/ml, e a infecção realizada pela via intraperitoneal (i.p) com 200ul da suspensão contendo 1×10^5 parasitas. Esta linhagem de *T. cruzi* foi utilizada para determinar nos camundongos C57BL6 o tempo de infecção idôneo para a avaliação das TFH e GC-B, tempo que iria ser aplicado nas experiências de infecção por parasitas Sylvio X10/4 em camundongos C57BL/6 e CD28KO.

Ainda, nos experimentos de análise de TFH e GC-B, e em função da necessidade de utilizarmos um inóculo elevado de *T. cruzi* para induzir um nível expressivo destas

populações no baço do camundongo C57BL/6, tornou-se necessário, para evitar a morte dos animais, o tratamento dos camundongos infectados com o quimioterápico Benzonidazol (LAFEPE). Assim, no sétimo dia de infecção, os animais dos grupos infectados e controles foram tratados com uma dose única deste fármaco, de 1g/kg de peso corporal, através de gavagem, o que corresponde à via intra-gástrica (i.g.).

4.3. Desenho Experimental/ Infecção pelo *T. cruzi*.

Grupos de camundongos C57BL6 e CD28KO foram infectados via endovenosa com inoculo de 2×10^5 *T. cruzi* clone Sylvio X10/4 em um volume de 200ul por animal (ou eutanasiados em diferentes dias, por inalação de Isoflurano).

Como indicado acima, na padronização do dia ideal para análise das células GC-B e TFH, grupos de camundongos C57BL6 e CD28KO foram infectados via endovenosa com inoculo de 1×10^3 *T. cruzi* cepa Y em um volume de 200ul por animal e eutanasiados entre os dias 14 e 19 de infecção conforme parasitemia patente. Na infecção pelo parasita Sylvio X10/4 a infecção dos camundongos C57BL/6 e CD28KO foi realizada com 5×10^6 parasitas inoculados pela via intravenosa (i.v.).

4.4. Avaliação da parasitemia patente.

A parasitemia patente foi avaliada pela observação microscópica de amostras de 5ul de sangue, obtidas pela secção da cauda dos animais, entre lâmina e lamínula de 22 x 22 mm. Foram contados 50 campos no aumento de 40X e o número obtido multiplicado por 10^4 para expressar a quantidade de parasitas por mL de sangue, segundo método descrito por Brenner (1962).

4.5. Avaliação da parasitemia subpatente: Análise microscópica da cultura em meio L.I.T (LIVER INFUSION TRIPTOSE).

A parasitemia subpatente dos camundongos CD28KO e WT infectados com 2×10^5 parasitas Sylvio X10/4/camundongo foi avaliada deste o início da infecção até a diversos momentos da fase crônica.

O método para avaliar a parasitemia subpatente utiliza volumes pré-estabelecidos de sangue do animal infectado incubados em meio Liver Infusion Triptose (LIT) (CHIARI & BRENNER, 1966). Amostras de 5 μ L, 1 μ L e 0,2 μ L de sangue, obtidas pela secção da cauda de cada animal infectado, foram depositadas (em quintuplicata) em poços de placas de cultura de 48 poços contendo 1ml de meio LIT, incubadas a 28°C, e acompanhadas periodicamente (aproximadamente aos 10, 25 e 40 dias após a colheita) para avaliar o crescimento dos parasitas. O exame das culturas é realizado no microscópio invertido de acordo com uma padronização previamente estabelecida.

4.6. Detecção de anticorpos por ELISA.

A presença de anticorpos totais e *T. cruzi*-específicos (das classes/subclasses IgM, IgG1 e IgG2C) no soro dos camundongos infectados e controles não infectados foi realizada através do ensaio de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay – Ensaio Imunoenzimático).

Etapas do processo de ELISA para detecção de anticorpos frente a *T. cruzi*: a) sensibilização das placas de alta absorção com 50 μ L de antígeno de *T. cruzi* Sylvio X10/4 - 50 μ g/mL - diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0.05M pH 9.6 e incubado por aproximadamente 18h a 8°C; após esta e cada uma das outras etapas do ensaio de ELISA foram realizadas 3 lavagens sucessivas, de 5 minutos cada uma, com PBS contendo 0,05% Tween 20(Sigma); b) bloqueio por 2 a 3 horas com 200 μ L de PBS-BSA 1%; c) adição das amostras de soro (diluídas em PBS1x-Tween 0,05% contendo 1% de BSA) e incubação por 1h; d) adição do conjugado (diluído 1:2000 tanto para IgM, IgG1 e IgG2c) com incubação de 1h à temperatura ambiente; e) revelação por adição do reagente TMB (ThermoFischer, USA), no volume de 100 μ L (o TMB é o substrato revelador da enzima peroxidase que reage com os anticorpos conjugados a esta enzima adicionados à placa. Finalmente, a leitura da reação foi realizada no espectrofotômetro (Leitor de Elisa Epoch, da Biotek) a 650nm a cada 5 minutos. Quando necessário, se a reação estivesse muito rápida, seria realizado bloqueio com ácido sulfúrico 1M, entretanto, com a adição deste reagente para bloqueio o comprimento de onda deveria ser alterado para 450nm. Todos os anticorpos, incluindo

os conjugados e padrões, foram adquiridos de Southern Biotechnologies Associates (ThermoFischer, USA).

Ainda, o sobrenadante de células do baço foi avaliado para dosagem de citocinas por Elisa de Captura, de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA) e comparando com uma curva padrão da citocina recombinante.

4.7. Análise por Citometria de Fluxo.

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para análise das populações linfocitárias do baço dos animais. Alíquotas das suspensões celulares esplênicas (obtidas por rompimento mecânico do baço em meio RPMI - 3% SBF) foram incubadas com anticorpos frente às diferentes moléculas de superfície (marcação extracelular) e moléculas intracelulares (marcação intracelular).

As células foram marcadas em suspensão com anticorpos de rato, ou com Anexina, ligados a fluorocromos: anti-CD4 (H129.9), anti-CD8 (53-6.7), anti-FAS (Jo2), anti-FASL (MFL-3), anti-PD-1 (J43), anti-PDL-1(B7-41/MIH1), anti-CD69 (H1.2F3) (Antígeno ativação precoce), anti-CD45RC (GL24), anti-CTLA4 (UC10-4F10-11), anti-IFN- γ (XMG1.2), anti-CD62L(LECAM) (L-selectina), anti-CD19 (1D3), anti-CD44 (LY24), anti-CD40L (MR-1), anti-ICOS (e Bio 200 Arm), anti-CD27 (JJJ), anti-CD138 (281-2), anti-CD45.1 (A.20), anti-CD127 (SB/199), anti-KLRG1 (2F1), anti-CD107 (BG3A10), anti-CD27 (LG3A10), anti-Perforina (eBioOMAK-D), anti-OX40 (OX-86) e anti-GL7 (GL7) (Pharmingen, San Diego, USA), conjugados a fluorocromos, tais como Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Fluorescein Isothiocyanate), ficoeritrina (PE, Phicoeritrin) PE CY5 (Cy, cycrome), Proteína peridina clorofil (PERCP protein chlorophyll peridin), Alofococianina (APC, alophococyanin), e Pacific Blue obtidos da pharmigen (San Diego, CA).

As células foram mantidas em meio RPMI contendo soro fetal bovino (10%), piruvato (1%), glutamina (1%) e penicilina/estreptomicina (1%), distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em U (Corning, New York, USA) na concentração de 1×10^6 células /200 μ L / por poço. Após a centrifugação (5 minutos, 4°C, 1200 rpm), o sobrenadante foi desprezado e os anticorpos monoclonais marcados foram

adicionados em concentrações ótimas previamente estabelecidas. As placas de cultura foram mantidas a 4°C por 30 minutos em local com pouca luminosidade. A seguir, as células foram lavadas por três vezes com o tampão de coloração (do inglês, “staining buffer”), sendo posteriormente ressuspensas em 0,4 mL de uma solução de paraformaldeído a 1%. As suspensões de células marcadas foram analisadas em um citometro de Fluxo (BD FACS CANTO e LSRF FORTESSA) (Becton Dickinson, Mountain View, USA).

Ainda, a técnica de citometria de fluxo foi utilizada para verificar a produção de IL-2, através de um protocolo mais complexo, no qual é avaliado a frequência de células que secretam IL-2, de acordo com protocolo do fabricante. Esplenócitos (2×10^6 células /poço) foram colocados em meio gelado adicionado do anticorpo de captura duplo que reconhece IL-2R e IL-2 e mantidos no gelo por 10 minutos. Após esse tempo foi adicionado mais 20 µl de meio de cultura para cada poço para ressuspender as células plaqueadas, que foram então estimuladas a temperatura de 37°C, 5% de CO₂ durante 45 minutos com anti-CD3 em um aparelho de rotação contínua (Mac Mix – Miltenyi Biotec). Após a estimulação, as células foram lavadas com meio gelado por uma vez e lavadas novamente com tampão de coloração celular. Em seguida foi realizada a marcação extracelular com os anticorpos anti CD4 (H129.9), anti CD8 (53-6.7) e anti IL-2 (Pharmingen) e também com o marcador de viabilidade celular (Life Technologies). As amostras foram analisadas em FACSCanto ou LSRF Fortessa (Becton Dickinson).

4.8. Análise histopatológica.

O coração, fígado, músculo estriado esquelético e baço foram retirados dos camundongos, fixados em tampão formaldeído tamponado 10% e emblocados em parafina. Secções seriadas de 3 µm foram coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica.

4.9. Análise estatística.

Para análise comparativa entre grupos experimentais, adotamos o teste *t Student* para duas variáveis assumindo igual variância e teste *One Way* de comparação múltipla. Os níveis de significância foram definidos como sendo inferiores ou iguais a 0,05 ($p < 0,05$).

5. Resultados.

5.1. Taxa de mortalidade.

Para ilustrar o impacto da ausência da molécula CD28 na infecção pelo *T. cruzi* clone Sylvio X10/4, na Figura 1 mostramos alguns gráficos de sobrevivência representativos de experimentos nos quais foram utilizadas duas vias diferentes para o inóculo do parasita. Os gráficos da posição superior representam a infecção pela via intraperitoneal (i.p), e os gráficos da posição inferior, a infecção pela via intravenosa (através do plexo oftálmico), sendo que o inóculo foi de 1×10^5 e de 2×10^5 parasitas por animal, respectivamente, para as infecções via intraperitoneal e endovenosa. Ainda, em alguns experimentos, alguns dos camundongos foram tratados com o fármaco anti-*T. cruzi* Benzonidazol, em dose única, com o intuito de acompanhar a sobrevivência dos animais CD28KO infectados reduzindo a expansão do parasita. Em todos os casos, a infecção foi realizada em camundongos CD28KO e C57BL/6 (WT) com o intuito de compararmos as curvas de sobrevivência.

Na totalidade dos experimentos realizados, independente da via de inoculação, os camundongos CD28KO infectados mostraram uma suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4 significativamente maior do que os camundongos C57BL/6. Além disso, é perceptível em todos os experimentos que os animais CD28KO sucumbiram à infecção em momentos diferentes de um prazo extenso, com início por volta do dia 40 e se estendendo até o dia 245 pós-infecção, confirmando a baixa virulência, características do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi*.

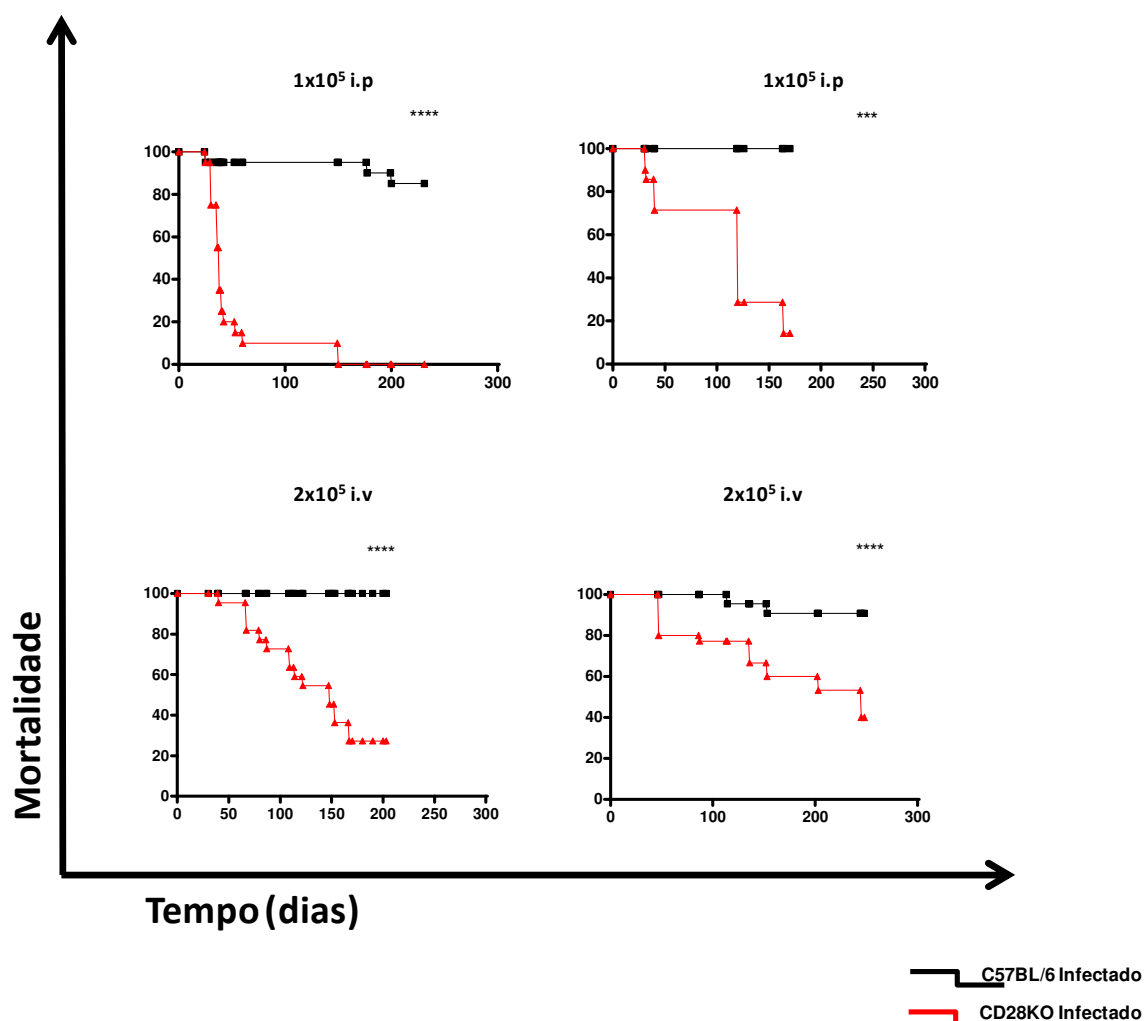


Figure 1 Mortalidade Cumulativa. Mortalidade cumulativa de camundongos controles (C57BL6) e deficientes em CD28 (CD28KO) infectados com parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4.

Dois experimentos representativos mostrando camundongos CD28KO e C57BL6 infectados pela via intraperitoneal com cem mil parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (posição superior), e dois experimentos representativos mostrando camundongos CD28KO e C57BL6 infectados pela via intravenosa com duzentos mil parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (posição inferior). Estatísticas dos experimentos são mostradas. Teste *t* de Student. ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados.

5.2. Parasitemia subpatente na fase crônica.

Em vários momentos da infecção, foram avaliadas as parasitemias subpatentes dos camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 através de um ensaio de amplificação por hemocultura. Neste ensaio, determinados volumes de

sangue do animal infectado são colocados em cultura em meio LIT a 30°C, verificando-se posteriormente a presença do parasita por leitura no microscópio em determinados períodos de tempo (Chiari & Brener, 1966). Esta metodologia contempla a parasitemia subpatente, ou seja, aquela que não é possível detectar examinando diretamente o sangue do camundongo em lâmina ao microscópio.

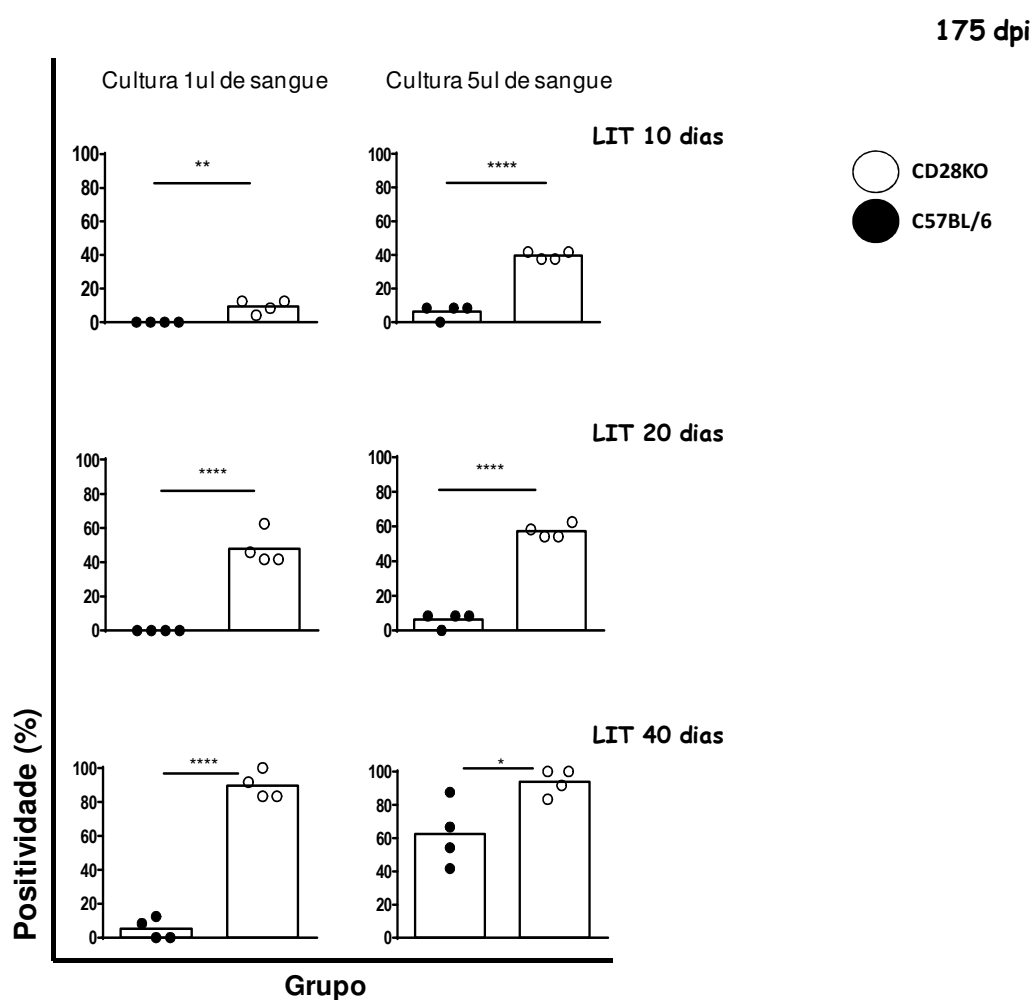


Figure 2. Análise da parasitemia subpatente. Análise da parasitemia subpatente em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4.

Experimento representativo realizado em camundongos crônicos com 175 dias de infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Leituras realizadas por microscopia aos 10, 20 e 40 dias de culturas com 1 ou 5µL de sangue em sextuplicatas. A figura mostra a taxa de parasitemia dos camundongos nos grupos C57BL/6

infectado (em preto) e CD28KO infectado (branco). Estatísticas do experimento em diferentes momentos de leitura são mostradas. Teste *t* de Student. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ****, $P < 0,0001$, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados.

No experimento representativo mostrado na figura 2, realizado aos 175 dias de infecção com uma dose de 2×10^5 (parasitas/camundongo), os camundongos CD28KO mostraram uma parasitemia subpatente na fase crônica superior à dos camundongos C57BL/6 infectados com a mesma dose. Estas diferenças foram mais evidentes quando foi analisado o sangue em volumes menores, ou seja, $1 \mu\text{l}$ / poço. As análises foram feitas em sextuplicata e em cada grupo havia um número de quatro camundongos. Resultados similares foram obtidos no início da fase crônica, ou em tempos mais avançados (Figuras 3 e 4). Não foi observada nenhuma relação direta entre o tempo de cronicidade da infecção e o aumento de parasitas no sangue.

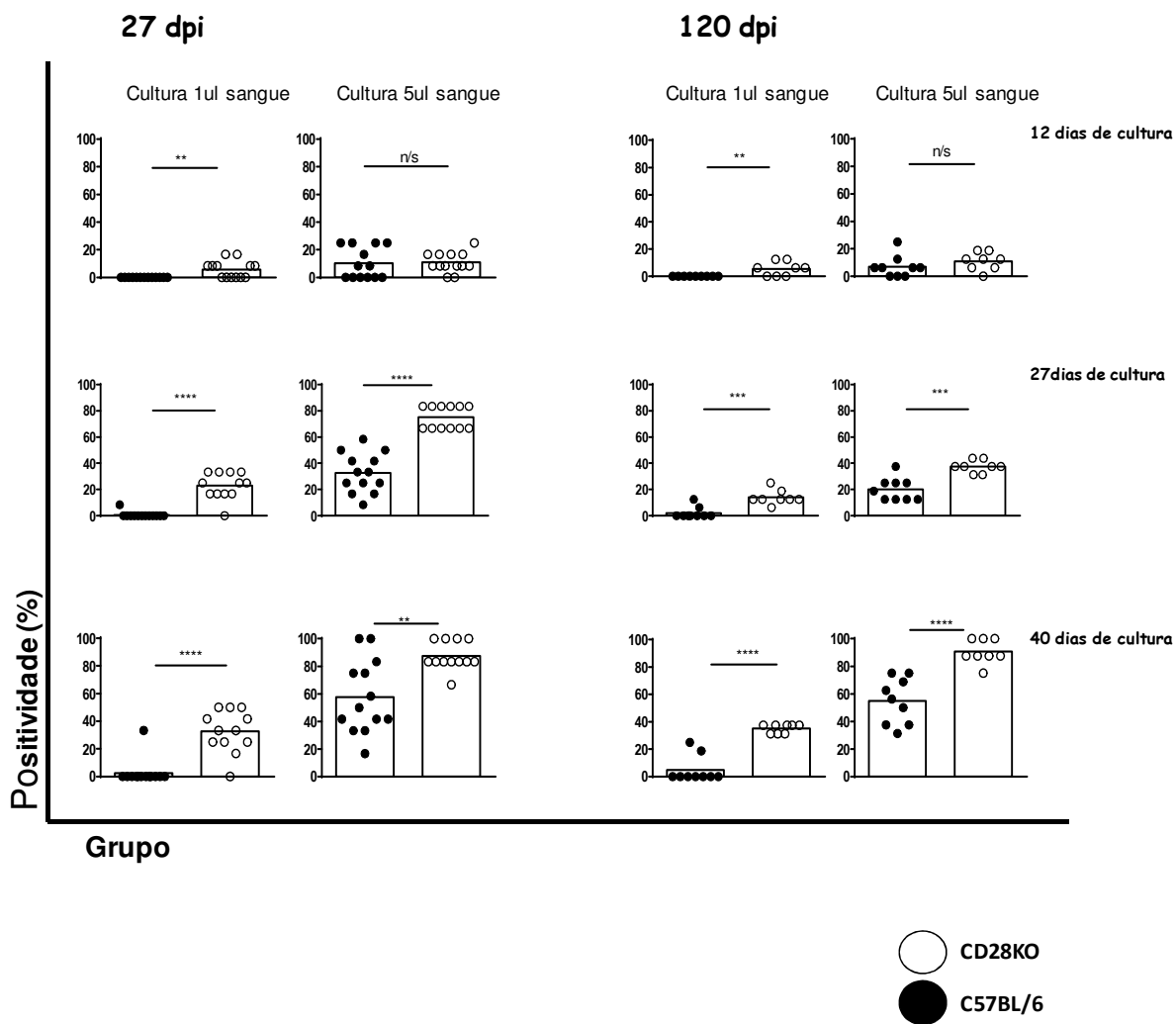


Figure 3. Cinetica de parasitemia subpatente. Analise dos dias 27 e 120 de infecção.

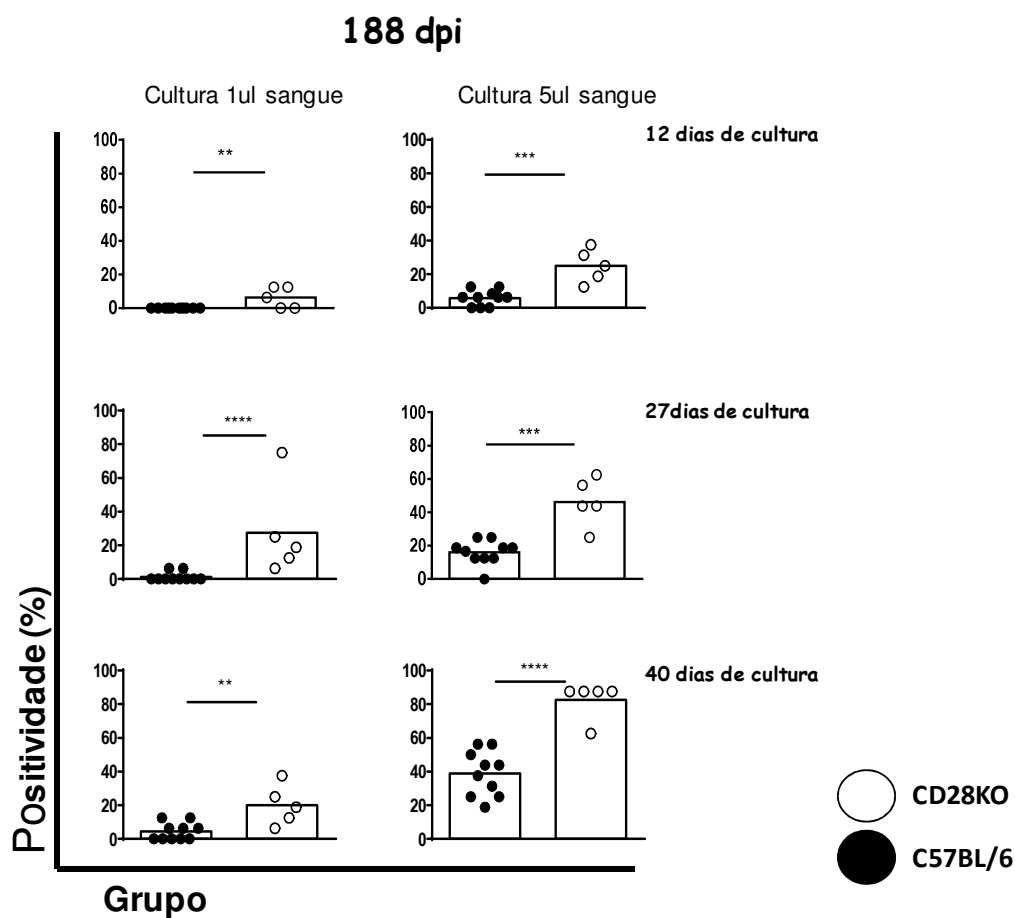


Figure 4. Cinética da parasitemia subpatente em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4.

A parasitemia foi estimada em animais de uma única experiência em diferentes tempos de infecção. Análise da parasitemia subpatente em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. As parasitemias foram avaliadas por microscopia no início da fase crônica (27 dpi) e em fase crônica posterior (120 dpi e 188 dpi) do mesmo experimento. Taxa de parasitemia nos grupos C57BL/6 infectado (em preto) e CD28KO infectado (branco). Estatísticas do experimento em diferentes momentos de leitura são mostradas. Teste *t* de Student. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$, entre os grupos de camundongos C57BL/6 infectados e CD28KO infectados de um mesmo gráfico.

5.3. Análise histopatológica.

A análise histopatológica do tecido cardíaco permitiu avaliar aspectos patológicos resultantes da infecção experimental pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Esta análise teve como base a contagem das células inflamatórias na aurícula e ventrículo, assim como no endocárdio, miocárdio e pericárdio. Deste modo, obtivemos o resultado histopatológico expresso como um sistema de SCORE que permitiu classificar estes animais conforme o grau de lesão inflamatória. Receberam scores 4 e 5 os animais que obtiveram maior acometimento (considerados grave), seguidos dos scores 2 e 3 (acometimento moderado), score 1 (acometimento leve) em relação aos animais controles. Na avaliação final somou-se os scores referentes ao grau histopatológico de cada animal no mesmo grupo.

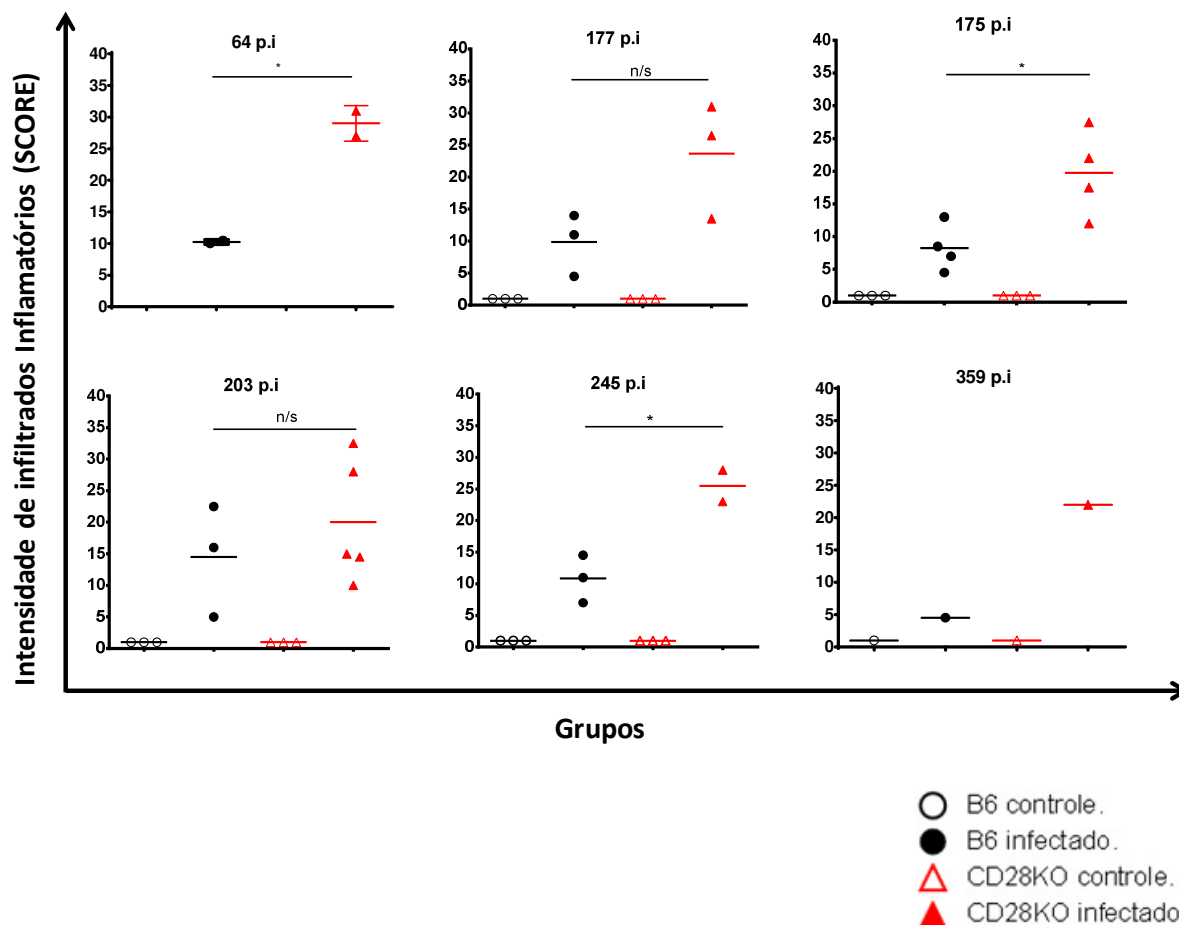


Figure 5. Análise histopatológica do tecido cardíaco. Gráficos representativos do resultado da Avaliação histopatológica por marcação por H/E (Hematoxilina/Eosina) do tecido cardíaco de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados e respectivos controles não infectados (CD28KO não infectado e C57BL/6 não infectado) em diferentes momentos da fase crônica da infecção pelo *T.cruzi* Sylvio X10/4. Os gráficos indicam respectivamente, o SCORE da contagem de infiltrados inflamatórios em diversas regiões do tecido cardíaco. A estatística de cada experimento é mostrada. Teste *One Way Anova*. *, $P < 0,05$; ns, não significativo.

Na análise histológica do tecido cardíaco conclui-se, portanto que os camundongos CD28KO infectados tendem a desenvolver infiltrados inflamatórios mais intensos em relação ao camundongo C57BL/6 infectado, assim como apresentam, em muitos casos, um maior número de ninhos de parasitas (dados não mostrados), o que poderia

indicar no camundongo CD28KO, uma maior colonização do tecido cardíaco e/ou a capacidade reduzida de eliminar o *T. cruzi* do tecido cardíaco.

5.4. Análise da celularidade esplênica.

O baço é um dos mais importantes órgãos envolvidos no controle dos agentes infecciosos que circulam no sangue, desenvolvendo uma função de filtração. É o baço quem elimina da circulação, não somente as hemácias senescentes, mas também microrganismos opsonizados por anticorpos, e incluso na ausência de anticorpos específicos. Ainda, por se tratar de um órgão linfoide secundário, a sua função de captação/filtração mecânica, permite que o baço responda aos microrganismos captados com ativação e proliferação dos linfócitos B e T parasita-específicos. Nos nossos experimentos, os camundongos infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 mostraram na fase aguda (dia 13 p.i.) um considerável aumento no número de células do baço se comparados ao dos camundongos não infectados. Apesar de esse aumento diminuir sensivelmente na fase crônica, ele se manteve em níveis superiores ao dos controles não infectados correspondentes. Contudo, não foram observadas diferenças importantes entre os grupos CD28KO e C57BL/6 infectados.

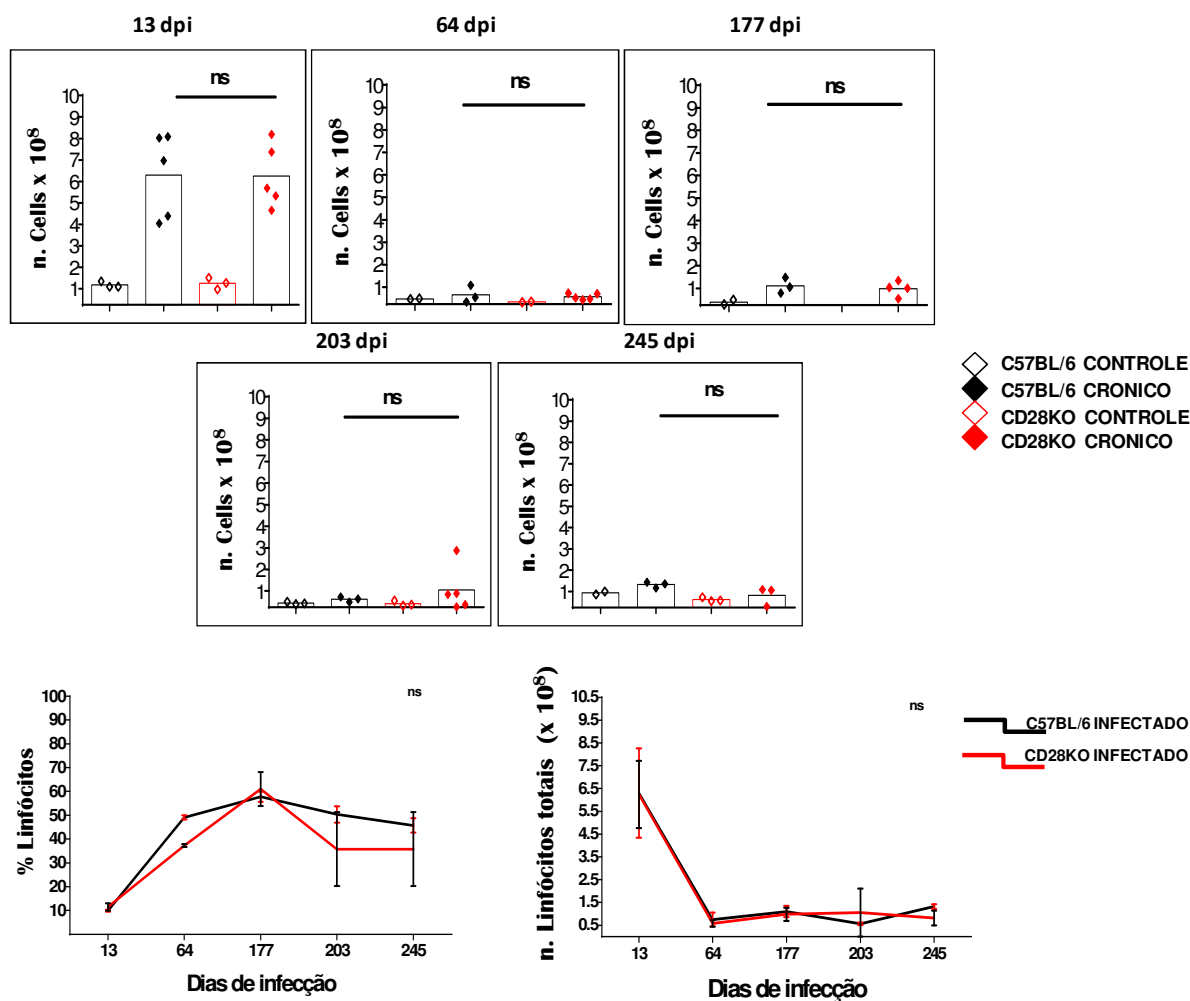


Figure 6. Celularidade Esplênica. Análise do número total de esplenócitos de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Os gráficos mostrados representam diversos experimentos, realizados do dia 13 ao dia 245 pi, de grupos de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados, assim como dos grupos controle não infectados. Os animais foram sacrificados para processamento do baço e posterior análise por citometria de fluxo. Estatísticas de experimentos independentes foram realizadas. Teste ANOVA. ns, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 infectados e CD28KO infectados.

Em resumo, os nossos ensaios revelaram um aumento do número total de células esplênicas em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados em relação aos grupos controle não infectados. A análise comparativa da celularidade total esplênica nos

diferentes períodos de infecção mostra um intenso aumento durante a fase aguda da infecção (dia 13 p.i.), que exibe uma grande dispersão dos valores em ambos os grupos. Na fase crônica (dias 64 até 245 p.i.), os números de células totais no baço tendem a normalizar.

5.5. Análise de células T e B esplênicas.

Nos ensaios de citometria de fluxo, os grupos CD28KO e o C57BL/6 infectados não mostraram grandes diferenças entre si na frequência dos linfócitos TCD4, TCD8 e B220 no baço. Ainda, revelaram aumento similar no número total de células TCD4+ e B220+ esplênicas em ambos os grupos. Porém, uma redução significativa do número total de células CD8+ foi observada no baço dos camundongos CD28KO infectados no decorrer da fase crônica, assim como uma heterogeneidade, que afeta principalmente o número de linfócitos B. Desconhecemos, se a referida heterogeneidade está relacionada à mortalidade destes camundongos no decorrer do tempo (ver gráficos de mortalidade).

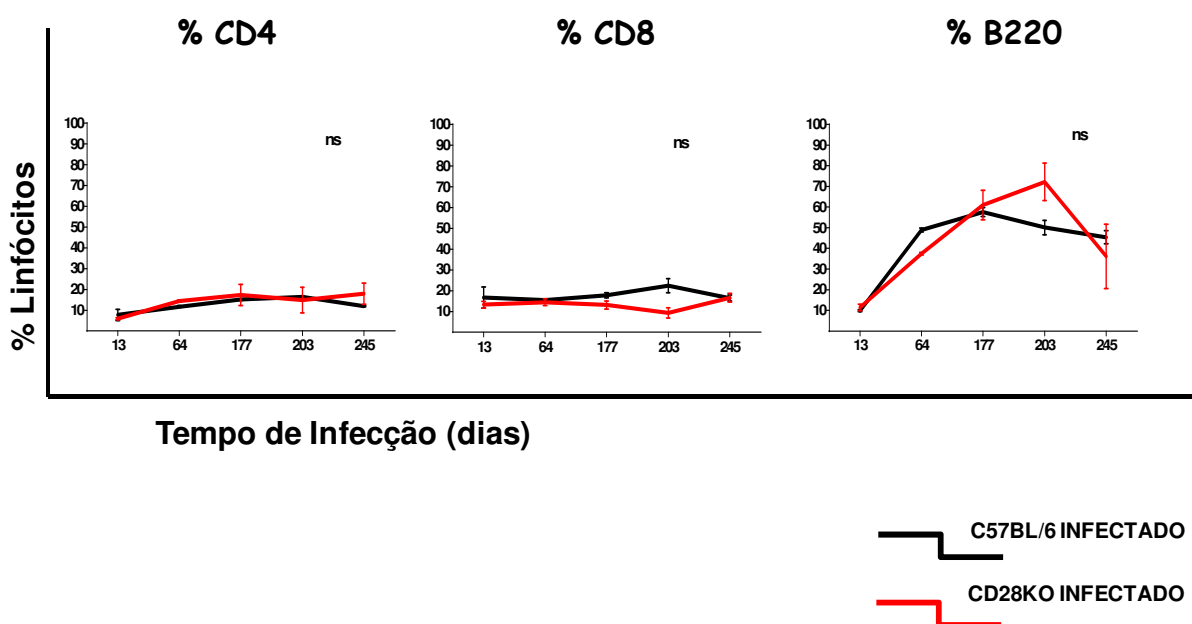


Figure 7. . Análise de frequência de linfócitos TCD4, CD8 e B220. Análise de frequência de Linfócitos T CD4, CD8 e B220 no baço de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Os gráficos mostrados incluem diversos experimentos realizados com grupos de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados, e ainda os controles não infectados (estes últimos não mostrados). Nos dias indicados, os animais foram sacrificados para processamento do baço e posterior análise por citometria de fluxo. Estatísticas de experimentos foram realizadas. Teste *T student*. *, $P < 0,05$; ns, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 infectados e CD28KO infectados.

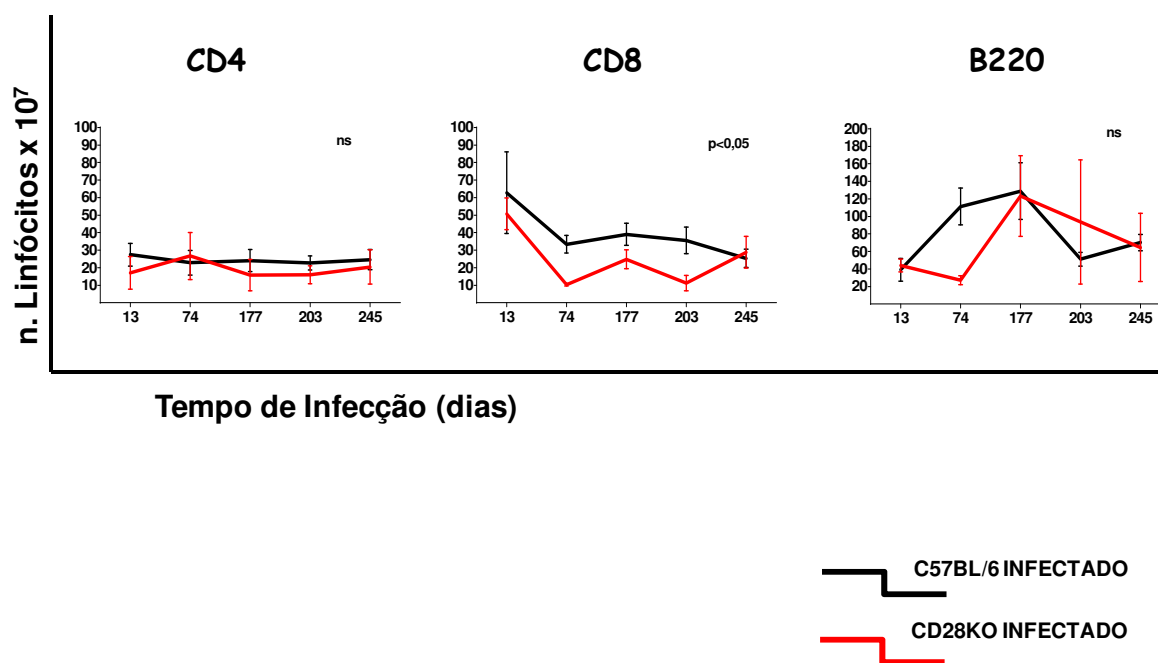


Figure 8. Gráfico de número total de linfócitos TCD4, CD8 e B220. Análise de número total de Linfócitos T CD4, CD8 e B220 no baço de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Os gráficos mostrados representam diversos experimentos realizados com grupos infectados de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados e controles não infectados (estes últimos não mostrados). Nos dias indicados os animais foram sacrificados para processamento do baço e posterior análise por citometria de fluxo. Estatísticas de experimentos foram realizadas. Teste *T student*. *, $p < 0,05$; e ns, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 infectados e CD28KO infectados.

5.6. Frequência e número de blastos das populações esplênicas de linfócitos T CD4, CD8 e B220.

Com o objetivo de verificar a intensidade da resposta imunológica mediada por linfócitos nos camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi*, avaliamos a frequência e número de blastos das diferentes populações linfocitárias no baço destes animais em relação àquelas no controle infectado, o camundongo C57BL/6 (WT).

Esplenócitos de camundongos infectados pela via intravenosa (i.v) com 5×10^6 parasitas *T. cruzi* Sylvio X10/4, por 15 dias, foram marcados com anticorpos frente a CD4, CD8 e CD19 e analisados por citometria de fluxo, para análise através do parâmetro FSC (Forward Scatter – tamanho).

Observou-se uma diminuição da frequência e número de blastos nos linfócitos T CD4 dos camundongos CD28KO infectados em relação às dos camundongos WT infectados (Figura 9). Em contrapartida, em relação aos linfócitos T CD8 não foram detectadas mudanças significativas na frequência, número de blastos dos camundongos WT e CD28KO infectados (Figura 10). Na análise em linfócitos B, apesar de se observar menor frequência de blastos dos camundongos CD28KO infectados, não observamos diferença no total de células B220+ entre os animais CD28KO e WT infectados (Figura 11).

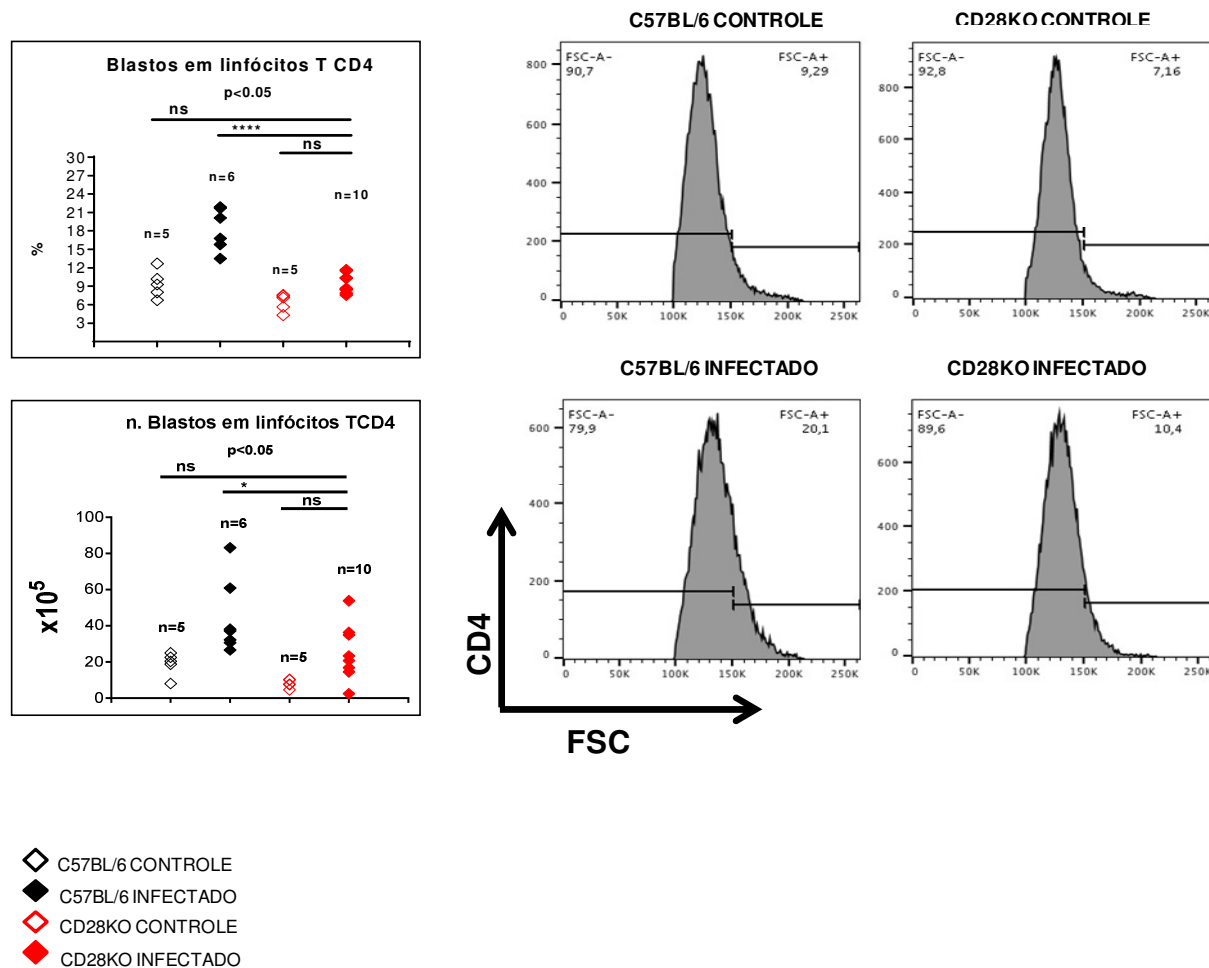


Figure 9. Frequência e número de blastos em linfócitos TCD4+ esplênicos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados por 15 dias pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. . Análise por citometria de fluxo da frequência e número de blastos das populações de linfócitos CD4 de camundongos controles (C57BL/6) e deficientes em CD28 (CD28KO) não infectados ou infectados por 15 dias pela via intravenosa (i.v) com o inóculo de 5×10^6 parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n \geq 5$; camundongos C57BL/6 infectados, $n \geq 6$; camundongos CD28KO não infectados, $n \geq 5$; camundongos CD28KO infectados, $n \geq 10$). Estatísticas do experimento representativo são mostradas. Teste ONE WAY ANOVA. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ n/s, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados e não infectados.**

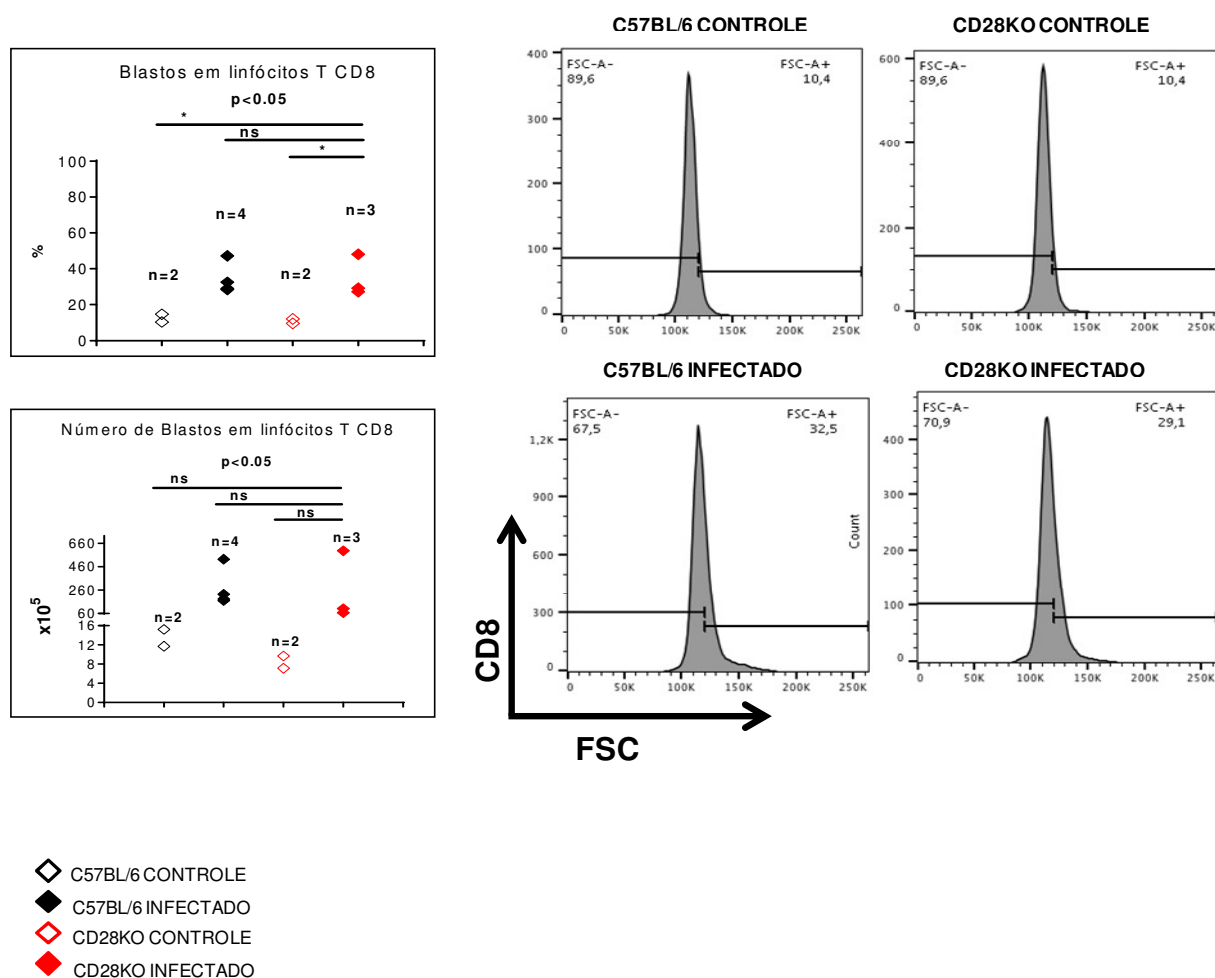


Figure 10. A Frequência e número de blastos em linfócitos TCD8+ esplênicos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados por 15 dias pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. AS figuras 9 e 10 são o resultado da análise por citometria de fluxo da frequência e número de blastos, nas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ de camundongos controles (C57BL/6) e deficientes em CD28 (CD28KO), não infectados ou infectados pela via intravenosa (i.v) com o inóculo de 5×10^6 parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 aos 15 dias de infecção. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n \geq 5$; camundongos C57BL/6 infectados, $n \geq 6$; camundongos CD28KO não infectados, $n \geq 5$; camundongos CD28KO infectados, $n \geq 10$). Estatísticas do experimento são mostradas. Teste ONE WAY ANOVA. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $p < 0,0001$ n/s, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados e não infectados.

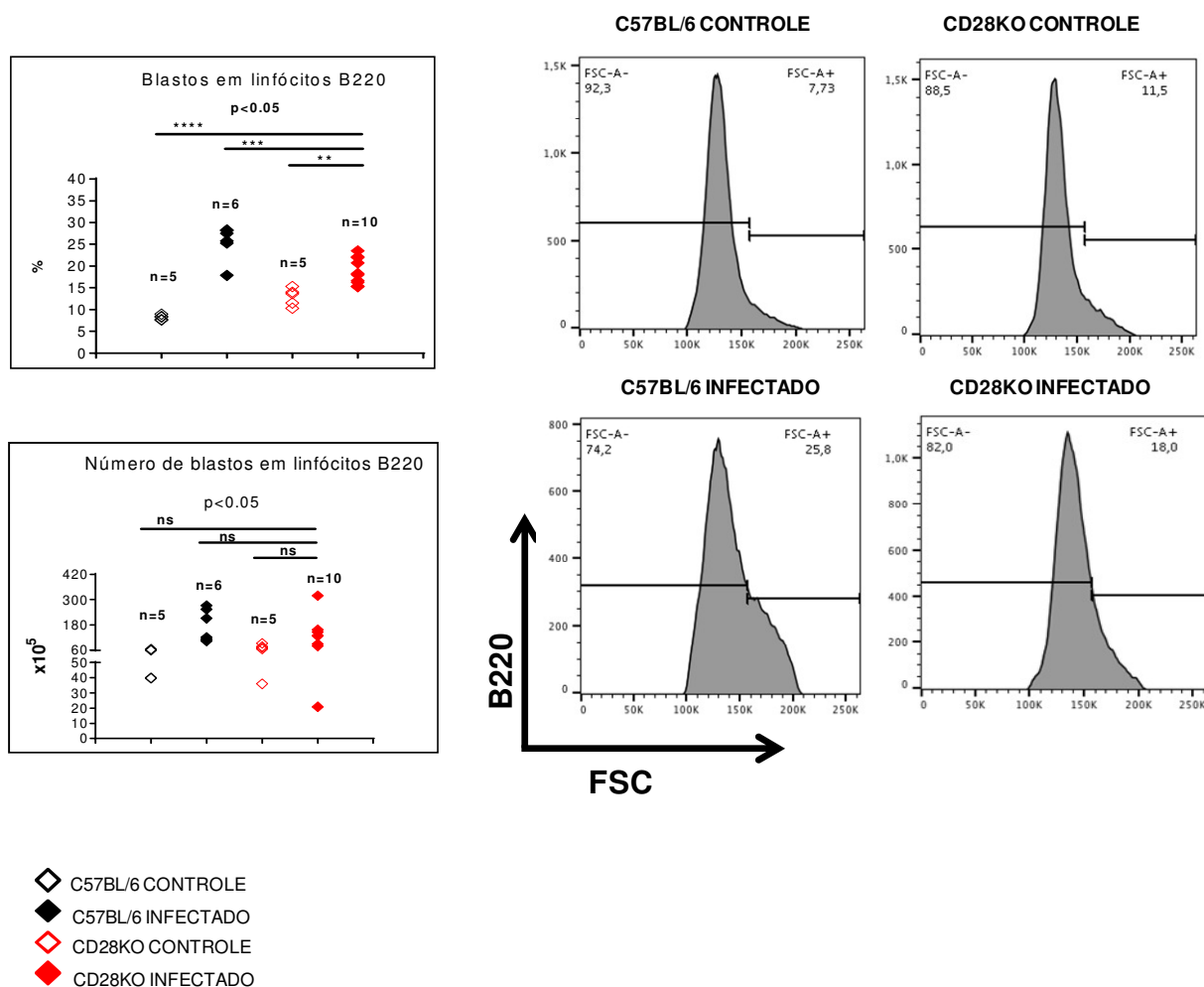


Figure 11. Frequência e número de blastos em linfócitos B220 esplênicos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados por 15 dias pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Análise por citometria de fluxo da frequência e número de blastos das populações de linfócitos B220 de camundongos controles (C57BL/6) e deficientes em CD28 (CD28KO) não infectados ou infectados por 15 dias pela via intravenosa (i.v) com o inóculo de 5×10^6 parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n \geq 5$; camundongos C57BL/6 infectados, $n \geq 6$; camundongos CD28KO não infectados, $n \geq 5$; camundongos CD28KO infectados, $n \geq 10$). Estatísticas do experimento representativo são mostradas. Teste *ONE WAY ANOVA*. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ n/s, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados e não infectados.

5.7. Análise Expressão de ICOS em linfócitos T CD4.

Considerando o papel co-estimulador de ICOS para células T, em ativação independente de CD28, investigamos se a expressão de ICOS na infecção por *T.cruzi* clone Sylvio X10/4 em camundongos deficientes da molécula CD28 aumenta de forma a compensar a ausência da molécula co-estimulatória CD28, o que poderia indicar ativação de linfócito T.

Com o objetivo de verificar uma eventual compensação pela ausência de CD28 na ativação dos linfócitos T, analisamos a expressão de ICOS em linfócitos TCD4 de camundongos CD28KO e C57BL/6, não infectados ou infectados por quinze dias com o parasita *T.cruzi* clone Sylvio X10/4.

No ensaio de citometria de fluxo realizado, a expressão de ICOS nos linfócitos CD4+ do baço de camundongos CD28-deficientes infectados por 15 dias, mostrou-se muito menor quando comparada à de camundongos C57BL/6 infectados, e não diferente daquela observada nas células CD4+ dos camundongos não infectados. Esse resultado pode indicar que na infecção por *T. cruzi* clone Sylvio X10/4 a molécula ICOS possivelmente dependa, ao menos parcialmente, da expressão de CD28, e ainda, não tem o papel de compensar o papel co-estimulador demonstrado pela molécula CD28. Análises da expressão de ICOS em tempos posteriores da infecção não foram realizadas.

Figura 12 A.

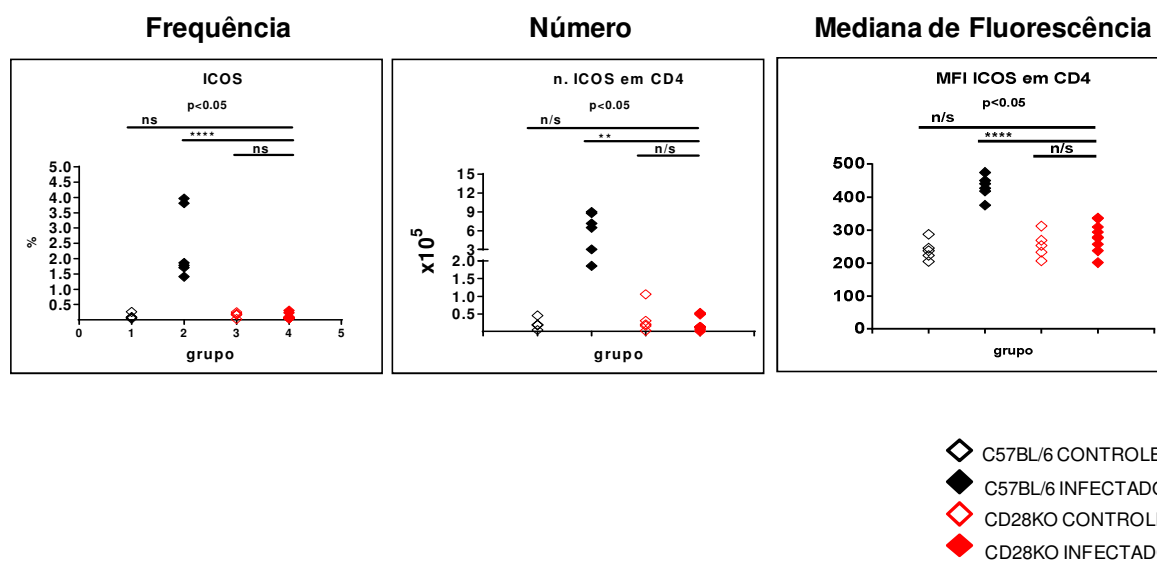


Figura 12 B.

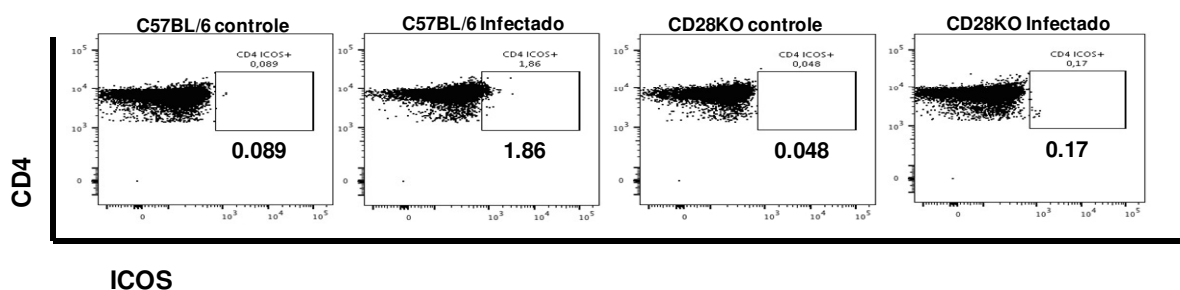


Figure 12. Expressão de ICOS em linfócitos T CD4 esplênicos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados por 15 dias pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Análise por citometria de fluxo da expressão de ICOS nos linfócitos T CD4 esplênicos de camundongos C57BL/6 (WT) e deficientes em CD28 (CD28KO), não infectados ou infectados pela via intravenosa (i.v). No experimento da figura 12 A os camundongos CD28KO e C57BL6 infectados receberam 5×10^6 parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 pela via intravenosa e foram sacrificados no dia 15 de infecção. A figura 12 B mostra os gráficos em dot plot das frequências de ICOS em linfócitos T CD4. Estatísticas do experimento representativo são mostradas. Teste *ONE WAY ANOVA*. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ n/s, não significativo, para os gráficos com os grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados e não infectados.

5.8. Análise de produção de IL-2 por células esplênicas.

Com o objetivo de verificar o impacto da ausência de CD28 na produção da IL-2 e na proliferação dos linfócitos T, analisamos a produção desta citocina nos linfócitos TCD4 (Figura 13) e TCD8 (Figura 14) de camundongos CD28KO infectados por 15 dias com *T.cruzi* Sylvio X10/4. A produção de IL-2 foi avaliada nos esplenócitos destes animais re-estimulados ou não *in vitro* com anti-CD3.

No ensaio realizado após o referido tempo de infecção, os níveis de IL-2 secretados pelos linfócitos re-estimulados com anti-CD3 apresentaram-se diferentes nos grupos C57BL/6 e CD28KO. Assim, nos linfócitos T CD4, mas não nos linfócitos T CD8, os linfócitos do grupo CD28KO mostraram produção de IL-2 inferior à observada nestas populações nos camundongos C57BL/6. Contudo, não deixa de ser notável, que, na ausência de CD28, ainda haja uma produção importante desta citocina. Na ausência de estímulo *in vitro*, os níveis de IL-2 produzidos pelos esplenócitos CD4+ e CD8+ dos camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados por 15 dias foram muito baixos, mas surpreendentemente, discretamente superiores nos CD28KO infectados (13A, 13B, 14A e 14B).

Figura 13 A

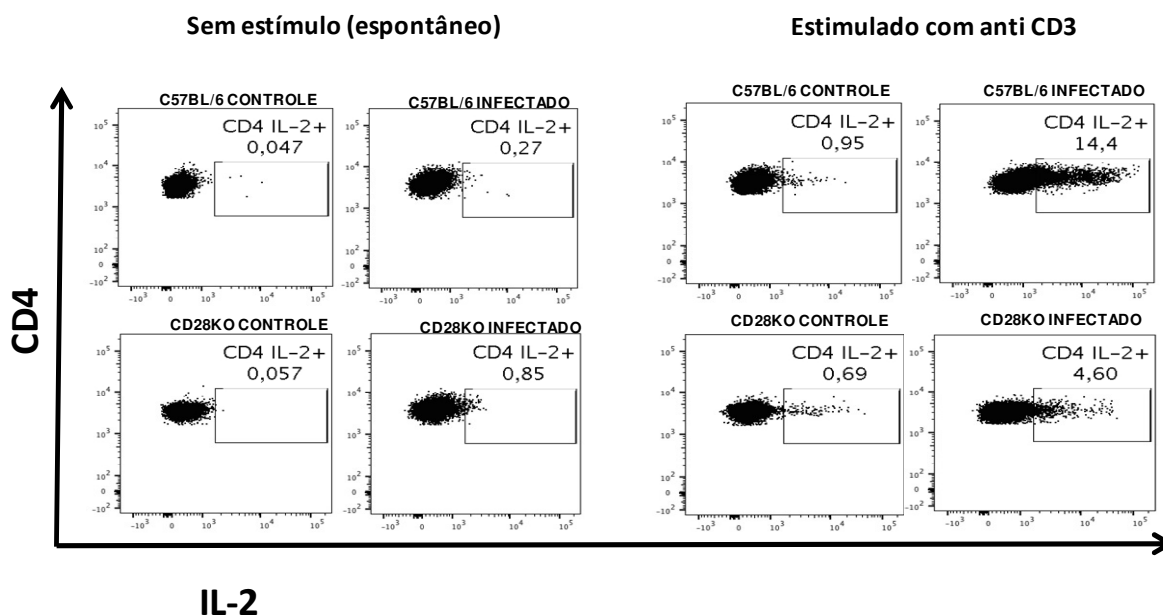


Figura 13 B

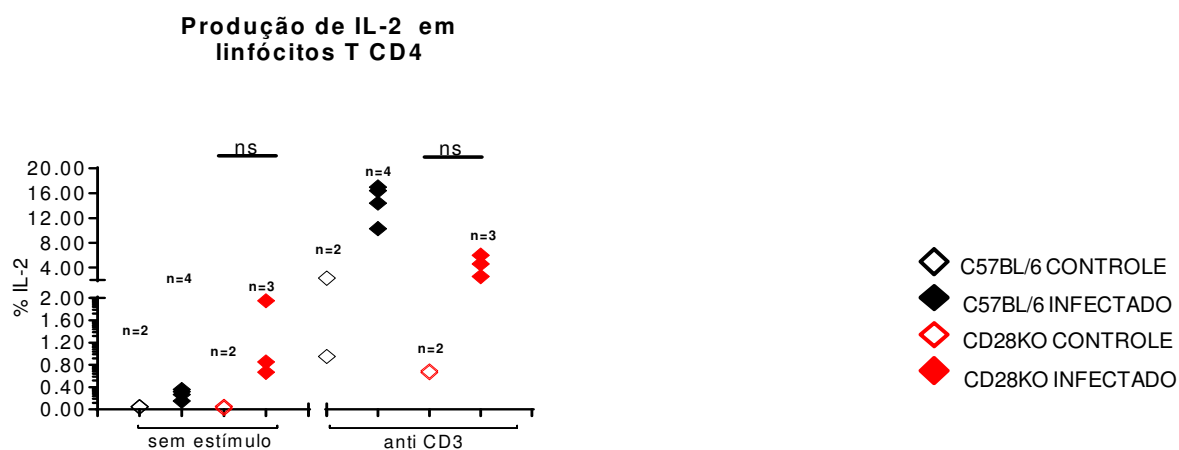


Figure 13. Produção de IL-2 por linfócitos T CD4 sem estímulo (espontâneo) e após estimulação com anti-CD3 no dia 15 de infecção por *T.cruzi* Sylvio X10/4.

Figura 13 A. Produção de IL-2 por linfócitos TCD4, sem estímulo (lado esquerdo), e após estímulo com anti-CD3 (lado direito), no baço de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados por 15 dias por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e respectivos grupos não infectados na seguinte ordem: C57BL/6 controle (superior

esquerdo), C57BL/6 infectado (superior direito), CD28KO controle (inferior esquerdo) e CD28KO infectado (inferior direito). Os gráficos mostram os níveis de IL-2 secretados, avaliados na superfície dos linfócitos CD4 após incubação *in vitro* dos esplenócitos com anticorpos com reatividade mista frente a IL-2R e IL-2, seguida de estimulação com anti-CD3 (ou não estimulados) e marcação final com os anticorpos conjugados com fluorocromos frente a CD4 e IL-2. A estatística de um (1) experimento é mostrada. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n \geq 2$; camundongos C57BL/6 infectados, $n \geq 4$; camundongos CD28KO não infectados, $n \geq 2$; camundongos CD28KO infectados, $n \geq 3$). Figura 13 B: Gráficos de pontos representativos para frequência de linfócitos T CD4 do baço e estatísticas de frequências Teste *T* não paramétrico de comparação do grupo CD28KO infectado com *T.cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, **, $P < 0,001$; e ns, não significativo.

Figura 14 A

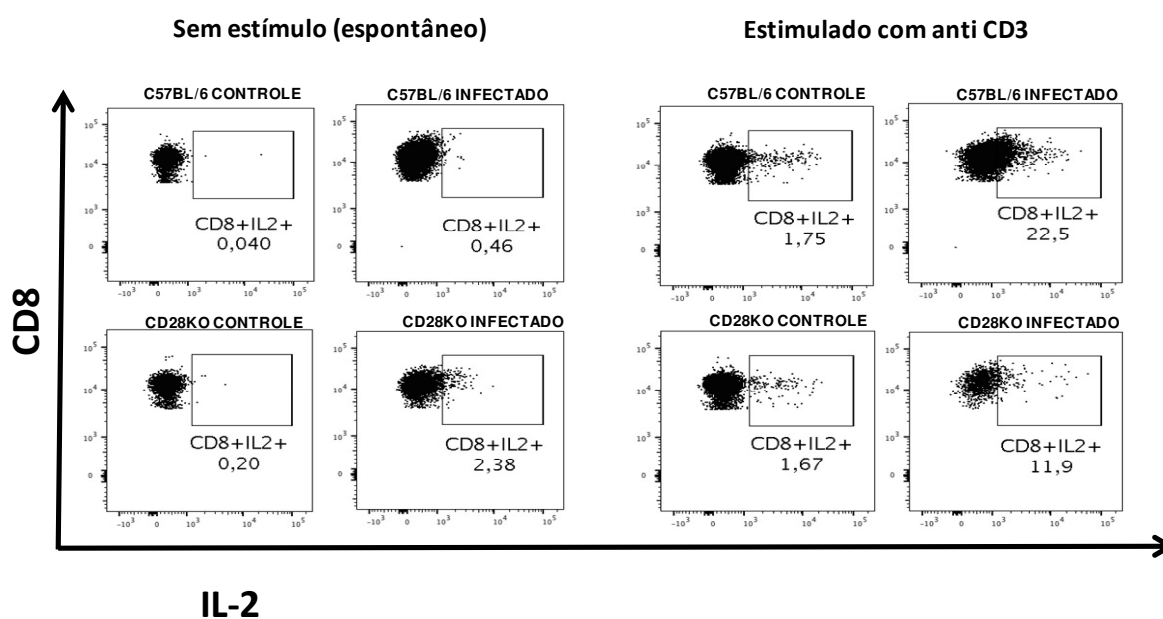


Figura 14 B

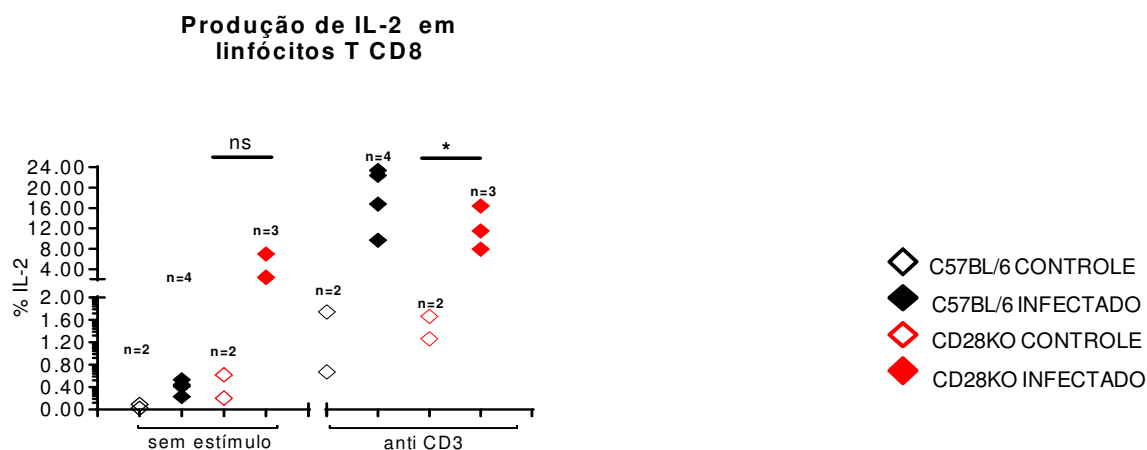


Figure 14. Produção de IL-2 por linfócitos T CD8 sem estímulo (espontâneo) e após estimulação com anti-CD3 no dia 15 de infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4. Figura 14 A. Produção de IL-2 por linfócitos TCD8, sem estímulo (lado esquerdo), e após estímulo com anti-CD3 (lado direito), no baço de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados por 15 dias por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e respectivos grupos não infectados na seguinte ordem: C57BL/6 controle (superior esquerdo), C57BL/6 infectado (superior direito), CD28KO controle (inferior esquerdo) e CD28KO infectado (inferior direito). Os gráficos mostram os níveis de IL-2 secretados, avaliados na superfície dos linfócitos CD8 após incubação *in vitro* dos esplenócitos com anticorpos com reatividade mista frente a IL-2R e IL-2, seguida de estimulação com anti-CD3 (ou não estimulados) e marcação final com os anticorpos conjugados com fluorocromos frente a CD8 e IL-2. A estatística de um (1) experimento é mostrada. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n \geq 2$; camundongos C57BL/6 infectados, $n \geq 4$; camundongos CD28KO não infectados, $n \geq 2$; camundongos CD28KO infectados, $n \geq 3$). Figura 14 B: Gráficos de pontos representativos para frequência de linfócitos T CD8 do baço e estatísticas de frequências Teste T não paramétrico de comparação do grupo CD28KO infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, **, $P < 0,001$; e ns, não significativo.

5.9. Análise de produção de IFN- γ por linfócitos TCD4 e TCD8.

Neste ensaio experimental foram utilizados quatro grupos distintos de camundongos, com idade aproximada de seis a oito semanas, das linhagens CD28KO (grupo infectado com *T.cruzi* X10/4 e grupo não infectado) e C57BL/6 (grupo infectado com *T.cruzi* X10/4 e grupo não infectado). O ensaio experimental foi realizado no dia quinze de infecção.

O objetivo desse experimento foi verificar a produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4 e TCD8 dos camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Nesse experimento foi utilizado o inoculo de 5×10^6 parasitas por camundongo e os animais foram sacrificados no dia 15 de infecção.

A dosagem de IFN- γ em cultura de linfócitos de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados estimulados com anti-CD3 revelou, em ambas as linhagens, níveis equivalentes desta citocina nos linfócitos TCD4 (figura 14 A, lado direito), assim como nos linfócitos TCD8 (figura 15 A, lado direito). Na análise comparativa entre os grupos CD28KO e C57BL/6 infectados e estimulados com anti-CD3 a produção desta citocina não mostrou diferenças significativas.

Figura 15 A

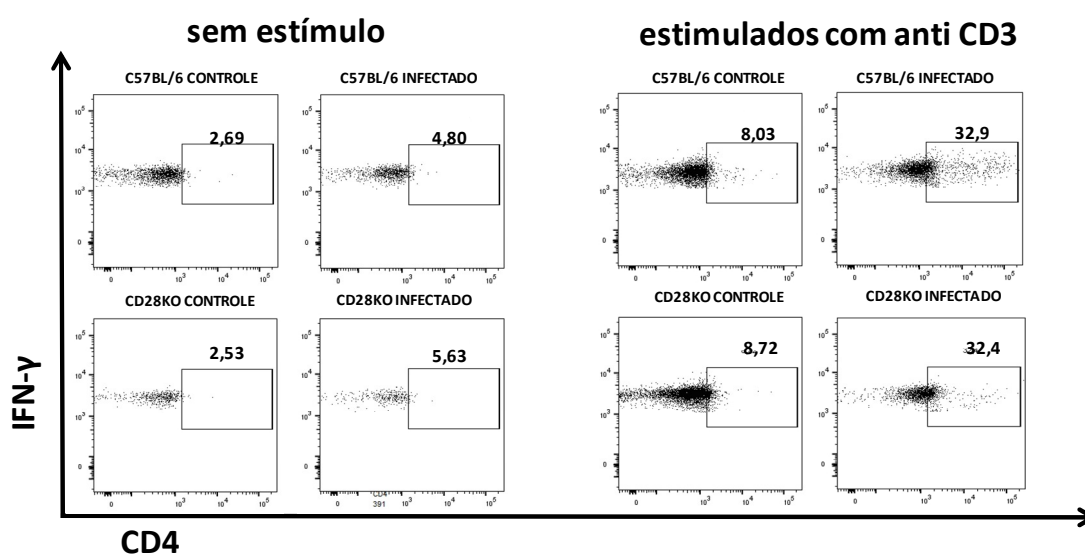


Figura 15B

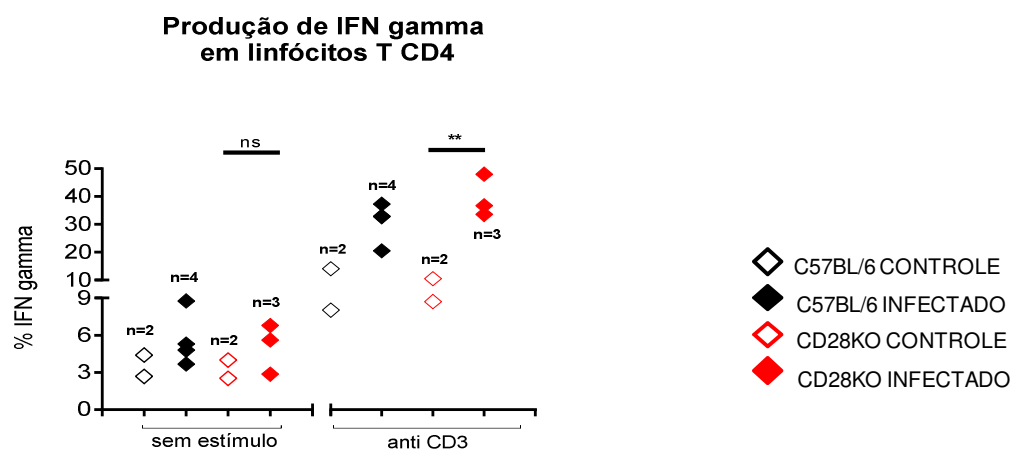


Figure 15. Produção de IFN- γ por linfócitos T CD4 esplênicos, sem estímulo (espontâneo) e após estímulo com anti-CD3 por 6 horas, na infecção por *T.cruzi* Sylvio X10/4. Gráficos representativos da produção de IFN- γ em linfócitos T CD4 em cultura por seis horas com anti-CD3 e sem estímulo, de camundongos CD28KO e C57BL/6 não infectados e infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. A figura 15 A mostra do lado esquerdo os gráficos da produção de IFN- γ de culturas sem estímulo e do lado direito os gráficos da produção de IFN- γ de culturas com estímulo de anti-CD3, na seguinte ordem: C57BL/6 controle (superior esquerdo), C57BL/6 infectado (superior direito), CD28KO controle (inferior esquerdo) e CD28KO infectado (inferior direito). Os gráficos indicam respectivamente, o percentual da expressão de IFN- γ pelos camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados com 5×10^6 *T. cruzi* Sylvio X10/4 no dia 15 de infecção e respectivos controles não infectados. A estatística de um experimento é mostrada. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n = 2$; camundongos C57BL/6 infectados, $n = 4$; camundongos CD28KO não infectados, $n = 2$; camundongos CD28KO infectados, $n = 3$). Figura 15 B: Gráficos de pontos representativos para frequência de linfócitos T CD4 do baço e estatísticas de frequências Teste *T* não paramétrico de comparação do grupo CD28KO infectado com *T.cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; e ns, não significativo.

Quando é analisada a produção de IFN- γ em linfócitos T CD4 e CD8 não estimulados com anti-CD3, conclui-se uma menor expressão tanto nas TCD4 (Figura 14 A, lado esquerdo) quanto nas TCD8 (Figura 15 A, lado esquerdo) em relação à dos grupos contendo o estímulo. Por outro lado, na ausência de re-estimulação *in vitro* com anti-CD3, a frequência de células produtoras de IFN- γ nas populações CD4 (Figura 14 A,

lado esquerdo) e CD8 (Figura 15 A, lado esquerdo) dos camundongos C57BL/6 e CD28KO não infectados foi inferior à observada nestas populações dos grupos correspondentes infectados.

Figura 16 A

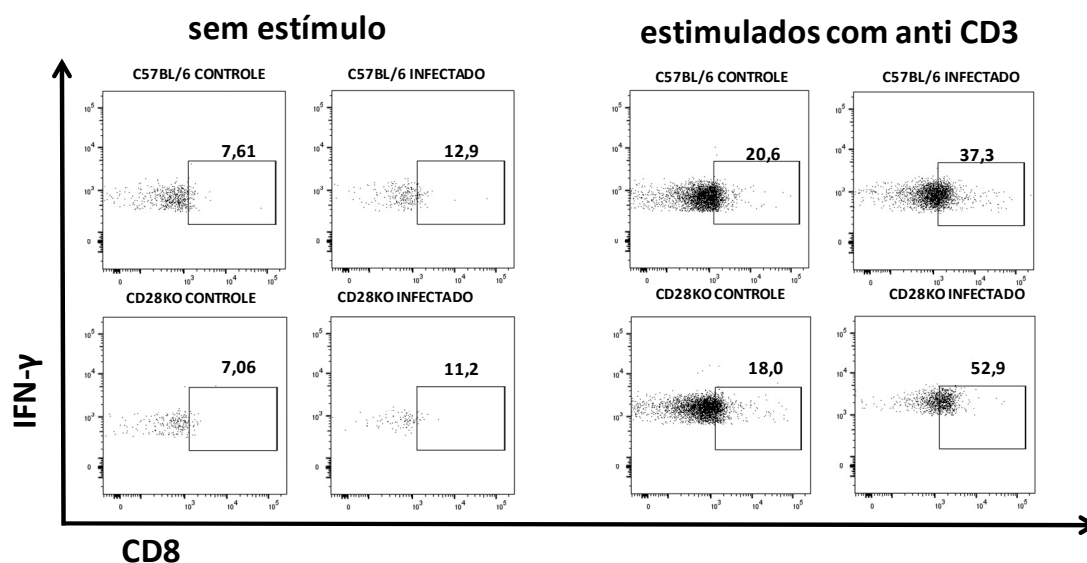


Figura 16B

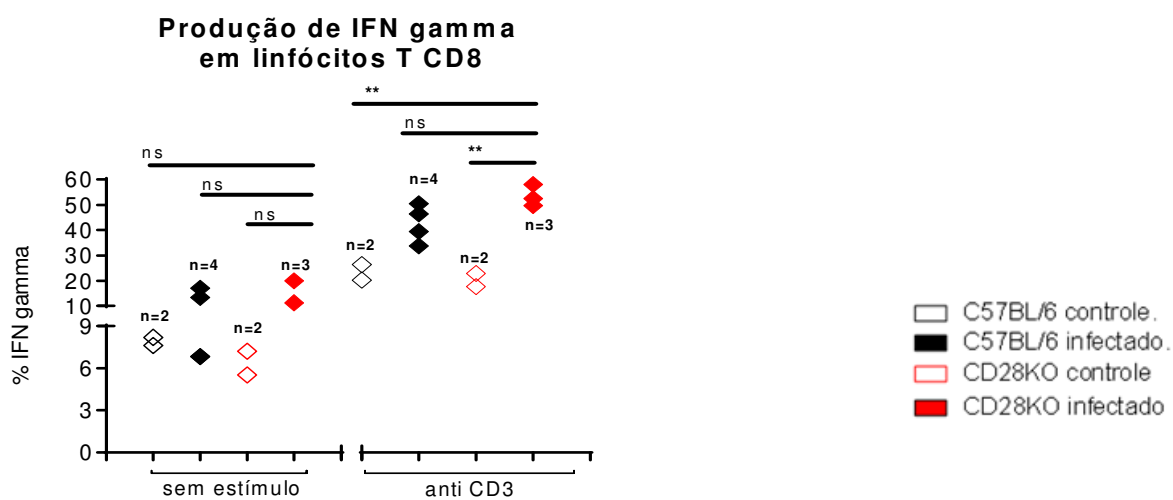


Figure 16. Produção de IFN- γ por linfócitos T CD8 sem estímulo (espontâneo) e após estímulo com anti-CD3 por 48 horas na infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4. Gráficos representativos da produção de IFN- γ em linfócitos T CD8 em cultura por seis horas com anti-CD3 e sem estímulo, de camundongos CD28KO e C57BL/6 não infectados e infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. A figura 16 A mostra do lado esquerdo os gráficos da produção de IFN- γ de culturas sem estímulo e do lado direito os gráficos da produção de IFN- γ de culturas com estímulo de anti-CD3, na seguinte ordem: C57BL/6 controle (superior esquerdo), C57BL/6 infectado (superior direito), CD28KO controle (inferior esquerdo) e CD28KO infectado (inferior direito). Os gráficos indicam respectivamente, o percentual da expressão de IFN- γ pelos camundongos C57BL/6 e CD28KO infectados com 5×10^6 *T. cruzi* Sylvio X10/4 no dia 15° de infecção e respectivos controles não infectados. A estatística de um experimento é mostrada. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n = 2$; camundongos C57BL/6 infectados, $n = 4$; camundongos CD28KO não infectados, $n = 2$; camundongos CD28KO infectados, $n = 3$). Figura 16 B: Gráficos de pontos representativos para frequência de linfócitos T CD8 do baço e estatísticas de frequências Teste *T* não paramétrico de comparação do grupo CD28KO infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; e ns, não significativo.

5.10. A infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 não induz a formação de linfócitos T auxiliares foliculares (TFH, do inglês “Follicular Helper T cells”) no baço do camundongo CD28KO.

Na análise por citometria de fluxo dos linfócitos TFH esplênicos realizamos marcação com anticorpos ligados a fluorocromos frente a molécula CD4, para analisar essa população de Linfócitos T, assim como anticorpos frente a PD-1 e CXCR5 que permitem caracterizar a subpopulação de linfócitos T auxiliares foliculares (CD4+PD-1^{High}CXCR5^{High}). Após análise por citometria de fluxo, verificou se que era possível notar a formação de células T foliculares auxiliares (TFH), utilizando camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 num período entre o dia 14 até 25 dias de infecção de inoculo com 5×10^6 via intravenosa (i.v). Uma vez que a infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 cursa com parasitemia subpatente (não detectável pela observação do sangue no microscópio), experimentos prévios tiveram que ser realizados em camundongos infectados com *T. cruzi* da cepa Y para verificar qual o tamanho do inóculo de *T. cruzi* suficiente para gerar a uma população TFH claramente visível, sem resultar na morte dos animais. Na análise destes experimentos ficou

evidente que a formação de células TFH esplênicas ocorre na fase aguda após inóculo de 5×10^6 parasitas/camundongo. Utilizando esta dose de foi possível identificar que o camundongo CD28KO infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4 não induz geração de células TFH, enquanto que, no camundongo C57BL/6 (WT) infectado, a população TFH é claramente visível.

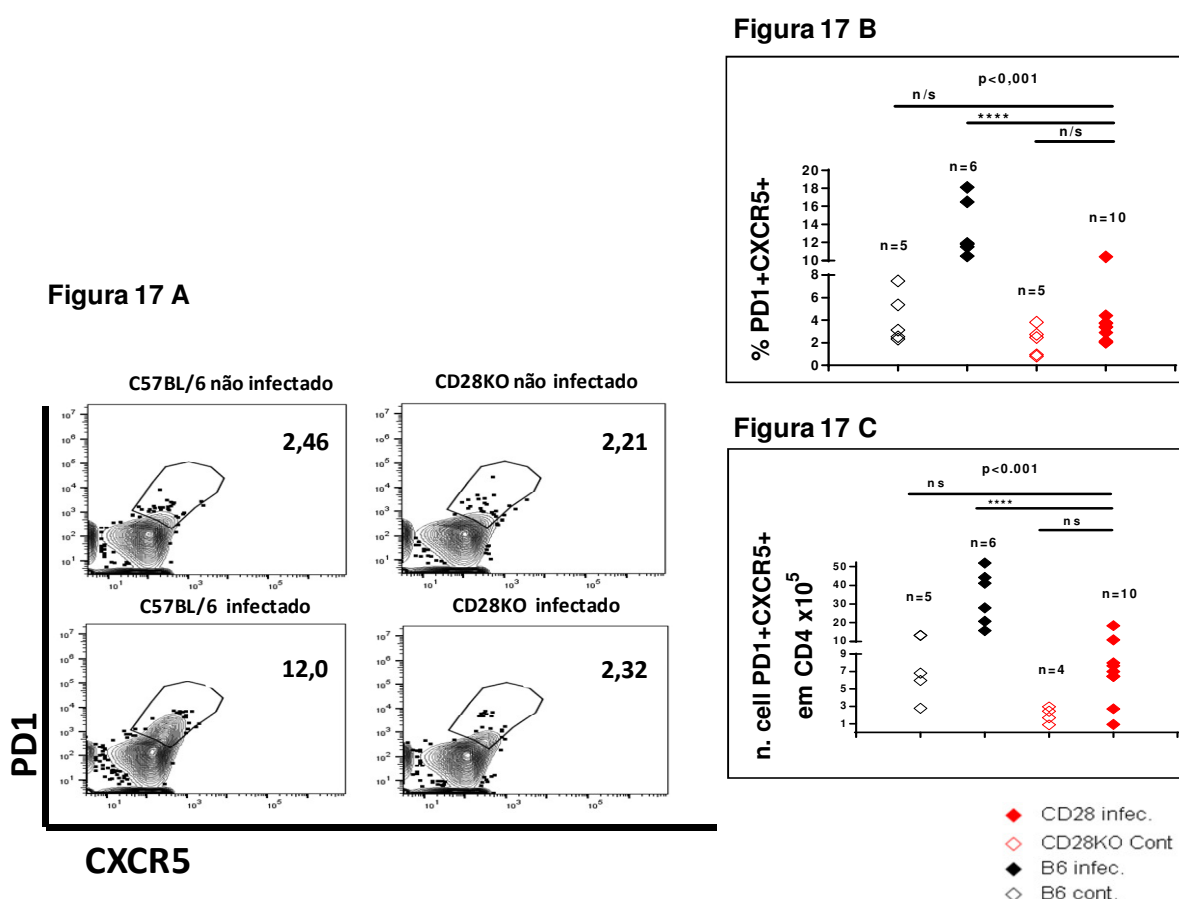


Figure 17. Análise de células TFH em camundongos CD28KO infectados pelo *T.cruzi* Sylvio X10/4. Gráficos representativos das células T Foliculares Auxiliares (TFH) utilizando os marcadores PD1 e CXCR5 na janela dos linfócitos CD4+, em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados com 5×10^6 *T. cruzi* Sylvio X10/4 e seus respectivos controles CD28KO e C57BL/6 não infectados. A figura 17 A mostra a subpopulação de células TFH no grupo C57BL/6 infectado (inferior esquerdo), enquanto que os demais grupos, inclusive o CD28KO infectado, não apresentam uma subpopulação TFH evidente. Figura 17 B e 17 C: Os gráficos indicam respectivamente, a frequência e o número de células TFH no baço de camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados com 5×10^6 *T. cruzi* Sylvio X10/4 no dia 16 de infecção e

respectivos controles não infectados. A estatística de um experimento representativo é mostrada. Média (camundongos C57BL/6 não infectados, $n = 5$; camundongos C57BL/6 infectados, $n = 6$; camundongos CD28KO não infectados, $n = 5$; camundongos CD28KO infectados, $n = 10$). Teste One Way Anova. ****, $P < 0,001$; ns, não significativo.

A análise dos resultados mostrados indica que, mesmo utilizando uma dose elevada de *T. cruzi* Sylvio x10/4 (5×10^6 parasitas i.v), a geração de células TFH não ocorre no baço dos camundongos CD28KO infectados. Conclui se que não possuem capacidade para tal geração, enquanto esta ocorre no camundongo C57BL/6 (WT) igualmente infectado. Desta forma, o conjunto das experiências permite concluir que independentemente do tamanho do estímulo, os camundongos deficientes da molécula co-estimulatória CD28 não formam (ou formam números não detectáveis) de linfócitos T foliculares auxiliares em resposta à infecção pelo *T. cruzi*.

5.11. A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/4 no camundongo CD28KO não induz células B de centros germinativos (“GC-B cells”) esplênicas.

Visando avaliar por citometria de fluxo a presença de células B de centro germinativo (GCs-B cells) no baço de camundongos WT e CD28KO infectados pelo *T. cruzi*, realizamos marcação com anticorpos ligados a fluorocromos frente a CD19 (para análise de linfócitos B), CD138 (para análise de plasmócitos), assim como frente a FAS e GL7, de forma a caracterizar a subpopulação de linfócitos B de centro germinativo que possuem o fenótipo $CD19^+CD138^-GL7^{High}Fas^{High}$. Verificamos que camundongos CD28KO infectados pela via endovenosa com inoculo de 5×10^6 parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* não geram células B do centro germinativo, enquanto que camundongos C57BL/6 (WT) igualmente infectados geram uma expressiva subpopulação destes linfócitos B. Como indicado, nestes experimentos utilizamos uma dose elevada de *T. cruzi* Sylvio X10/4, uma vez que na dose normalmente utilizada não conseguíamos gerar/visualizar um número elevado de células GC-B no camundongo

C57BL/6. Um resultado negativo no grupo de camundongos C57BL/6 infectados com uma dose menor de parasitas invalidaria tecnicamente o experimento, uma vez que não dá para se esperar geração de GCs no CD28KO quando no controle C57BL/6 não os detectamos.

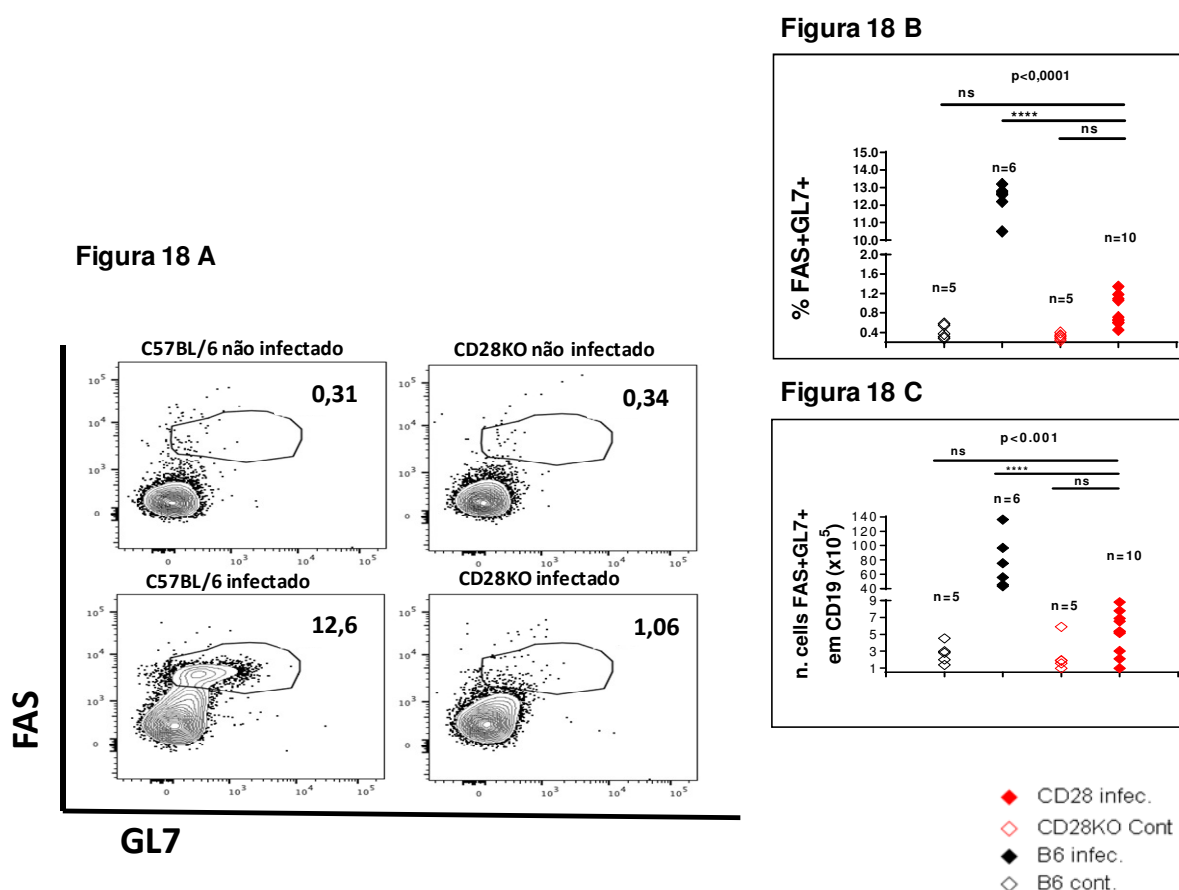


Figure 18. Análise da geração de células B de centros germinativos. Gráficos representativos da presença de células B do Centro Germinativo (“GCs B cells”), identificadas pela expressão dos marcadores FAS e GL7 na janela de células B (CD19+CD138-), analisados no baço de camundongos CD28KO e C57BL/6 no dia 16 de infecção com 5×10^6 *T. cruzi* Sylvio X10/4 e respectivos controles não infectados. A figura 18 A mostra a presença de uma população de células B do centro germinativo no grupo C57BL/6 infectado (inferior esquerdo), população GC-B que não é patente nos grupos controles não infectados, e grupo CD28KO infectado. Figura 18 B e 18 C: Gráficos indicando respectivamente, a frequência e o número de células GCs B em camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados com 5×10^6

parasitas *T. cruzi* Sylvio X10/4 e seus respectivos controles CD28KO e C57BL/6 não infectados. A estatística de um experimento representativo é mostrada nos gráficos 18B e 18C. Média de camundongos C57BL/6 não infectados, ($n=5$); camundongos C57BL/6 infectados, ($n=6$); camundongos CD28KO não infectados, ($n=5$); e camundongos CD28KO infectados, ($n=10$). Os gráficos de pontos (dot plot) representativos para frequência de células B do centro germinativo (CD19⁺CD138-GL7^{High}Fas^{High}) em células do baço e estatísticas das frequências e números totais. Teste One Way Anova. ****, $P < 0,001$; ns, não significativo.

5.12. Análise de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro.

A infecção pelo *T. cruzi*, promove, tanto em humanos como em camundongos normo-imunes, a ativação de linfócitos T e a geração de uma resposta humoral mediada pelos linfócitos B. Como já mencionado, em trabalho anterior camundongos CD28KO mostraram-se altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* de alta virulência cepa Y (MARTINS et al.,2004), levando-os à morte em poucos dias. Como contraponto, um trabalho preliminar do nosso grupo mostrou que quando estes camundongos são infectados pelo *T. cruzi* de baixa virulência Sylvio X10/4, eles sobrevivem por um período extenso (MARINHO et al.,2007). No presente trabalho, temos analisado a resposta humoral induzida na infecção por este último isolado do *T. cruzi*. As análises foram realizadas após diferentes tempos de infecção, visando avaliar, na resposta humoral, tanto a produção específica de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG, assim como a existência de ativação policlonal.

5.12.1. A infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4 estimula a ativação policlonal de anticorpos de classe IgM.

Utilizando o ensaio de ELISA verificou-se que os soros de camundongos CD28KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 iniciam a resposta humoral, com produção de anticorpos da classe IgM em forma semelhante aos camundongos C57BL/6 selvagens infectados pelo *T. cruzi* da cepa Y.

Para estas análises foram utilizados soros de camundongos C57BL/6 selvagens infectados com *T. cruzi* cepa Y (alta virulência), soro de camundongos CD28-deficientes infectados com *T. cruzi* cepa Sylvio x10/4, soro de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium Yoelii*, além de soro de animais C57BL/6 não infectados. Na sensibilização das placas foram utilizados antígenos de *T. cruzi* cepa Y; *T. cruzi* cepa Sylvio X10/4 e *P. Yoelii*, além de amostragens sem sensibilização (s/Ag) como controle da reatividade frente ao bloqueio.

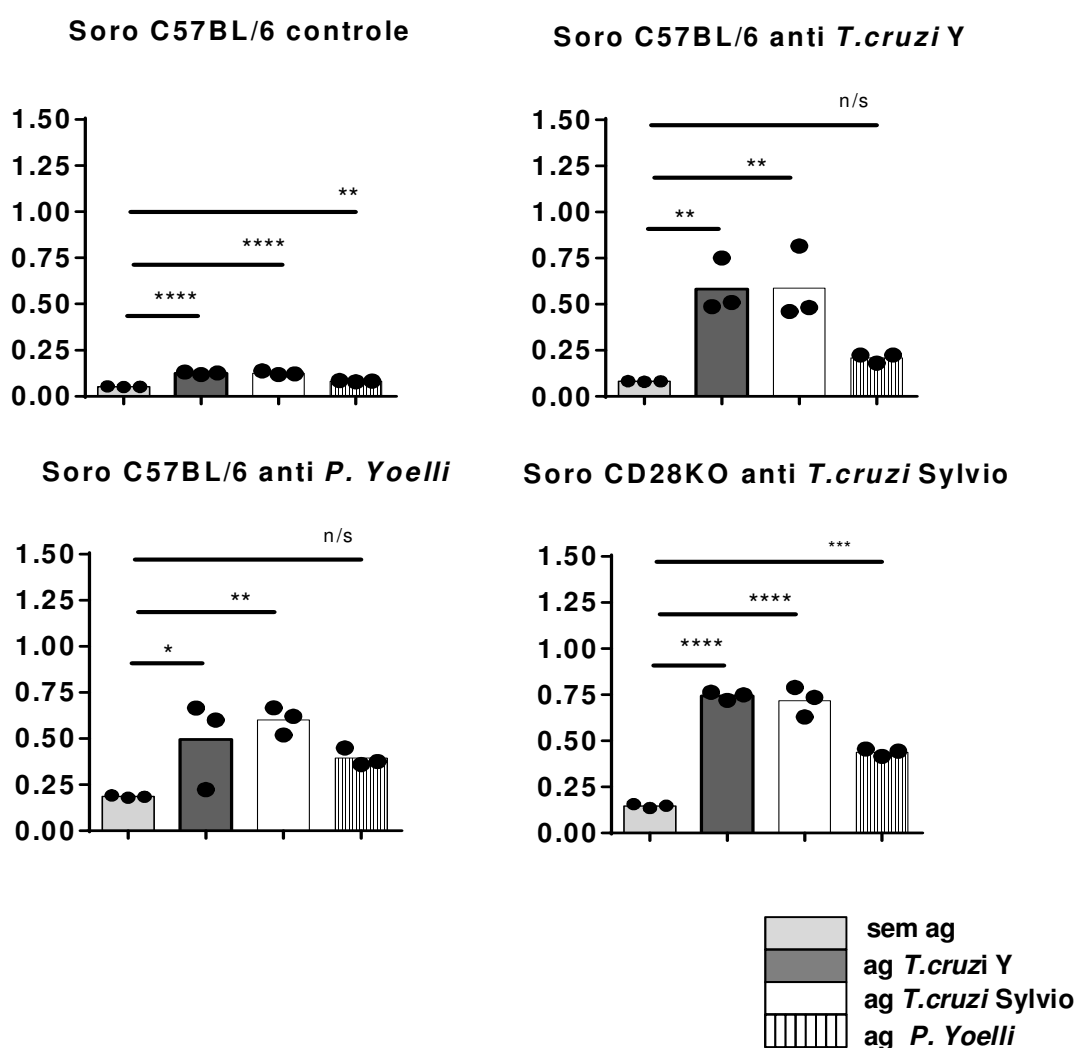


Figure 19. Reatividade sérica (revelada por ELISA) dos anticorpos da classe IgM. Reatividade sérica (revelada por ELISA) de anticorpos da classe IgM frente ao bloqueio (sem antígeno: sem ag),

antígeno de *T. cruzi* cepa Y (ag *T. cruzi* Y), antígeno de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (ag *T. cruzi* Sylvio), e antígeno de *P. Yoelii*, (ag *P. Yoelii*) de soros, diluídos 1/30, procedentes de camundongos C57BL/6 controle (não infectados), camundongos C57BL/6 infectados por 15 dias com *T. cruzi* cepa Y, camundongos CD28KO infectados por 60 dias com *T. cruzi* Sylvio X10/4, e camundongos C57BL/6 infectados por 14 dias com *Plasmodium Yoelii*. Estatísticas deste experimento foram realizadas. Teste *Anova* de comparação múltipla em relação à reatividade basal frente ao bloqueio. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, p <0,0001 e n/s (não significativo).

Na sensibilização das placas foram utilizados extratos antigênicos de *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Sylvio X10/4 ou *Plasmodium Yoelii*. Amostras não sensibilizadas com antígeno de parasitas, mas contendo unicamente o bloqueio, foram também incluídos como referência do basal de reatividade (background). A reatividade IgM de todos os soros testados não distinguiu em forma diferente os extratos antigênicos de *T. cruzi* Y e Sylvio X10/4.

Os soros de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* da cepa Y mostraram alta e similar reatividade de anticorpos da classe IgM frente aos antígenos de *T. cruzi*-Y e *T. cruzi* Sylvio X10/4, e uma reatividade menor frente ao antígeno de *P. Yoelii*.

Já os soros dos camundongos infectados por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e aqueles dos camundongos infectados por *P. Yoelii* mostraram reatividade IgM similar frente aos antígenos de *T. cruzi*-Y, *T. cruzi*-Sylvio X10/4 e algo inferior para *P. Yoelii*.

No seu conjunto os nossos resultados mostram uma ampla reatividade por anticorpos da classe IgM, frente aos diferentes extratos parasitários, nos soros (diluídos 1/30) dos três grupos de animais infectados.

A reatividade dos soros frente aos outros extratos antigênicos diferentes do parasita indutor poderia ser o resultado de uma reação cruzada (principalmente no caso da reatividade aos extratos *T. cruzi* Y e *T. cruzi* Sylvio X10/4), e/ou resultado da ativação policlinal das células B.

5.12.2. A infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4 estimula a ativação policlinal para anticorpos da classe IgG.

Através de ensaios de ELISA, verificou-se que os camundongos CD28 deficientes infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 são capazes de induzir uma resposta humoral da

classe IgM específica frente ao *T. cruzi*. Porém não se sabe, neste modelo, se ocorre uma produção para anticorpos de classe IgG específicos frente a este parasita.

Para avaliar esta questão foram utilizados soros de camundongos selvagens (C57BL/6) infectados com *T. cruzi* Y, soro de camundongos CD28 deficientes infectados com *T. cruzi* Sylvio x10/4, soro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. Yoelli*, além de soro de animais C57BL/6 não infectados. Na sensibilização da placa foram utilizados antígenos de *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Sylvio X10/4, *P. Yoelli*, além de amostras sem sensibilização, mas contendo o bloqueio, como controle.

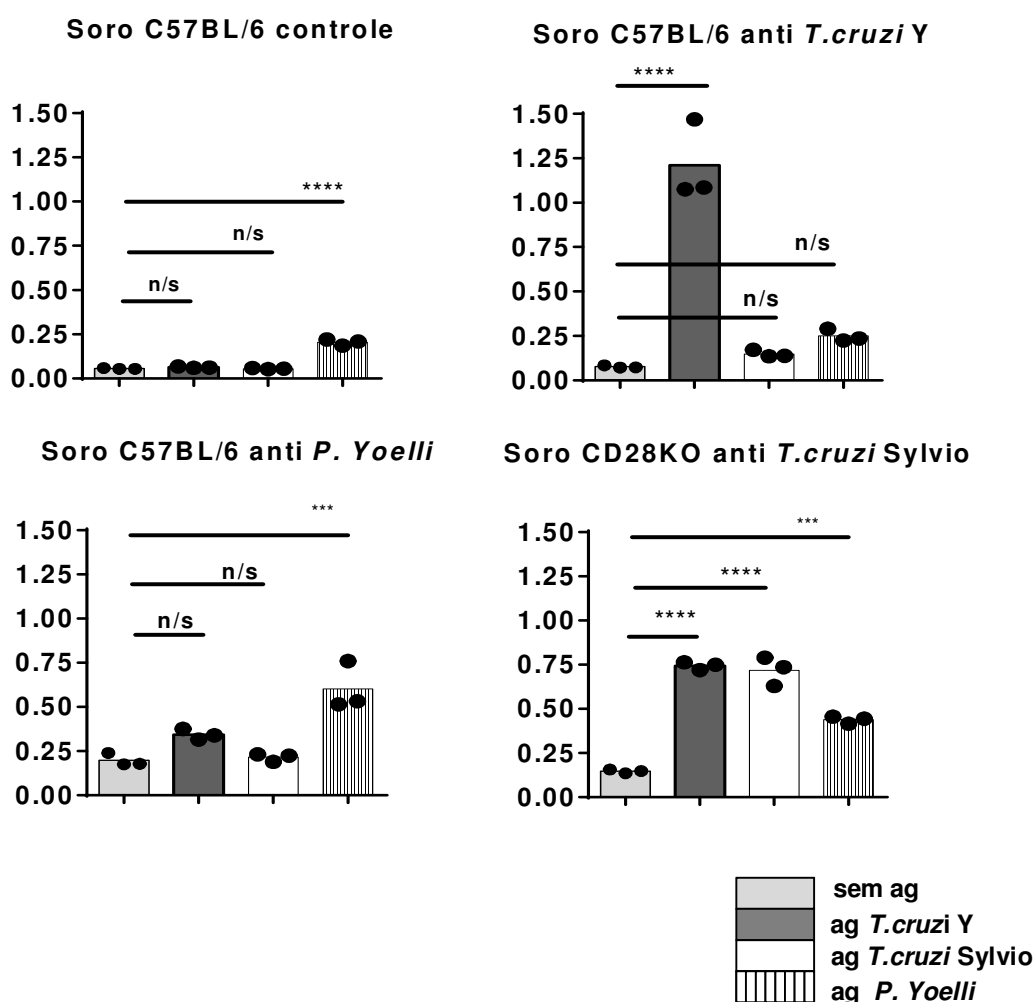


Figure 20. Reatividade sérica (revelada por ELISA) dos anticorpos da classe IgG. Resultados por ELISA indireto mostrando a reatividade IgG2c frente ao bloqueio (sem antígeno), antígeno de *T. cruzi* cepa Y, antígeno de *T. cruzi* Sylvio X10/4, e antígeno de *Plasmodium Yoelii*, no qual foram utilizados soros de camundongos C57BL/6 WT (selvagens) infectados por 15 dias com *T. cruzi* cepa Y (alta virulência), de camundongos CD28 deficientes infectados por 60 dias com *T. cruzi* cepa Sylvio x10/4, e de camundongos C57BL/6 WT infectados por 14 dias com *Plasmodium Yoelii*, além de soros de animais C57BL/6 WT não infectados. Estatísticas foram realizadas. Teste *Anova* de comparação múltipla com o soro controle sem antígeno. ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ e ns, não significativo, para os gráficos com os soros de camundongos C57BL/6 infectados respectivamente com *T. cruzi* Cepa Y, camundongos C57BL/6 infectados com *P. Yoelii* e camundongos CD28KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4.

A análise dos soros de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* Y mostra alta reatividade IgG com antígenos da cepa Y de *T. cruzi*, e reatividades muito inferiores, porém visíveis, frente aos antígenos de *T. cruzi* Sylvio X10/4 e *P. Yoelii*. Entretanto, na análise da IgG nos soros dos camundongos CD28KO infectados por *T. cruzi* Sylvio X10/4, os resultados mostram uma reatividade menor (porém significativa) e similar frente aos antígenos de *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Sylvio X10/4 e algo menor para *P. Yoelii*. Estes resultados indicam que, caso exista produção de IgG *T. cruzi*-específica no camundongo CD28KO infectado por parasitas Sylvio X10/4, esta provavelmente ocorre em pouca quantidade.

Finalmente, na análise da reatividade IgG no soro dos camundongos infectados por *P. Yoelii*, o resultado mostra reatividade frente a antígeno de *P. Yoelii* superior à observada frente aos antígenos de *T. cruzi* da cepa Y ou Sylvio X10/4, que não difere da reatividade frente ao bloqueio.

5.12.3. A infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4 em animais CD28KO exhibe produção de anticorpos da classe IgM frente ao parasita no decorrer da infecção.

A reatividade sérica IgM frente ao *T. cruzi* Sylvio X10/4 foi estimada em soros de camundongos em diferentes tempos de infecção (16, 47, 64, 69 e 177 dias pós-infecção). Nos experimentos com 64 e 177 DPI temos unicamente soros de camundongos B6 e CD28KO infectados, enquanto que naqueles de 16, 47 e 69 DPI os

soros são de animais C57BL/6 controle, C57BL/6 infectados, CD28KO controle e CD28KO infectados. Para sensibilização da placa utilizou-se antígeno de *T. cruzi* cepa Sylvio X10/4.

Figura 21 A.

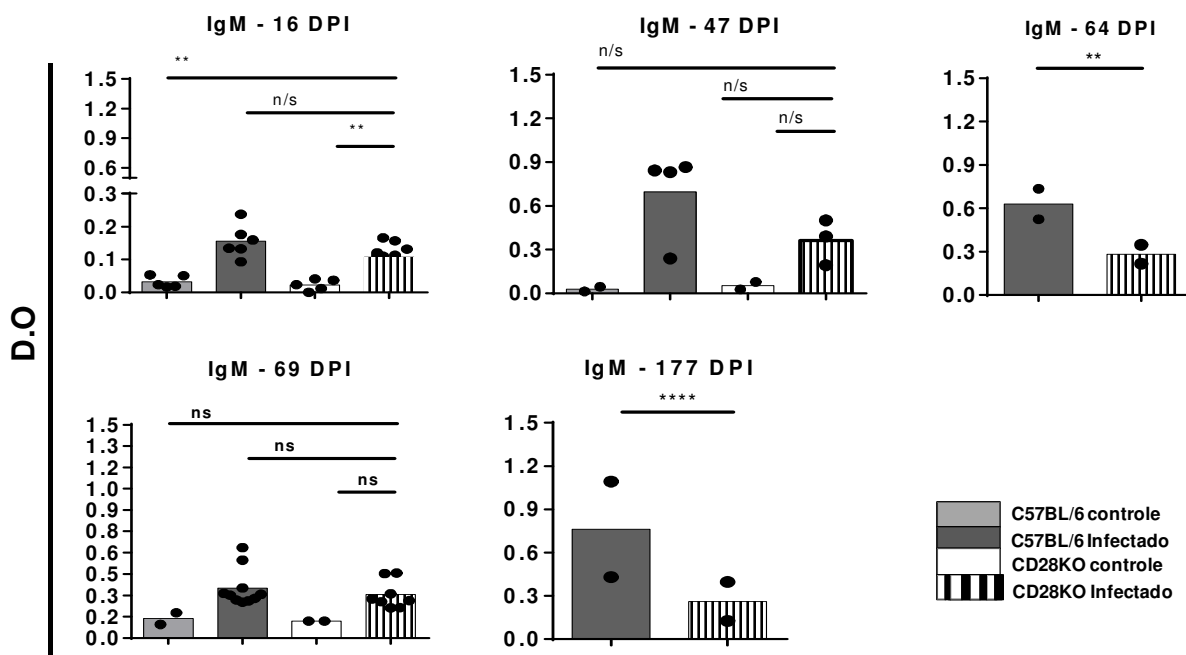


Figura 21 B.

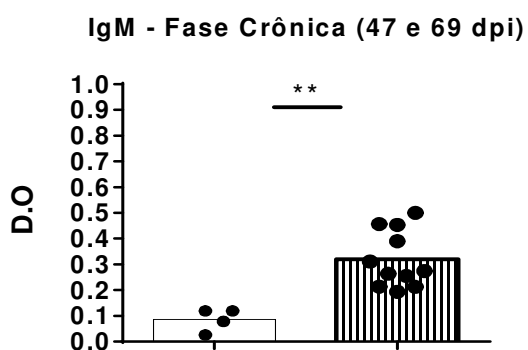


Figure 21. Níveis séricos de anticorpos IgM (revelados por ELISA indireto) na infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 em diferentes tempos de infecção. Os tempos de infecção foram 16, 47, 64, 69 e 177 dias. Na figura 21 A os soros dos grupos C57BL/6 Infectados e CD28KO Infectados são mostrados (em diferentes momentos da infecção) em comparação, com os respectivos soros CD28KO e C57BL/6 controles, quando presentes. Na figura 21 B o conjunto dos grupos de camundongos CD28KO Infectados por 47 e 69 dias são mostrados em um único gráfico, para comparação, com os respectivos soros CD28KO e C57BL/6 controles (dos experimentos dos dias 47 e 69). Os resultados finais de DO, mostrados nos gráficos, foram obtidos subtraindo o valor da Densidade Óptica (D.O.) de cada soro frente ao bloqueio, da respectiva D.O. obtida frente ao antígeno de *T. cruzi* (que inclui a reatividade ao *T. cruzi* + bloqueio). Cada bolinha representa a média aritmética de triplicatas de um determinado soro. Estatísticas de experimentos independentes foram realizadas Teste *Anova* de comparação múltipla (Figura 21 A). **, P <0,01; ****, p <0,0001 e ns, não significativo, para o grupo CD28KO infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4 em relação aos outros grupos e Teste *T* não paramétrico (Figura 21 B) de comparação do grupo CD28KO infectado com *T. cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, **, P <0,001; e ns, não significativo.

Na fase aguda da infecção, dia 16 dpi, verificou-se que os soros de camundongos CD28KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 tendem a iniciar a resposta humoral regular frente ao parasita, ou seja, sem prejuízo na produção de anticorpos de fase aguda no início da infecção. Assim, a figura 21 A mostra que a produção de IgM *T. cruzi*-específica está aumentada nos grupos infectados em relação aos não infectados, tanto nos camundongos CD28KO quanto aos animais C57BL/6 infectados. Contudo, apesar de animais CD28KO infectados mostrarem uma boa taxa de IgM, esta é frequentemente inferior à dos animais C57BL6 infectados.

Ainda, analisando a produção de IgM *T. cruzi*-específica exclusivamente no conjunto dos camundongos CD28KO dos experimentos dos dias 47 e 69 dpi, infectados e não infectados, é possível verificar que a produção de IgM é significativamente maior nos camundongos infectados em relação à dos camundongos não infectados (figura 21 B). Esse resultado sugere a resposta regular dos camundongos CD28KO na produção de IgM parasita-específica.

5.12.4. A infecção crônica por *T. cruzi* Sylvio X10/4 nos animais CD28KO apresenta uma baixa produção de anticorpos parasita-específicos da subclasse IgG2c, que é entretanto superior, à observada nos camundongos CD28KO não infectados.

Soros dos camundongos infectados de experimentos independentes, eutanasiados em tempos diferentes, foram avaliados na sua reatividade IgG2c frente a antígeno *T. cruzi* Sylvio X10/4. Os resultados são mostrados nos gráficos da figura 22 A de acordo ao tempo de infecção: 16, 47, 64, 69 e 177 DPI (dias pós-infecção). Os experimentos dos dias 16, 47 e 69 incluem subgrupos C57BL/6 controle, C57BL/6 infectado, CD28KO controle e CD28KO infectado, enquanto que os experimentos 64 DPI e 177 DPI incluem unicamente grupos infectados.

Figura 22 A.

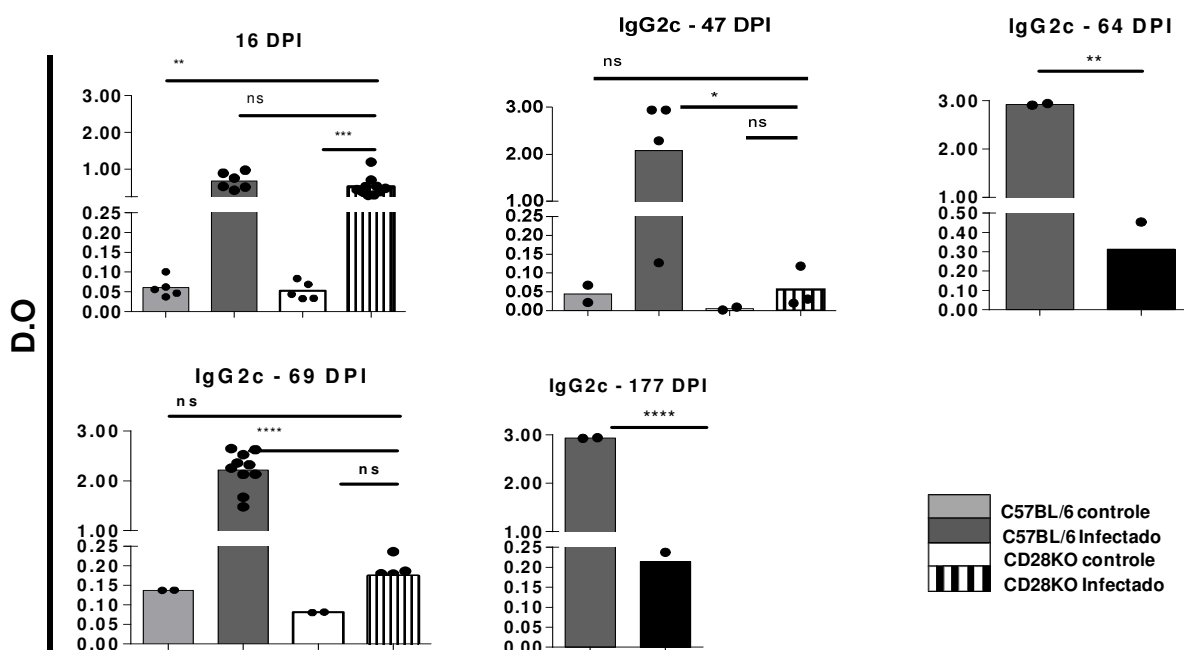


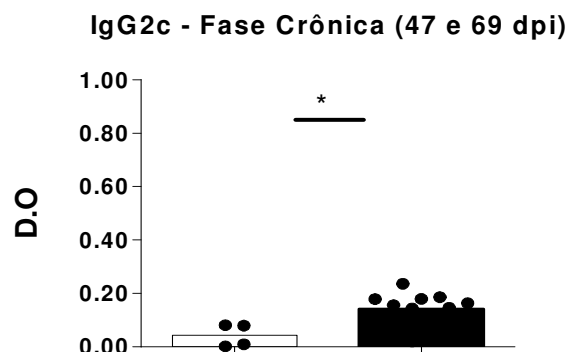
Figura 22 B.

Figure 22. Níveis séricos de anticorpos IgG2c em diferentes tempos de infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. . Na figura 22 A são mostrados os gráficos de reatividade por ELISA indireto exibindo os níveis de IgG2c séricos frente a antígeno de *T. cruzi* Sylvio X10/4 em grupos de camundongos C57BL/6 e CD28KO com diferentes tempos de infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Os tempos de infecção foram 16, 47, 64, 69 e 177 DPI. Quando existentes, grupos não infectados (C57BL/6 Controles e CD28KO controles) foram incluídos no estudo. Os resultados finais de DO, mostrados nos gráficos, foram obtidos subtraindo o valor da Densidade Óptica (D.O.) de cada soro frente ao bloqueio, da respectiva D.O. obtida frente ao antígeno de *T.cruzi* (que inclui a reatividade ao *T. cruzi* + bloqueio). Cada bolinha representa a média aritmética de triplicatas de um determinado soro. Estatísticas de experimentos independentes foram realizadas. Teste *Anova* de comparação múltipla (Figura 22 A) do grupo CD28KO infectado com *T.cruzi* Sylvio X10/4 em relação aos outros grupos.. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001; ****, p <0,0001 e ns, não significativo, para os soros de camundongos dos grupos CD28KO infectados com *T.cruzi* Sylvio X10/4 e Teste *T* não paramétrico de comparação do grupo CD28KO infectado com *T.cruzi* Sylvio X10/4 em relação ao grupo CD28KO não infectado (Figura 22B) . *, P <0,05; **, P <0,01; ***, **, P <0,001; e ns, não significativo.

Observamos na figura 22 A que, excetuando o experimento do dia 16 de infecção que mostra uma produção de IgG2c dos camundongos CD28KO infectados muito equivalente ao dos camundongos C57BL/6 infectados, na fase crônica (dias 47 a 177), o nível sérico de IgG2c no soro dos camundongos C57BL/6 infectados se apresenta muito superior ao observado nos camundongos CD28KO infectados, sugerindo um impacto que prejudica a produção regular de IgG2c em animais CD28KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4. Contudo, é relevante mencionar que os soros de

camundongos CD28KO cronicamente infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 (soros dos dias 47 e 69 dpi compilados) mostraram IgG2c frente ao parasita significativamente superiores aos dos camundongos CD28KO não infectados (Figura 22B).

6. Discussão.

Vários componentes da resposta imune inata e adquirida participam no processo de defesa frente ao *T. cruzi*. Tais componentes podem ser interpretados como “braços” da resposta imune ativados pelas formas extracelular e intracelular do protozoário. Como resultado da geração de um amplo leque efetor, o parasita é atacado por várias frentes, propiciando uma redução da sua presença e sua multiplicação nos diferentes espaços tissulares. Apesar disso, o *T. cruzi* consegue sobreviver à ação do sistema imune, sugerindo a existência de mecanismos de evasão na resposta imune como a regulação do sistema complemento (ANSAADDO & INAL, 2010) e na sua perpetuação em locais relativamente imunoprivilegiados que permitem sua persistência, mesmo que em números muito reduzidos, pela vida do hospedeiro (INAL, 2004). Por sua vez, a persistência do parasita em locais como o coração exige uma atividade prolongada do sistema imune que culmina no aparecimento de lesões teciduais e, eventualmente em alterações funcionais. Desse modo, podemos afirmar que os mecanismos efetores do sistema imunológico, não apenas são responsáveis pelo controle da multiplicação do parasita nos tecidos, como também pelas lesões locais resultantes da resposta anti-parasitária, ação que se soma à direta ação lesiva do protozoário. O organismo naturalmente busca a homeostasia e cria este ambiente, uma vez que, se de um lado, visa eliminar o microorganismo invasor, do outro, tenta minimizar o dano tissular. Essa ação intensa e complexa entre a persistência do parasita e os mecanismos homeostáticos no hospedeiro leva ao surgimento/agravamento das alterações patológicas (MARINHO et al., 1999; PÉREZ - FUENTES et al., 2003).

No presente projeto, nosso objetivo foi investigar a importância da molécula CD28 na resposta imunológica à infecção pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, parasita que em função da sua baixa virulência, permite que se prolongue a vida do hospedeiro em uma situação onde há um comprometimento da resposta imune. Neste contexto deficitário, iremos verificar quais mecanismos de resposta à infecção ainda funcionam normalmente, e quais são os mais afetados na ausência desta molécula co-ativadora.

Desta forma, mesmo se tratando de uma cepa de baixa virulência que propicia um prolongado período de vida aos camundongos CD28KO, ainda ficou evidente que estes animais são suscetíveis à infecção. Assim, os gráficos de mortalidade indicam claramente que, nos inóculos utilizados, essa suscetibilidade ocorre, uma vez que a partir do dia 30-40 p.i., os camundongos começam a chegar a óbito. Fica claro também que na suscetibilidade do CD28KO não há nenhuma sincronia, pois a incidência de mortalidade se estende até próximos do dia trezentos após infecção.

Se considerarmos o número e frequência das diferentes populações linfocitárias presentes no baço do camundongo CD28KO infectado pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4, poderíamos supor que não há alterações linfocitárias decorrentes da ausência da molécula coestimuladora. Entretanto, isto não é totalmente verdade, uma vez que experiências *in vitro*, não incluídas nesta dissertação, mostraram que a proliferação das células T CD4+ e CD8+, assim como a expressão de alguns marcadores de superfície nas células T ativadas, tais como o ICOS, encontram-se alteradas nos camundongos CD28KO infectados pelo parasita. Além disto, existe uma deficiência funcional das células T ilustrada por alguns déficits, tais como a ausência das células TFH no baço do camundongo CD28KO infectado e a menor produção de IL-2 por estes animais.

ICOS é uma proteína costimulatória relacionada ao CD28 e expressa rapidamente após a ligação TCR-MHC que é definida como “Indutor costimulatório de células T. Segundo a literatura, o ligante dessa molécula (denominado ICOS-L ou B7-H2) é expresso em célula dendríticas, monocitos e células B ativadas. ICOS não é expresso constitutivamente em células T naïve. Por outro lado, desconhecemos qual o efeito da diminuição na expressão de ICOS na proliferação de células T e na produção de IL-2 dos camundongos deficientes em CD28. No presente trabalho a análise da expressão de ICOS mostra, a pesar de se tratarem de valores muito baixos, uma diferença importante no camundongo CD28KO infectado em comparação ao camundongo controle infectado. Nos nossos experimentos as células T de camundongos CD28KO infectados expressam níveis muito baixos deste costimulador em comparação ao C57BL/6, sugerindo que não há uma compensação pela ausência de molécula CD28, e até, que a expressão de ICOS ainda dependa da presença da molécula CD28 no contexto de ativação linfocitária em resposta ao *T. cruzi* Sylvio x10/4.

A importância da ativação linfocitária na resposta imune celular ao *T. cruzi* foi comprovada por diversos pesquisadores. Assim, experimentos *in vivo* (ROBERSON et al., 1973) e *in vitro* (HOFF, 1975; NOGUEIRA et al., 1977; NOGUEIRA et al., 1981) mostraram que os linfócitos TCD4 participam direta ou indiretamente na geração dos mecanismos efetores celulares e humorais que propiciam a resistência à infecção. As células TCD8, por sua vez, utilizam mecanismos citolíticos, tais como, a via Fas/FasL e a secreção de perforina/granzima B, (BERKE, 1995; KAGI et al., 1996; SAD et al., 1996) para eliminarem células infectadas, assim como a produção de citocinas para a ativação dos macrófagos e outras células. Neste contexto, camundongos deficientes da molécula MHC de classe I, que estão desprovidos de células TCD8, apresentam parasitemia alta e morte precoce (TARLETON et al., 1992).

Essa ativação linfocitária também leva à produção de citocinas do perfil TH1. Citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) e TNF- α que, quando em níveis adequados, constituem um fenótipo de resistência. Assim, é extremamente importante a participação de IL-12, atuando no controle inicial da infecção (ANTUNES e CARDONI, 2000). O IFN- γ potencializa a ação de células fagocitárias levando à eliminação dos parasitos internalizados pelo aumento da produção de reativos de nitrogênio e oxigênio (NOGUEIRA et al., 1981; GAZZINELLI et al., 1992). A importância da citocina IFN- γ na resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi*, já é bastante conhecida, podendo aqui mencionar diversos trabalhos. Assim, ANTUNES e CARDONI, 2001, demonstraram que a síntese de IFN- γ e ativação de macrófagos estão diretamente relacionadas à resistência dos animais à infecção chagásica. Anteriormente, Torrico e colaboradores (1991) demonstraram que animais resistentes tornam-se susceptíveis ao serem submetidos ao tratamento com anticorpos anti-IFN- γ .

Nossos resultados revelaram níveis semelhantes desta citocina em linfócitos TCD4 e TCD8. Ainda, na análise comparativa destas populações entre os grupos CD28KO e C57BL/6 infectados e estimulados *in vitro* com anti-CD3, ou não estimulados, a produção de IFN- γ não mostrou diferenças significativas, sugerindo que na ausência de CD28 não há prejuízo na produção desta citocina na infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4.

Continuando na discussão da expansão linfocitária, após os sinais necessários para a ativação da célula T, uma importante citocina do sistema imune, a IL-2, tem sua principal ação na diferenciação e expansão clonal após o reconhecimento antigênico, propriedade que motivou o seu nome original de “Fator de crescimento de linfócitos T” (TCGF – T-Cell Growth Factor). Sua ativação resulta em expressão dos genes de vias de transdução de sinais, incluindo JAK/STAT, principalmente JAK1, JAK3 e STAT5 (O’Shea et al., 2002). Em nosso trabalho, analisamos a produção de IL-2 pelos linfócitos T durante a resposta linfocitária aguda. Essa análise foi realizada com ou sem estímulo de anti-CD3. Encontramos diferentes níveis de secreção de IL-2 nos linfócitos T CD4 e CD8. Porém, fica claro que linfócitos T de camundongos CD28KO mantêm produção de IL-2 nos grupos não estimulados *in vitro*, fato que foi mais evidente nos linfócitos T CD8. Já nas análises de linfócitos T CD4 e CD8 estimulados com anti-CD3, não houve diferenças significativas na comparação dos níveis desta citocina nos grupos CD28KO e C57Bl/6. Assim, fica muito evidente que os linfócitos T de camundongo CD28KO respondem a este estímulo e secretam maiores níveis de IL-2 quando comparado às culturas não estimuladas. Entretanto, como esperado, os níveis desta citocina nos camundongos CD28-deficientes não se exibiram maiores que aqueles nas culturas de linfócitos dos camundongos C57BL/6 infectados.

Em relação ao papel das células B na infecção pelo *T. cruzi*, os nossos resultados parecem estar em conflito com o trabalho de Cardillo (CARDILLO et al., 2007), mostrando que os animais deficientes em células B não apresentaram significativa diferença na mortalidade durante a fase aguda da infecção, mas apresentaram maior mortalidade durante a fase crônica.

Apesar de haver concordância em parte com o trabalho acima, quando os camundongos CD28KO infectados por *T. cruzi* Sylvio X10/4 começam a sucumbir em aproximadamente o dia 30 de infecção, isto não significa que os anticorpos gerados na fase aguda (que ocorre tanto no C57BL/6 como no CD28KO) não tenham um efeito protetor frente a um parasita de baixa virulência tal e como o *T. cruzi* Sylvio X10/4. Assim, diferentemente, do trabalho de Cardillo, o nosso trabalho, deixa em aberto a hipótese dos anticorpos produzidos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* poderiam

desempenhar um papel importante no controle extracelular do parasita, e, em consequência, na sobrevivência dos camundongos CD28KO no início da infecção.

De acordo com a literatura, após a interação dos linfócitos B e linfócitos TCD4 (células T auxiliares), que ocorre após o reconhecimento antigênico nos órgãos linfoides periféricos, a ativação de linfócitos B para a produção de anticorpos tem lugar em dois locais distintos, sendo um fora dos folículos, ou seja, na região extrafolicular, e o outro dentro dos folículos, ou seja, na região folicular.

Na região extrafolicular dos órgãos linfoides periféricos, a resposta inicial de anticorpos frente a antígenos necessita do reconhecimento destes pelas células T auxiliares e a cooperação entre estes linfócitos T e os linfócitos B antígeno-específicos. A natureza dessa resposta é relativamente rápida e não requer muita complexidade devido à necessidade de rapidez para se obter uma resposta humoral. Neste contexto, é importante destacar que, dada a enorme quantidade e diversidade de antígeno que está presente no hospedeiro nas duas primeiras semanas de infecção pelo *T. cruzi*, a resposta humoral extrafolicular é muito ampla, uma vez que inclui um grande número de células B que exibem baixa reatividade frente às diferentes moléculas do parasita. Em consequência, os anticorpos IgM ou IgG produzidos nesta etapa da infecção exibem uma ampla diversidade de reconhecimento e uma baixa afinidade para com os antígenos do parasita, resposta que parece corresponder ao que tem sido denominado ativação policlonal dos linfócitos B (D'IMPERIO LIMA, 1985).

Já dentro do folículo linfoide, a resposta humoral inclui maturação de afinidade dos linfócitos B. Assim, apresenta uma diversidade de reconhecimento muito restrita, se comparada à da resposta extrafolicular, mas exhibe, como resultado da mutação somática, uma afinidade elevada dos anticorpos produzidos. Deste modo, a sua diversidade é bem mais exígua, pois inclui uma contínua seleção daquelas células B que exibem maior afinidade pelos antígenos mais frequentes do parasita. A resposta intrafolicular também requer a interação do linfócito B com o linfócito T auxiliar (TCD4+), mas diferentemente da ativação extrafolicular, trata-se de linfócitos TCD4+ que são induzidos durante a interação B-T para se diferenciarem em células T auxiliares foliculares (Linfócitos TFH). Células B ativadas e células "TFH" migram para a região folicular onde ocorrerá uma forte interação B-T. Após essa ativação, centros

germinativos (GCs: “germinal centers”) se formarão dentro dos folículos. Os centros germinativos são locais de intensa proliferação dos linfócitos B (local onde passam a ser denominados de células GC-B), que após sofrerem mutação somática, ou seja, após a mutação dos genes da região de reconhecimento dos anticorpos, sofrem após interação com linfócitos TFH, inúmeros eventos de reconhecimento/mutação/seleção que nortearão à maturação de afinidade, geração de células B de memória e indução para formação de plasmócitos de longa vida que posteriormente migrarão à medula óssea. Toda essa intensa atividade é diretamente vinculada à produção de anticorpos em extremas quantidade e qualidade.

Em nosso trabalho, perseguimos um conhecimento mais detalhado da resposta humoral do camundongo CD28KO infectado pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4. Para isto, foram necessários alguns reajustes na intensidade do estímulo, propiciado pelo aumento no tamanho do inóculo parasitário, uma vez que para o estudo da resposta humoral os inóculos iniciais (1×10^5 ou 2×10^5) por camundongo se mostraram insuficientes para visualizar por citometria no grupo C57BL/6 infectado um número expressivo de células GC-B e TFH, possibilitando a quantificação da interação B-T da região folicular. Contudo, contemplado o ajuste, onde passou-se a utilizar um inóculo maior (5×10^6) de *T. cruzi*, foram realizadas análises de células T Auxiliares Foliculares (“Follicular Helper T cells – TFH”) e células B de centros germinativos (“Germinal Center B cells – GCs B cells”) em camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4.

Nossos resultados revelaram uma frequência muito baixa (ou inexistente) da população de linfócitos “TFH” em camundongos CD28KO quando comparado ao seu controle C57BL6 infectado, cogitando-se, no primeiro momento que a ausência da molécula CD28 de alguma forma prejudica a diferenciação dos linfócitos T auxiliares e sua presença no folículo primário.

Analogamente ao observado nas células TFH, a análise das células B de centros germinativos (Germinal Center B cells – GCs B cells) nos camundongos CD28KO infectados com *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 não apontou formação de “GCs B cells” no camundongo CD28KO infectado quando comparado ao seu controle C57BL6 infectado.

O fato de resultados mostrarem a, praticamente, ausência de linfócitos “TFH” e não formação de “GCs B cells” vincula o entendimento de que haja forte impedimento na produção de anticorpos de alta afinidade, o que é compatível com os nossos resultados no capítulo de produção de anticorpos.

No camundongo CD28KO infectado, a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM e IgG na fase aguda da infecção, indica uma resposta humoral aparentemente conservada, análoga à do camundongo C57BL/6 infectado nesta fase da doença. Além disto, a nossa observação dos anticorpos IgM e IgG do camundongo CD28KO exibirem ótimas reatividades a outros antígenos indica que provavelmente uma ativação policlonal das células B esteja ocorrendo. Em contrapartida, no fim da fase aguda e no decorrer da fase crônica, observa-se que no camundongo CD28KO não houve ganho na quantidade e principalmente na qualidade da resposta humoral anti-*T. cruzi*, sugerindo não ter acontecido a maturação de afinidade que mostrou-se presente no camundongo C57BL/6 infectado. Desta forma, no camundongo CD28KO infectado persiste na fase crônica da infecção um nível baixo de IgG específica, muito inferior aos dos camundongos C57BL/6 crônicos. Esse resultado parece confirmar a hipótese de que a produção dos anticorpos específicos da classe IgG de alta afinidade, que no camundongo C57BL/6 garantem o controle dos parasitas extracelulares, estejam ausentes ou severamente diminuídos no camundongo CD28KO infectado dificultando a opsonização das formas tripomastigotas extracelulares. Por outro lado, é relevante apontar que analisando separadamente os grupos de camundongos CD28KO, é notória e significativa a diferença da produção de anticorpos da subclasse IgG2c anti-*T. cruzi* em camundongos CD28KO infectados em relação aos camundongos CD28KO não infectados, sugerindo que mesmo em menor escala, quando comparado ao camundongo C57BL/6 controle infectado, o camundongo CD28KO infectado produz anticorpos anti-*T. cruzi* de subclasse IgG.

A ativação policlonal do sistema imune é um fenômeno pouco compreendido que se observa claramente na infecção de camundongos por diferentes tipos de parasitas, o que inclui, tanto protozoários, como vírus, fungos e bactérias. Para muitos pesquisadores e sem nenhuma base, este fenômeno tem sido considerado uma reação

adversa, e até, como eventual responsável por processos de autoimunidade nos animais infectados.

Nosso trabalho mostra que no camundongo CD28KO (que carece de maturação de afinidade), observa-se uma reatividade sérica frente ao *T. cruzi*. Ainda, temos coletado volumes suficientes do soro dos camundongos CD28KO infectados por parasitas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 para separarmos a IgG e a IgM, e verificar, em ensaios de transferência que serão realizados em um futuro próximo, se estas frações tem atividade protetora frente ao *T. cruzi*.

7. Conclusões.

1. Os camundongos CD28KO mostram uma suscetibilidade relativa à infecção pelo *T. cruzi* do clone de baixa virulência Sylvio X10/4, uma vez que sobrevivem à infecção por um período prolongado vindo a óbito em, não menos que 50-70 dias de infecção.

2. Em estudo preliminar onde são mostrados vários experimentos diferentes realizados com poucos camundongos, a frequência de linfócitos CD4+, CD8+ e B no baço evoluiu em forma similar nos camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados. Assim, uma queda importante nas frequências de linfócitos B e CD4+ foi observada em ambos os camundongos CD28KO e C57BL/6 no dia 13 p.i., frequência que se recupera no decorrer da infecção. Por outro lado, foi observada uma relativa manutenção da frequência de linfócitos CD8+ nos dois grupos de animais infectados nos tempos avaliados.

Na primeira quinzena de infecção os linfócitos TCD4+ mostram uma capacidade de produção de IL-2 parcialmente diminuída, enquanto que os linfócitos TCD8+ mostram uma maior produção de IL-2 na ausência de um pré-estímulo (anti-CD3), e uma produção reduzida após este, quando comparados aos valores no camundongo C57Bl6 infectado. Por outro lado, a produção de IFN-gama, citocina fundamental para a eliminação do parasita, pois promove a otimização da ativação de macrófagos através da produção de óxido nítrico e radicais de oxigênio, também parece estar igualmente conservada nos esplenócitos dos camundongos CD28KO e C57BL/6 infectados.

3. A carga parasitária subpatente no sangue, não parece aumentar com a progressão da infecção, apesar de que esta possibilidade não ter sido descartada.

4. No tecido cardíaco do camundongo CD28KO infectado se observa um aumento da incidência de infiltrados inflamatórios e ninhos de amastigotas (em relação ao camundongo C57BL/6 infectado), indicando uma maior incapacidade em eliminar o parasita.

5. A presença de linfócitos T Foliculares Auxiliares (TFH) e células B de centros germinativos mostrou-se nula/ou muito baixa nos camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4.

6. A avaliação da presença de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgM nos soros de camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 indica existe uma reatividade por anticorpos frente a diversos extratos antigênicos, reatividade que poderia ser considerada resultado da ativação policlonal extrafolicular das células B.

Ainda, a avaliação da presença de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgG, subclasse IgG2c, nos soros de camundongos CD28KO infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 indica uma produção regular na fase aguda. No decorrer da fase crônica, a produção de IgG2c pelo camundongo CD28KO infectado, apesar de muito inferior à exibida pelo camundongo C57BL/6, mostrasse significativamente maior que a do camundongo CD28KO não infectado.

7. A reatividade sérica IgM específica ao *T. cruzi* Sylvio X10/4 nos soros de camundongos CD28KO crônicos com diferentes tempos de infecção é claramente observada. Contudo essa produção é inferior à dos C57BL/6 crônicos.

8. A pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgG (após diferentes tempos de infecção) mostrou uma baixa taxa nos camundongos CD28KO infectados por parasitas Sylvio X10/4, porém superior à dos camundongos CD28KO não infectados.

8. Em resumo, se comparados aos camundongos C57BL/6, os camundongos CD28KO exibem um controle diminuído do parasita de baixa virulência *T. cruzi* Sylvio X10/4. Contudo, no camundongo CD28KO há elementos da resposta imune suficientes para permitir sua sobrevivência por um período extenso. Assim, o reconhecimento antigênico incompleto (na ausência da coestimulação) permite que alguns mecanismos imunológicos estejam disponíveis e garantam uma sobrevida relativa. Com o tempo, entretanto, o prejuízo na diferenciação e formação de algumas subpopulações celulares, essenciais para a produção de anticorpos

específicos de alta afinidade, os torna incontestavelmente mais suscetíveis à infecção, motivo pelo qual eles vêm a óbito em um amplo espaço de tempo.

9. Referências Bibliográficas *

ABBAS A.K. O SISTEMA IMUNE NA SAUDE E NA DOENÇA, 5ª ed, Editora Artmed, 2002.

AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 366(1579), pp. 2748-55, 2011.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023 Informação e documentação: referências: elaboração., Rio de Janeiro, 2002.

ANSA-ADDO & INAL. As vesículas derivadas da membrana plasmática humana interrompem a proliferação e induzem a diferenciação de células de leucemia monocítica aguda THP-1. J. Immunol. 185 : 5236 – 5246, 2010.

BERKE, G. The CTL's kiss of death. Cell, 81(1):9-12, 1995.

BERMUDEZ, J. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Trop, v. 156, p. 1-16, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2009.

BRENER, Z. "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*." Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo 4 389-396, 1962.

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

BROWN, D.R. Papel limitado de sinais mediados por CD28 na diferenciação do subconjunto T auxiliar J. Exp. Med. , 3, pp. 803 – 810, 1996.

BUTTY, V. Assinaturas de forte diferenciação populacional formam haplótipos estendidos entre os genes co-estimuladores CD28, CTLA4 e ICOS humanos. *Proc Natl Acad Sci USA 104*: 570-575, 2007.

CARDILLO. Cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 122:584-95, 2007.

CAN, S. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Bras. Med. Trop.*,v.33,n.2,p.191-196, 2000.

CESTARI, I.S. *Trypanosoma cruzi* e o Sistema Complemento: mecanismos de ativação e papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

COURA, J. Doença de Chagas: o que é conhecido e o que é necessário. Um artigo de fundo, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007vol. 102 Suplemento 1(pág. 113-122) 2007.

COURA, J. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Mem do Inst Osw Cruz.**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009. ISSN 0074-0276, 2009.

COURA, J. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood

and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277-82, 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, N. Gen, N. sp., o agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

CHAN, S.H. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*, 173:869-79, 1991.

CHANG, P.P. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol* 13: 35–43, 2012.

CHIARI E, BRENNER Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Ver Inst Med Trop São Paulo*, 8:134-8, 1966.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharma design.**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002. ISSN 1381-6128, 2010.

DIAS, J.C. General situation and perspectives of Chagas' disease in Northeastern Region, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16: 13-34, 2000.

D'IMPÉRIO, L. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, 15: 201-3, 1985.

D'IMPÉRIO, L. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. **J. Immunol.**, 137: 353-6, 1986.

ELIAS, R.M. Role of CD28 in polyclonal and specific T and B cell responses required for protection against blood stage malaria. **J. Immunol.**, v. 174, p. 790-799, 2005.

ERIC N. Um papel para a proteína coestimuladora induzível no CD28 - Mecanismo Independente de Resistência ao *Toxoplasma gondii*. J Immunol 15 de julho, 169 (2) 937-943, 2002.

FRANQUINI, J.R. Monoclonal antibody 3C9 eliminates *T. cruzi* trypomastigotes in vivo without mediating lysis in the presence of complement (CoML) or cells (ADCC). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 91: 253, 1996.

FREITAS, E.C. Inquérito Soro epidemiológico Da Doença De Chagas No Município De Limoeiro Do Norte, Ceará Em 2013. 95f, 2014.

GAZZINELLI, R.T. A atividade microbicida de macrófagos tratados com interferon-gama contra *Trypanosoma cruzi* envolve um mecanismo mediado por L-arginina, inibido por interleucina-10 e transformando o crescimento fator beta EUR. J. Immunol. , 22 , pp. 2501 – 2506, 1992.

GEISBRECHT, B.V. LAMBRIS. Complemente invasion by human pathogens, Nat. Rev. Biol.,6(2),pp.1-22, 2008.

GOLDSBY. Imunologia. 4ª Edição. Editora Revinter, Rio de Janeiro, RJ, 2002.

HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. J. Exp. Med. 1;142(2):299-311, 1975.

HUTLOFF, A. ICOS is an inducible T cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 397, p. 263-266, 1999.

IEZZI, G. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. Immunity, 8 (1): 89-95, 1998.

JANEWAY, C.A. IMUNOLOGIA: O SISTEMA IMUNE NA SAUDE E NA DOENÇA. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

JUNIOR, M. D. Sistema imunitário – Parte II. Fundamentos da resposta imulogóica mediada por linfócitos T e B. REviata Brasileira de Reumatologia, v.50.5,p.552-580,

2010.

JUNQUEIRA, C. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Exp. Rev. Mol. Med.**, v. 12, n. 29, p. 1-23, 2010.

KAGI, D. Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. *Curr. Opin. Immunol.*, 8(4):472-7, 1996.

LEVINSON, W. MICROBIOLOGIA MEDICA E IMUNOLOGIA, 4^a Ed. PORTO ALEGRE: ARTES MÉDICAS, 246p, 1998.

LING, V. Montagem e anotação da sequência do cromossomo humano 2q33 contendo o cluster de gene CD28, CTLA4 e ICOS: análise por abordagens computacionais, comparativas e microarray. *Genomics* 78 : 155-168, 2001.

MACHADO F.S. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.*, 2012;Vol.34:753-770, 2012.

MAYA, J.D. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: 601-620, 2007.

MARINHO, C. R. F. IFN-gamma but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma. cruzi* parasites. *Scand. J. Immunol.*, v. 66, n. 2-3, p. 297-308, 2007.

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

MARINHO, C. R. F. Influence of acute phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas disease.

Infect. Immun., v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.

MARTINS, G. A. CD28 are required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microb. Infect.*, v. 6, n. 13, p. 1133-1144, 2004.

MATHUR, M. CD28 interactions with either CD80 or CD86 are sufficient to induce allergic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v. 21, p. 498-509, 1999.

MUELLER, D.L. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 445–480, 1989.

MUÑOZ-FERNANDEZ M.A. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol*, 22: 301- 307, 1992.

MUXEL, S.M. Comparative analysis of activation phenotype, proliferation and IFN-gamma production by spleen NK1.1(+) and NK 1.1(-) T cells during *Plasmodium chabaudi* AS Malaria L Interferon Cytokine Res; 30(6) 417-26, 2010.

NOGUEIRA, N. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophages function during infection. *J Exp Med* 146: 157-171, 1977.

NOGUEIRA N. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 51(3):325-34, 1981.

NURIEVA, R.I. B7h is required for T cell activation, differentiation and effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 100, p. 14163-14168, 2003.

PÉREZ, F. Gravidade da doença de Chagas crônica está associada ao desequilíbrio citocina / antioxidante em indivíduos cronicamente infectados. *Int J Parasitol* 33 : 293-299, 2003.

PINTO, D. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). Ann of Internal Med., v. 144, n. 10, p. 772-774, ISSN 0003-4819, 2006.

PITTELLA. O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Rev Soc Bras Med Trop, v. 42, n. 1, p. 67-72, 2009.

RASSI, A. Chagas disease. Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388- 1402,. ISSN 0140-6736, 2010.

ROBERSON, E.L.)Trypanosoma cruzi: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol. 34(2):168-80, 1973.

RIBEIRO, A. L. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol, v. 9, n. 10, p. 576-89, 2012.

RODRIGUES, M.M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. Journal of Parasitology Research. 2011.

SAD, S. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. J. Exp. Med., 184(4):1543-7, 1996.

SCHALL, V.T. Contos de Fatos - Histórias de Manguinhos. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001.

SHARPE, A.H. The B-7/CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 116-126, 2002.

SHU, U. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol*;Apr; 25:1125-8, 1995.

SILVA, L.H. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, Rio de Janeiro, v20, p. 191-208, 1953.

SMITH, K.A. Interleukin-2. *Sci Am.* 1990; 262:26-32, 1990.

SOUZA, W. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology.* 2010.Vol.2010:18.Article ID 295394, 2010.

STREIGER, M. L. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 365-375, 2004.

SUSANNE, O.A. Papel do ligante CD40 e CD28 na indução e manutenção de respostas de células T efectoras CD8⁺ antivirais. *J Immunol*, 164 (7) 3689-3697, 2000.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144:717-724, 1990.

TARLETON, R.L. Suscetibilidade de camundongos deficientes em beta2-microglobulina à infecção por *Trypanosoma cruzi*, *Nature*, 356, pp. 338 – 340, 1992.

TEIXEIRA, A.R.L. N. Evolução e patologia na doença de Chagas. Uma revisão, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 101 (pág. 463-491), 2006.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with

immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 84:4008-27, 1994.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.*, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, ISSN 1873-6254, 2010.

URBINA J.A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 62, n. 1, p.149-156, 2015.

UMEKITA, L.F. Specificity and role of anti-*Trypanosoma cruzi* clearance antibodies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29: 25-31, 1996.

WHITTINGTON, R. Interleukin 2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs*. 1993; 46:446, 1993.

WHO. First WHO Report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. In: Organization WH. (editor): Geneva; 2010. p.172, 2010.

TORRICO, F. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146: 3626-3632, 1991.

VINUESA, C.G. *Nat. Immunol.* 2, 1144–1150, 1999.

VINUESA, C.G. *J. Exp. Med.* 191, 1735–1744. 191, 485–494, 2000.