



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS
CRONICAMENTE INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi*:
ESTUDO DE CÉLULAS REGULATÓRIAS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA.

DANIEL HUBER PESSINA

Salvador - Bahia - Brasil
2006



001983

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS
CRONICAMENTE INFECTADOS PELO *Trypanosoma
cruzi*: ESTUDO DE CÉLULAS REGULATÓRIAS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA.**

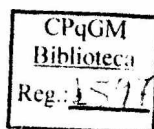
DANIEL HUBER PESSINA

Orientadora: Dr^a. Fabiola Cardillo

Dissertação Apresentada para
Obtenção do Grau de Mestre em
Patologia (Área de Concentração:
Patologia Experimental)

Salvador - Bahia - Brasil

2006



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

P475a Pessina, Daniel Huber
Avaliação da resposta imune em animais cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo de células regulatórias após administração de ciclofosfamida.
[manuscrito]. / Daniel Huber Pessina. - 2006.
157 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.
Orientadora: Dr^a. Fabiola Cardillo, Laboratório de Chagas-
Autoimunidade e Imunologia Celular.

1. Imunologia Celular. 2. Linfócitos. 3. *Trypanosoma cruzi*.
4. Camundongos 5. I. Título.

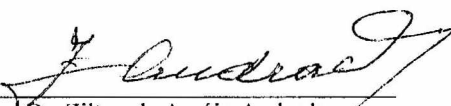
CDU 577.27:593.161

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS CRONICAMENTE INFECTADOS PELO
Trypanosoma cruzi: ESTUDO DE CÉLULAS REGULATÓRIAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA”

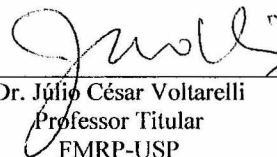
DANIEL HUBER PESSINA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Júlio César Voltarelli
Professor Titular
FMRP-USP



Dra. Fabiola Cardillo
Pesquisadora Adjunta
CPqGM-FIOCRUZ

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro: Projeto e Bolsa de Estudos.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por contribuir com as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS AOS ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ por conceder condições favoráveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental do CPqGM-Fiocruz/UFBA e aos professores das disciplinas ministradas durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de Mestrado.

*" 'Lutar sempre, vencer se possível,
desistir nunca.'*

*A todos que lutaram, ao meu lado,
tanto pela realização deste trabalho
quanto pela minha formação
acadêmica, em especial meus pais e
orientadores."*

AGRADECIMENTOS

Especialmente:

- à dra. **Fabiola Cardillo**, pela dedicação e paciência com a qual tem me orientado e conduzido pelo mundo da imunologia, pelo apoio que tem me dado, e por sua valiosa amizade durante este período;
- à dra. **Sônia Gumes Andrade**, a quem sou muito grato por ter me apresentado à pesquisa científica e me apoiado pessoalmente, pelos conselhos e ensinamentos, e também pela colaboração neste projeto;
- ao dr. **José Orivaldo Mengele Jr.**, pelas inúmeras colaborações e orientações neste, e em outros trabalhos, pelo companheirismo e ensinamentos de extrema importância para minha formação;
- ao msc. **Jorge Sadao Nihei**, pela disponibilidade com que tem colaborado na realização deste projeto, e por sua amizade;
- ao dr. **Zilton Andrade**, pelas instruções e valiosos ensinamentos na área da patologia, por disponibilizar equipamentos e reagentes e, principalmente, pelo exemplo vivo que é da ética e profissionalismo na pesquisa;

- aos msc. **Renata Portela** e **Torriceli Thé**, aos biólogos **Marcos Lázaro** e **Karina Sobral**, e à bolsista **Lorena dos Anjos**, pelos auxílios que têm me prestado durante os experimentos e pela amizade e companheirismo;
- aos msc. **Juraci Magalhães** e **Ariane Pimentel**, pelas instruções de fundamental importância durante minha adaptação ao laboratório, e a **Maria de Fátima Magalhães** e **Presciano Correa** que, com seus trabalhos, permitiram a realização deste projeto;
- a **Dinalva França de Jesus**, pelas auxílio com as culturas, e por todo o carinho e compreensão;
- aos professores **Edson Camandaroba**, **Rozália Campos** e **Isis Magalhães**, por toda ajuda, apoio e amizade;
- aos novos integrantes do LACEI, **Inês Bandeira**, **Ercy Bono** e **André Meyer**, pelos auxílios que me têm prestado, os quais contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho, e pela amizade;
- à **Telma Campos**, por toda colaboração que tem me prestado na parte burocrática e administrativa;
- aos amigos do LAPEX, principalmente a **Bárbara Assis**, **Elisangela Trindade**, **Claudia** e **Antonio Carlos** que se mostraram sempre dispostos a

ajudar, como o fizeram inúmeras vezes, cedendo reagentes e equipamentos sempre que possível;

- à **Aldina Barral** e ao LIP, por disponibilizarem o Citômetro de Fluxo;
- às equipes da Biblioteca (em especial sra. **Fessina**), do setor de Histopatologia, do setor de limpeza (em especial **Dona Lia**) e do Biotério do CPqGM (em especial **Jaqueline** e **Alexandre**) que sempre se mostraram prontos para prestar o auxílio necessário;
- a todos os outros companheiros e amigos do LACEI, aqui citados ou não, pela amizade e companheirismo, em cuja convivência têm me permitido amadurecer como pesquisador e pessoa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Histórico da descoberta da Doença de Chagas.....</i>	1
1.2 <i>Caracterização do <u>T. cruzi</u>.....</i>	2
1.3 <i>O Ciclo Biológico.....</i>	4
1.4 <i>O Vetor.....</i>	6
1.5 <i>A Doença de Chagas.....</i>	7
1.6 <i>Modelos Experimentais.....</i>	9
1.7 <i>Resposta Imune Experimental ao <u>T. cruzi</u>.....</i>	11
1.7.1 <i>Imunidade Inata.....</i>	11
1.7.2 <i>Resposta Imune Adquirida na Doença de Chagas.....</i>	13
1.7.3 <i>Ativação e Memória.....</i>	15
1.7.4 <i>Citocinas na Infecção pelo <u>T. cruzi</u>.....</i>	17
1.8 <i>Os Linfócitos T CD4 Reguladores.....</i>	19
1.8.1 <i>Histórico.....</i>	19
1.8.2 <i>Fenótipo.....</i>	20

1.8.3	<i>Mecanismo de Ação</i>	24
1.9	<i>A Ciclofosfamida e Seu Efeito Sobre a Infecção Crônica pelo <u>T. cruzi</u></i>	26
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	32
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	<i>Animais</i>	34
4.2	<i>Parasitas</i>	34
4.3	<i>Parasitemia</i>	35
4.4	<i>Tratamento com Ciclofosfamida</i>	35
4.5	<i>Protocolo Experimental</i>	36
4.6	<i>Marcação Fluorescente e Análise por Citometria de Fluxo</i>	38
4.7	<i>Obtenção de Mononucleares que Infiltram o Músculo Esquelético (MNSkM)</i>	43
4.8	<i>Cultura de Células e Dosagem de Citocinas</i>	43
4.9	<i>Ensaio de ELISA</i>	45
4.10	<i>Análise Histopatológica</i>	46
4.11	<i>Análise Estatística</i>	47
5	RESULTADOS	48
5.1	<i>Parasitemia e Mortalidade</i>	48

5.2	<i>Celularidade dos Órgãos Linfóides</i>	52
5.3	<i>Análise Fenotípica das Células T</i>	53
5.3.1	<i>Baço</i>	53
5.3.1.1	<i>Ativação e Memória</i>	53
5.3.1.2	<i>Células Regulatórias e Células NKT</i>	59
5.3.2	<i>Músculo Esquelético</i>	62
5.4	<i>Análise dos Perfis de Citocinas</i>	64
5.4.1	<i>Dosagem de Citocinas no Sobrenadante de Cultura de Esplenócitos</i>	64
5.4.2	<i>Avaliação das Citocinas Detectadas no Soro de Animais Infectados e Tratados ou Não com Ciclofosfamida</i>	67
5.4.3	<i>Resumo dos Perfis de Citocinas</i>	69
5.5	<i>Análise Histopatológica</i>	70
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	89
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
9	ANEXO	111

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura dos Grupos Experimentais - Listados na Página 40 (Material e Métodos).

ALDH	Aldeído dehidrogenase
Anti-	Anticorpo
APC	Célula apresentadora de antígeno
B7.1 e B7.2	Moléculas co-estimulatórias presentes em APCs
BIO	Biotina
BSA	Albumina do soro bovino
CD	Conjuntos de diferenciação
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos
CY	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dr./dra.	Doutor/doutora
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardio
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
FITC	Fluoresceína
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i> , gene murino que dá origem ao regulador de transcrição <i>Scurfin</i>
FSC	Soro bovino fetal
G-CSF	Do inglês, <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GITR	Molécula relacionada à família de receptores do fator de necrose tumoral indizível por glucocorticóide
H.E.	Hematoxilina e Eosina

IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetase induzível.
KO	Gene truncado para uma determinada molécula
LPS	Lipopolissacarideo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NK1.1	Marcador NK1.1 sobre células T e NK
MNSkM	Células mononucleares do músculo esquelético
nm	Nanômetro
msc.	Mestre
NO	Óxido Nítrico
nTreg	Célula T regulatória natural
OPD	orto-fenil-diamina
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PE	Ficoeritrina
pg/mL	Picogramas por mililitro
rIL	Interleucina recombinante
RPMI	Meio de cultura celular
SFB	Soro Bovino Fetal
TCR	Receptor de linfócitos T
TGF- β	Fator de Transformação e Crescimento Tumoral
Th1 ou Th2	Padrão de linfócitos T auxiliar (1 ou 2).
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa.

Treg	Célula T regulatória
$\alpha\beta+$	TCR formado pelas cadeias α e β
$\gamma\delta+$	TCR formado pelas cadeias γ e δ .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho experimental esquemático: modelo utilizado para a investigação sobre o efeito do tratamento com Ciclofosfamida em baixas doses em animais crônicos infectados	37
Figura 2.1	Esquema do protocolo experimental para análise dos dados obtidos do Citômetro de fluxo.....	40
Figura 2.2	Esquema do protocolo experimental para análise das populações de nTreg (CD4+CD25+CD103+).....	42
Figura 3	Parasitemia (a) e mortalidade (b) dos animais Balb/c e C56Bl/6 infectados com a cepa Colombiana e Tulahuen do <i>T. cruzi</i> respectivamente.....	49
Figura 4	Médias parasitêmicas durante e após o tratamento.....	50
Figura 5	Taxa de sobrevivência dos animais infectados a partir do início do tratamento (dia 0) até o último dia de acompanhamento do grupo, 4 meses após o término do tratamento.....	51
Figura 6	Contagem das células mononucleares do baço.....	52
Figura 7	Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ ou CD8+ que expressam baixos níveis de CD45RB.....	55
Figura 8	Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ ou CD8+ que são negativos para o CD62L.....	56
Figura 9	Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ ou CD8+ que apresentam altos níveis de CD44 na superfície celular.....	58
Figura 10	Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ que são CD25+ e dos que são CD25+CD103+.....	60
Figura 11	Números relativos (A) e absoluto (B) dos esplenócitos TCR $\alpha\beta$ + que apresentam o marcador de superfície NK 1.1.....	61
Figura 12	Figura 12- Números relativos e dos linfócitos MNSkM CD4 que são CD25+CD103+	62
Figura 13	Números relativos dos linfócitos MNSkM $\alpha\beta$ que são NK 1.1+, infiltrando o músculo esquelético, 7 a 15 dias e 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (30mg/kg).....	63

Figura 14	Níveis de IFN γ encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos.....	65
Figura 15	- Níveis de IL-10 encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos.....	66
Figura 16	Níveis de IL-17 encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	67
Figura 17	Níveis de IL-12 no soro de camundongos Balb/c após 7-15 dias e 4 meses pós-termino do tratamento.....	68
Figura 18	Tecido cardíaco de camundongos Balb/c após 1-2 semanas do fim do tratamento com Ciclofosfamida em baixas doses.....	71
Figura 19	Quantificação do infiltrado inflamatório em miocárdio de animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	73
Figura 20	Coloração com picrossírius realizado no miocárdio de camundongos Balb/c passados 4 meses pós término do tratamento com Ciclofosfamida em baixas doses.....	75
Figura 21	Quantificação da fibrose em miocárdio de animais C57Bl/6 e Balb/c infectados com a cepa Colombiana e Tulahuen do <i>T. cruzi</i>	76
Figura 22	Esquema mostrando a possível dinâmica imunológica que ocorre em decorrência do tratamento com Ciclofosfamida em animais cronicamente infectados pelo <i>T. cruzi</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resumo dos perfis de citocinas analisados no presente trabalho, comparando-se animais Balb/c e C57Bl/6 infectados e tratados (Ciclofosfamida) com os animais apenas infectados.....	69
-----------	---	----

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS CRONICAMENTE INFECTADOS PELO *T. CRUZI*: ESTUDO DE CÉLULAS REGULATÓRIAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE CICLOFOSFAMIDA. DANIEL HUBER PESSINA. Introdução: Durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, várias subpopulações de linfócitos T estão envolvidos na resposta inflamatória encontrado em muitos tecidos. Estudos prévios de nosso laboratório têm mostrado que o tratamento de camundongos com baixas doses de Ciclofosfamida (CY) pode interferir nos mecanismos imunomodulatórios durante a infecção pelo *T. cruzi*. O padrão de ativação de linfócitos T, a presença de células T regulatórias naturais (nTregs) e de citocinas produzidas em camundongos C57Bl/6 e Balb/c tratados com CY foram analisados durante a infecção. Métodos e resultados: Camundongos Balb/c e C57Bl/6 foram infectados pelas cepas Colombiana e Tulahuen do *T. cruzi*, respectivamente. Durante a fase crônica da infecção, os camundongos foram tratados por um mês com CY (30 mg/kg). Os resultados foram obtidos em dois pontos de análise: uma/duas semanas e quatro meses pós-término do tratamento. No primeiro ponto, células T efectoras/memória estavam diminuídas no baço de animais C57Bl/6 cronicamente infectados e tratados, quando comparados aos controles infectados. Quatro meses após o tratamento, o número destas células retornou aos mesmos valores encontrados nos animais não tratados. Foi verificado aumento do número de células nTreg (CD4+CD25+CD103+) no baço e nos infiltrados inflamatórios do músculo esquelético de animais tratados com CY, enquanto a população de células NK T (identificadas pelo marcador NK1.1) estava aumentada principalmente no baço. Quanto ao perfil de citocinas, foi encontrado um aumento na produção de IL-10 e uma diminuição na produção de IFN γ , no sobrenadante de cultura de esplenócitos. O tratamento também induziu uma diminuição dos níveis de IL-12 no soro, 1-2 semanas após o fim da administração de CY. O estudo dos animais Balb/c mostrou alterações mais discretas sobre sua celularidade, estando presente o mesmo perfil de aumento de nTregs e diminuição de ativação/memória, sobretudo quando verificados os números relativos destas populações celulares. Nestes animais, a análise histopatológica mostrou uma tendência no aumento da inflamação no miocárdio e músculo esquelético após 1-2 semanas do término do tratamento. Surpreendentemente, a IL-17 mostrou-se aumentada neste período, diminuindo passados quatro meses. Conclusões: Após o tratamento com CY, o aumento do número de nTregs no baço e nos infiltrados do músculo esquelético correlacionam-se ao aumento da produção de IL-10 e à diminuição da produção de IFN γ por células esplênicas, além de uma diminuição nas populações de células efectoras/memória no baço. Estas alterações podem estar ocorrendo como um mecanismo regulatório para minimizar a inflamação e o dano tecidual, na cinética aqui observada após o tratamento.

Suporte Financeiro: CNPq (Bolsa e Projeto)

Palavras chave: Ciclofosfamida, Células regulatórias, *Trypanosoma cruzi*, Imunorregulação.

ABSTRACT

EVALUATION OF INFLAMMATORY RESPONSE IN *T. CRUZI* INFECTED MICE: STUDY OF REGULATORY CELLS IN CHRONIC ANIMALS AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE ADMINISTRATION. DANIEL HUBER PESSINA.

Introduction: During *Trypanosoma cruzi* infection, many T cell-subpopulations are involved in the inflammatory response found in many tissues. Previous studies from our laboratory have indicated that treating mice with a low dose of Cyclophosphamide (CY) may balance immunomodulatory mechanisms during *T. cruzi* infection. T cell activation pattern, the presence of regulatory T cell (nTregs) and the cytokines produced in CY-treated C57Bl/6 and Balb/c mice were analyzed during infection. Methods and Results: Balb/c and C57Bl/6 mice were infected with Colombian or Tulahuen strains of *T. Cruzi*, respectively. During the chronic phase of infection, the mice were treated with CY (30 mg/kg) for one month. Our results were obtained at two different time-points: one/two week after treatment and four months thereafter. At the first time-point, memory/effector T cells number was decreased in spleen from CY-treated C57Bl/6 mice. Four months after treatment, this number returned to that observed in non-treated mice. An Increase in Treg number (evaluated by CD4+CD25+CD103+) was observed in splenocytes and skeletal muscle mononuclear infiltrates from these CY-treated animals, while NK T (evaluated by NK1.1) cell numbers were increased mainly in spleen. Regarding cytokine production, IL-10 was found to be increased in spleen-cells supernatants while IFN γ was decreased when evaluated in the same compartments. Treatment also induces a decrease in levels of IL-12 in serum of these mice, 1-2 weeks after the end of administration. Study of infected and CY-treated Balb/c mice has shown slight differences in cell activation, with the same profile of increased nTregs and reduced activated/memory T cells, mainly in relative numbers. In those mice, histopathological analysis indicated a mild increase in the inflammatory response in CY-treated mice, 1-2 weeks after the end of treatment. Surprisingly, IL-17 was increased at this time point, being decreased after four months in CY-treated Balb/c mice. Conclusions: After CY-treatment, increased Treg number in spleen and muscle infiltrates correlated with increased IL-10 and decreased IFN γ produced in spleen-cell supernatants, besides a low rate of memory/effector splenic T cells. As a matter of fact, this may occur as a regulatory mechanism in order to minimize inflammation or tissue damage, after treatment.

Financial support: CNPq fellowship and support.

Key Words: Cyclophosphamide, Regulatory cells, *Trypanosoma cruzi*, Immunoregulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Histórico da Descoberta da Doença de Chagas*

A Doença de Chagas, zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, possui um enorme impacto na saúde pública nos diversos países da América Latina. Foi descoberta em 1909 pelo jovem médico Carlos Chagas, formado pela Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Este, após ser solicitado para controlar um surto de malária que grassava operários da Estrada de Ferro Central do Brasil, no norte de Minas Gerais, teve conhecimento da existência de barbeiros (triatomíneos) na região, os quais passa a investigar como um possível transmissor de alguma zoonose humana. Examina os triatomíneos e encontra microorganismos flagelados no intestino posterior de alguns exemplares. Preocupado com a possibilidade de que estas formas parasitárias representassem estágios evolutivos do *T. minasense* que infectavam todos os sagüis da região, envia-os para Manguinhos para serem alimentados em *Callithrix* livres de infecção. Passadas algumas semanas, retorna a Manguinhos e encontra tripanosomas no sangue periférico de um dos animais, que reconhece como uma nova espécie, diferente do *T. minasense* e de qualquer outra espécie do gênero. Denomina-o *Schizotrypanum cruzi* (mais tarde denominado *Trypanosoma cruzi*), em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz. Regressa então a Lassance para identificar o hospedeiro vertebrado, sendo que encontra um gato infectado após examinar inúmeros casos negativos em habitantes da região. Na ocasião, depara-se com uma criança febril, que se encontrava normal 20 ou 30 dias antes, na

mesma residência em que se estava o gato, encontrando formas circulantes do *T. cruzi*, concluindo assim que ocorrera uma nova tripanossomíase humana (revisão em BRENER, 1989).

1.2 Caracterização do *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) é um protozoário hemoflagelado do Filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981), Classe Kinetoplastidea (Honigberg, 1963), Ordem Trypanosomatida (Kent, 1880) e família Trypanosomatidae.

Vários estudos feitos sobre a biologia do *T. cruzi* indicam uma grande diversidade de comportamento. Esta diversidade estaria relacionada a uma adaptação das relações entre o parasita e seu hospedeiro, de maneiras a causar o mínimo de dano ao reservatório para não comprometer sua existência do parasita. Portanto, a depender de onde o isolado tenha vindo (ou seja, a situação ecológica ao qual tinha se adaptado, incluindo reservatórios, vetores, etc), este poderia apresentar comportamentos biológicos no homem (e outros animais exóctones, como camundongos de laboratório) diferentes de outros isolados. Entretanto, o comprometimento do organismo hospedeiro depende do padrão de resposta imunológica à invasão pelo parasito e das características biológicas do parasito. Assim, cada isolado feito em pacientes possuiria características biológicas próprias, sendo cada um identificado como "cepa". Isto é possível porque o *T. cruzi* não se reproduz sexualmente (ou se o faz é muito raramente), sendo o fluxo gênico praticamente inexistente (SOUTO et al, 1996; TAIT, 1983). Deste modo, as

variações biológicas e genéticas em *T. cruzi* são decorrentes do acúmulo de mutações de múltiplas linhas clonais.

Prosseguindo com o estudo das cepas, ANDRADE (1974), verificou, no modelo experimental do camundongo, que o comportamento biológico de alguns isolados (cepas) estudados apresentava padrões comuns, os quais compartilhariam aspectos histopatológicos, de virulência e patogenicidade semelhantes, enquadrando-os em 3 biodemas: biodema I, que se caracteriza pela rápida multiplicação parasitária com picos muito elevados entre 9 e 10 dias e acentuado reticulotropismo no início e miotropismo com o avanço da infecção (cepa Peruana por exemplo); biodema II, possuem multiplicação lenta com piques irregulares entre 12 e 20 dias de infecção, com discreto reticulotropismo e lesões miocárdicas em todo o curso da infecção (exemplo a cepa 21SF); biodema III, que tem como característica a multiplicação parasitária muito lenta, atingindo picos parasitêmicos muito elevados entre 20 e 30 dias, e miotropismo em todo o curso da infecção (ANDRADE, 1974).

1.3 O Ciclo Biológico

O ciclo do *T. cruzi* normalmente oscila entre um reservatório (numerosas espécies de mamíferos terrestres ou arborícola) e um vetor hematófago (sempre hemípteros da subfamília Triatominae).

Costuma-se descrever que existem dois ciclos espacialmente definidos: o silvestre, mais antigo e abrangente, e o doméstico, mais restrito e recente. Estes diferem entre si pela espécie do vetor e, sobretudo, do reservatório, onde, no doméstico, é o homem e seus animais de estimação, como o cão e gato, e no silvestre, outros mamíferos, principalmente os marsupiais, os desdentados, os roedores, os Chiroptera, primatas e lagomorfos. Entretanto, em ambos os ciclos, a maior parte das infecções ocorre com a participação do vetor hemíptero (revisão em DIAS, 2000). Recentemente foram encontradas formas descritas para o ciclo doméstico em marsupiais e em indivíduos que adquiriram a infecção pela via de transmissão oral (ANDRADE, S.G, comunicação pessoal, 2006).

No hospedeiro vertebrado o *T. cruzi* é encontrado na corrente sanguínea na forma tripomastigota. Esta forma não tem a capacidade de replicação, mas a de infecção, podendo invadir virtualmente qualquer célula. Ao invadir a célula, esta passa por uma transformação para a forma amastigota, a qual se apresenta com um flagelo muito curto, muitas vezes dentro da própria bolsa flagelar, e um cinetoplasto em forma de bastão na extremidade oposta. Esta é a forma replicativa do *T. cruzi* e se divide binariamente. Estas se transformam em formas

tripomastigotas novamente e, após a ruptura celular, caem na corrente sanguínea para infectar outras células, repetindo tal processo (revisão em REY, 2002).

O ciclo do parasita no vetor começa quando este ingere sangue contaminado durante o repasto sanguíneo, adquirindo formas tripomastigotas sanguícolas. Ao chegar no estômago, a forma tripomastigota se transforma gradualmente na forma epimastigota. No intestino médio começa a fase de replicação das formas epimastigotas através de divisões binárias sucessivas, o que pode ser observado 25 horas após o repasto sanguíneo (revisão em SOUZA, 2000). Já no intestino posterior ou reto, os epimastigotas evoluem para tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes expulsas com as dejeções do inseto no momento em que este faz novo repasto sanguíneo. A duração do ciclo no transmissor é influenciada por múltiplos fatores, oscilando entre 6 e 15 dias (revisão em RASSI, 1987). Em contato com a mucosa ou pele lesionada, através de solução de continuidade, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram nas células do hospedeiro mamífero, principalmente nas do tecido conjuntivo e em células do Sistema Fagocítico Mononuclear, refazendo, desta forma, seu ciclo geral.

O *T. cruzi* pode ser transmitido também sem um vetor hemíptero. Isto ocorre no ciclo silvestre entre os carnívoros e os Chiroptera, que se alimentaram de algum mamífero infectado. No ciclo doméstico, ocorre através das vias congênita e transfusional principalmente.

1.4 O Vetor

Entre as espécies de triatomíneos vetores da doença, o *Triatoma infestans* se destaca, em especial, por sua extensa distribuição e pelo número de infecções que causa. Juntamente com o *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*, estes são os principais vetores da transmissão da tripanossomíase americana (Doença de Chagas) no Brasil (revisão em SHERLOCK, 2000). Estas são espécies domiciliares, isto é, se adaptam facilmente às construções, principalmente casas de barro e madeira, onde há abrigo contra a luminosidade. Esta domicialização é o fator que mais eleva o risco de transmissão do *T. cruzi* para o homem (revisão em WHO, 2002).

O *Triatoma infestans* é muito importante e está hoje em fase de erradicação de acordo com a Fundação Nacional de Saúde, apresentando focos na Bahia, Minas Gerais e Rio Grandes do Sul. No Brasil, a redução de infecção no grupo etário de 0-7 anos foi de 95%, durante o período de 1980 a 1999. Esta redução acompanha os dados de infestação pelo *T. infestans*, onde o número de triatomíneos capturado em casas de áreas endêmicas pelos agentes do programa de controle caíram de 166.000 (em 1975) para 611 (em 1999), uma redução de 99,7%. Com isso, 8 dos 12 estados que compõem a área endêmica no Brasil (a qual cobre o 3,6 milhões de km² do território nacional - 36% - distribuídos em 2493 municípios) foram certificados livres da transmissão em 2000 (revisão em WHO, 2002).

Com a redução da transmissão, a incidência da Doença de Chagas caiu cerca de 65% entre 1983 (onde eram computados 700.000 novos casos por ano) e 2000 (onde foram relatados menos de 200.000 novos casos) (revisão em WHO, 2002).

1.5 A Doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta-se sob dois estágios básicos, que são temporalmente definidos: a fase aguda, a qual se estabelece no início da infecção e dura cerca de 6 a 8 semanas, e a fase crônica, que aparece logo em seguida (revisão em WHO, 2002).

A forma aguda ocorre a partir do início da infecção pelo *T. cruzi* e correlaciona-se com a fase de crescimento populacional do parasito no hospedeiro (revisão em ARAÚJO-JORGE, 2000). A porta de entrada, geralmente, apresenta-se edematosa, podendo apresentar um chagoma de inoculação e/ou um sinal de Romaña. Os sintomas que seguem a inoculação são febre, polilinfoadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia, podendo aparecer também vômitos, diarreia e anorexia. Eletrocardiogramas podem mostrar sinais de envolvimento cardíaco, como taquicardia sinusal, baixa voltagem QRS ou mudanças nas ondas T primárias. Entretanto, estas anormalidades cardíacas desaparecem espontaneamente, na maioria dos casos, em 4 a 8 semanas (revisão em WHO, 2002).

A fase crônica aparece logo depois que o hospedeiro começa a montar uma defesa imune específica eficiente contra o *T. cruzi*, com a proliferação clonal de linfócitos e produção de imunoglobulinas. Assim, o controle parasitário se acentua, o que pode ser visto com a queda parasitêmica para níveis não detectáveis em sangue periférico. Estabelece-se, então, um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro, o qual pode permanecer até o fim da vida do paciente. De fato, 50 a 70% dos pacientes permanecem assintomáticos pelo resto da vida, sendo a infecção identificada pela persistente presença de IgG convencional contra *T. cruzi* e por exames parasitológicos, como xenodiagnóstico, reação de PCR e hemocultura. Esta caracteriza a forma indeterminada da doença (revisão em WHO, 2002).

Entretanto, anos depois do começo da forma crônica da doença, 10 a 40 % dos indivíduos, dependendo da área geográfica, irá desenvolver lesões em vários órgãos, principalmente no coração e no sistema digestivo. Esta condição é designada forma crônica cardíaca ou forma crônica digestiva da doença de Chagas (revisão em WHO, 2002) A cardiopatia chagásica é a consequência mais importante na infecção pelo *T. cruzi*. Esta se expressa em cerca de 30 % dos indivíduos crônicos, 5 a 30 anos após o fim da fase aguda (ANDRADE, 1983). As principais manifestações clínicas são falência e arritmia cardíaca, e tromboembolismo, levando freqüentemente a uma morte súbita. O coração apresenta lesões envolvendo ambos os ventrículos, produzindo edema e hepatomegalia congestiva. Insuficiência mitral e da válvula tricúspide, devido à sua dilatação, também estão presentes. Nestes corações são encontrados trombos

intraventriculares, os quais são a principal fonte de embolia pulmonar, cerebral, hepática e renal no paciente chagásico (revisão em WHO, 2002). A causa desta cardiopatia está nas lesões teciduais decorrentes da resposta imunológica do hospedeiro contra o parasita (por hipersensibilidade ao antígeno parasitário presente no tecido, como demonstrado por YOUNÈS-CHENNOUFI e colaboradores em 1988) ou ainda mecanismos auto-imunes (revisão em MENGEL & ROSSI, 1992). Já a forma digestiva acontece devido à destruição da inervação entérica autônoma, produzindo uma deficiência na mobilidade e conseqüente disfunção do sistema digestivo. As principais anormalidades que estão presentes são o megacólon e o megaesôfago, inicialmente descritas por KOEBERLE & PENHA (1959) em seres humanos (revisão em WHO, 2002).

1.6 Modelos Experimentais

O uso de espécies animais como modelos de experimentação na doença de Chagas têm sido feito desde sua descoberta (revisão em ANDRADE, 2000). Isto têm sido realizado por causa das restrições biológicas envolvidas nos estudos com seres humanos, onde seria difícil a obtenção de biópsias de chagásicos para o estudo da patologia. Assim, só no modelo animal pode-se analisar mais profundamente os processos patológicos envolvidos na evolução da doença.

Vários animais, envolvendo cães, cobaias, macacos, ratos, camundongos, coelhos e, mais recentemente, o roedor *Calomys callosus* têm sido utilizados. Normalmente, a escolha do modelo experimental é feita levando-se em conta o

problema a ser investigado e o conhecimento prévio das potencialidades de sua resposta. Contudo, tal escolha pode ser direcionada com o objetivo de esclarecer aspectos obscuros ainda não respondidos através do estudo de modelos clássicos. Neste caso, procura-se identificar as peculiaridades da resposta ao parasito na evolução da infecção em outras espécies animais (revisão em ANDRADE, 2000).

De todos os modelos, o camundongo é, sem dúvida, o mais utilizado. O estudo sistemático realizado em diferentes linhagens infectadas pelo *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco, bem semelhantes àquelas da doença humana (ANDRADE & ANDRADE, 1985c). Além do mais, é um animal de rápida multiplicação, fácil manuseio, pequeno porte e relativo baixo custo de produção, além de ser um modelo já bem estabelecido e que conta com uma vasta gama de reagentes específicos disponíveis no mercado. Com isso, muitas linhagens de camundongos foram desenvolvidas com o objetivo de analisar mais profundamente a participação do hospedeiro na patogenia desenvolvida na infecção. Isto inclui animais isogênicos, transgênicos e *knock out*, para determinado gene. Existe também a possibilidade da utilização de vários reagentes específicos para camundongos que permitem identificar vários tipos celulares e suas moléculas de superfície ou intracelulares.

Nos estudos experimentais é importante estabelecer com acurácia a relação parasito-hospedeiro, a qual depende não só da linhagem do camundongo, mas também do tipo do parasito. O estudo dos modelos experimentais permite avaliar

as diferentes fases da doença, desde sua fase aguda até a fase crônica cardíaca e digestiva (revisão em ANDRADE, 2000).

Na fase aguda da doença, as características da cepa utilizada podem levar a evoluções diferentes. Esta característica pode culminar na morte precoce dos animais, quando infectados por cepas do biotipo Tipo I, ou permitir uma sobrevivência mais longa, como ocorre com cepas dos biotipos Tipo II e III (ANDRADE et al, 1985; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

1.7 Resposta Imune Experimental ao *T. cruzi*.

1.7.1 Imunidade Inata

A resposta imune inata ao *T. cruzi*, embora não consiga controlar sua multiplicação no hospedeiro é necessária para o estabelecimento de uma imunidade adquirida eficiente contra o parasita. De fato, a qualidade de uma resposta imune adquirida, se será direcionada para um padrão tipo Th1 ou Th2, é fortemente influenciada por citocinas como IL-12, TGF β e, sobretudo, IL-4, liberadas durante a resposta imune a um determinado parasita (LE GROS et al., 1990; SWAIM et al., 1990).

A ineficiência do controle parasitário pela resposta imune inata se deve em parte, à resistência que as formas infectivas tripomastigotas têm à ação lítica do

complemento, mesmo sendo a via alternativa do complemento ativada por estes. Isto está relacionado com a expressão de proteínas na superfície do parasita (como a T-DAF e gp160), com propriedades semelhantes ao DAF humano (do inglês “*decay-accelerating factor*” ou CD55), uma proteína da membrana que desestabiliza a estrutura da C3-convertase depositada (TAMBOURGI et al, 1993; NORRIS et al, 1991).

A invasão de diversos tipos celulares pelo *T. cruzi*, em especial de macrófagos, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam uma resposta inata contra o parasita (REED, 1995). Macrófagos, através do reconhecimento de padrões moleculares antigênicos passam a produzir IL-12 e $TNF\alpha$. A IL-12 induz células NK a produzirem $IFN\gamma$, o qual, juntamente com o $TNF\alpha$, ativa os mecanismos microbicidas do macrófago. Entre eles está a produção de moléculas reativas de oxigênios, como o NO, em decorrência da indução da síntese de iNOS após estimulação com $IFN\gamma$ (CARDILLO et al, 1996; ALIBERTI et al, 1996).

A ativação dos macrófagos e das células dendríticas durante a imunidade inata, através do reconhecimento de padrões moleculares não próprios do hospedeiro faz com que estas células migrem para os órgãos linfóides periféricos e passam a apresentar antígenos do parasita a linfócitos T, iniciando assim a imunidade adquirida.

1.7.2 Resposta Imune Adquirida na Doença de Chagas

A necessidade da resposta imune adquirida para o controle da infecção pelo *T. cruzi* é inquestionável. De fato, animais *nude* ou SCID (animais desprovidos de linfócitos T CD4 e T CD8) não são capazes de controlar a infecção pelo *T. cruzi* e morrem precocemente devido a uma exagerada carga parasitária. ROTTENBERG et al (1990) demonstraram que a transferência de linfócitos esplênicos de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* era capaz de aumentar a resistência de camundongos ao desafio com o parasita vivo. Mais ainda: demonstrou que o pré-tratamento de tais linfócitos com anticorpo anti-L3T4 (CD4) ou anti-Lyt2.2 (CD8) diminuiu parcialmente a resistência proporcionada com a transferência. Ao contrário, a injeção de timócitos *in vivo* aumenta a susceptibilidade de animais Balb/c *nude* transferidos com esplenócitos (CARDILLO et al, 1998).

Em um outro trabalho, utilizando-se de animais KO para CD4 ou CD8, ROTTENBERG et al (1993) confirmou a importância de tais células, visto que estes animais apresentavam uma susceptibilidade elevada à infecção pelo *T. cruzi*. De fato, ambas as células T CD4 e T CD8 estão presentes nos infiltrados inflamatórios que ocorrem na Doença de Chagas controlando a replicação parasitária e, inevitavelmente, de forma direta ou não, induzindo destruição tecidual (SATO et al., 1992; RIBEIRO dos SANTOS et al., 1992). Tais infiltrados demonstraram ser predominantemente de linfócitos T CD8 no rato (SATO et al, 1992) e tanto linfócitos T CD4 como T CD8 em camundongos, dependendo da

cepa utilizada e do desenho experimental descrito (RUSSO et al, 1988; ARAUJO, 1989; RIBEIRO dos SANTOS et al, 1992; TARLETON, 1990).

A falta de células T CD4 se traduz, além de uma mudança nos padrões de citocina liberadas durante a infecção (ROTTENBERG et al 1993), em deficiência de geração de células plasmáticas e conseqüentemente, na diminuição da produção policlonal de anticorpos (MINOPRIO et al, 1987). Embora seja secundária em relação à importância da imunidade celular no controle da infecção pelo *T. cruzi*, a imunidade humoral é indispensável para uma resposta tardia eficaz e duradoura (KUMAR & TARLETON, 1998). Neste mesmo sentido, animais deficientes de células B sucumbem à infecção pelo parasita (NIHEI, 2005).

A importância das células T CD8+, embora esteja bem fundamentada, parece não ser devido à sua capacidade citolítica via perforina/granzimaB, visto que animais com defeitos neste mecanismo de citotoxicidade não apresentam significativa susceptibilidade ao *T. cruzi* (KUMAR & TARLETON, 1998). Tais células são mantidas na infecção como células de memória efetora e se expandem rapidamente sob estímulo, embora sua geração inicial de clones específicos contra o *T. cruzi* seja, aparentemente, lenta. A capacidade de produzir IFN γ é, provavelmente, a mais importante função desta célula na manutenção do controle da infecção (revisão em MARTIN & TARLETON, 2004) e a manutenção da memória imunológica nesta população celular durante a fase crônica da infecção parece ser dependente de células T CD4+ de memória (NIHEI, 2005)

1.7.3 Ativação e Memória

O timo de um camundongo jovem envia diariamente para a periferia cerca de 1% de seus timócitos como células maduras, as quais se alojam nos órgãos linfóides periféricos, como o baço, linfonodos e placas de Peyer (SCOLLAY et al, 1980). Tais células, denominadas de “naïve”, por não terem sido ativadas por APCs (células apresentadoras de antígeno), apresentam certos marcadores de superfície que os permite identificar. Entre eles se encontram o CD62L (molécula que direciona o linfócito para linfonodo), o CD45RB, além de expressarem baixos níveis de certas moléculas, como o CD44 (SPRENT, 1993). Entretanto, quando tal célula é ativada, o que se dá pelo reconhecimento (através do TCR) do antígeno associado à moléculas de MHC apresentado por APCs (juntamente com um co-estímulo, especialmente B7.1 ou B7.2), esta modula várias de suas moléculas de superfície, que serão fundamentais para desempenharem sua função (SPRENT, 1993). Assim, o linfócito T recém ativado passa a expressar CD69 e CD25, a qual é necessária para formar o IL-2R de alta afinidade e assim, receber de forma autócrina ou parácrina, o estímulo da IL-2 necessário para sua multiplicação clonal (CERDAN ET AL, 1995; revisão em MINAMI 1993). O linfócito, após ativação, começa então a diminuir a expressão de certas moléculas, como a CD45RB, enquanto aumenta a de outras, como a CD44, que é uma molécula importante para a função do linfócito T, já que o direciona para o sítio inflamatório. Outra molécula, como o CD62L tem geralmente sua expressão diminuída em muitas células ativadas, para formar o grupo de células de memória efetora, a qual está em constante circulação entre os tecidos, enquanto outras permanecem com esta

molécula, formando o grupo de células de memória central, normalmente circulando entre os linfonodos (SPRENT, 1993; SPRENT & SURH, 2001).

De um modo geral, a resposta imune adquirida a um determinado patógeno se caracteriza pela ativação e expansão clonal de linfócitos T e B específicos para determinantes antigênicos expressos pelo patógeno (FEARON & LOCKSLEY, 1996). Na infecção pelo *T. cruzi*, entretanto, ocorre uma intensa ativação policlonal linfocitária (MINOPRIO et al, 1986), como mostrado em estudos de repertório de receptores antigênicos expressos por células T (TCR) que confirmam a natureza policlonal da expansão de células T CD4, mas uma maior restrição a determinadas cadeias V β por parte dos linfócitos T CD8 (LEITE-DE-MORAES et al, 1994). Além disso, há uma produção de uma vasta gama de anticorpos de variadas especificidades (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM) (ANDRADE et al, 1985b), sendo os da classe IgG2b aqueles que podem apresentar atividade protetora (TAKEHARA et al, 1981; STEFANI et al, 1983), além de anticorpos auto-reativos (MINOPRIO et al, 1989). Muitos destes clones ativados pela infecção não são específicos para antígenos do *T. cruzi* (MINOPRIO & COUTINHO, 1988).

A intensa ativação policlonal que acontece durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é seguida de uma maciça apoptose de linfócitos T e B (LOPES & DOS REIS, 2000). A elevada quantidade de NO produzida durante a fase aguda parece ser um dos fatores responsáveis por tal apoptose, e conseqüente imunossupressão (MARTINS et al, 1998). Por outro lado, DE MEIS et al (2006)

mostraram que Fas-L está envolvido na apoptose de linfócitos T CD4 e B, enquanto o TNFR1 está relacionado à apoptose de linfócitos T CD4 e CD8, resultando na atrofia de linfonodos mesentéricos nos animais infectados pelo *T. cruzi*.

1.7.4 Citocinas na Infecção pelo *T. cruzi*.

As citocinas desempenham um papel fundamental na transmissão de estímulos à distância e estão envolvidas, sobretudo, na comunicação entre diversos tipos celulares na montagem de uma resposta imune adequada. Na infecção pelo *T. cruzi*, diversas citocinas são produzidas e suas qualidades e quantidades são dependentes de vários fatores, incluindo a virulência da cepa do parasita, o tipo de hospedeiro e a presença ou não de reinfeções (SAMUDIO et al, 1998; REVELLI et al, 1999). Algumas citocinas são expressas preferencialmente durante a fase aguda da infecção, enquanto outras predominam durante a fase crônica. O $\text{TNF}\alpha$, citocina associada à promoção da inflamação tecidual é encontrada no soro de animais Balb/c infectados com *T. cruzi* já a partir do quinto dia pós infecção, enquanto $\text{IFN}\gamma$ só foi verificado no soro a partir do 15º dia (REVELLI et al, 1999). Entretanto, ZHANG et al (1996) e CARDILLO et al (1996) verificaram que o $\text{IFN}\gamma$ já começa a ser produzido no baço a partir da primeira semana, permanecendo durante a fase crônica da infecção. Por outro lado, a IL-10 começa a ser detectável no baço a partir da segunda semana, e no soro, a partir da terceira semana pós-infecção. Interessantemente, esta citocina permanece elevada

mesmo o IFN estando presente em altos níveis (REVELLI et al, 1999; ZHANG et al, 1996; CARDILLO et al, 1996).

A IL-2, apesar de ser produzida a partir da primeira semana (CARDILLO et al, 2004), não é mais encontrada a partir da terceira semana (ZHANG et al, 1996), mostrando ser detectável somente durante o período de intensa ativação linfocitária. Neste mesmo trabalho, os autores descrevem que em animais resistentes à infecção, esplenócitos positivos para IL-4 começam a aparecer a partir da terceira semana (assim que a IL-2 diminui), mostrando uma possível alteração no padrão de resposta no sentido de linfócitos T com diferenciação funcional para Th2 (ZHANG et al, 1996). Por esse motivo, apesar de o padrão Th1/Th2 não ser evidente, esta é uma indicação de que o desenvolvimento de células que produzam IL-4 na fase onde haja baixa produção de IL-2 possa também haver indução de resistência prolongada à infecção experimental pelo *T. cruzi*. De maneira curiosa, animais susceptíveis apresentam baixa produção de IL-2 tardia, quando comparados a animais resistentes, além de não ter sido detectada a produção de IL-4 ou IL-5 (ZHANG et al, 1996).

1.8 Os Linfócitos T CD4 Reguladores

1.8.1 Histórico

Desde que foi proposto, por GERSHON E KONDO, em 1970, linfócitos regulatórios sempre formaram uma classe distinta, ao menos no que se refere ao aspecto funcional destes linfócitos. De origem antiga, e um tanto especulativa, não apresentavam evidências diretas da real existência de linfócitos supressores. Entretanto, a necessidade de explicar a regressão da resposta inflamatória mononuclear levou imunologistas a criarem o termo “linfócitos supressores”. Este grupo de linfócitos abrangeria aqueles com capacidade de suprimir a atividade de outros linfócitos T, como os “*helper*” e os citotóxicos. Entretanto, a falta de marcadores moleculares bem como de evidências diretas da existência de um grupo especial de linfócitos T, biologicamente e funcionalmente diferentes dos demais grupos de linfócitos T, e que apresentariam função supressora, levaram ao descrédito científico de que estas células pudessem existir. A regulação da inflamação seria, assim, fruto de qualquer outro meio, que não exigiria, necessariamente, a ação de linfócitos T específicos para tal função.

Recentemente, a descoberta de que os marcadores CD4+CD25+ reconhecem uma população linfóide enriquecida por células que possuem a habilidade de limitar a resposta imune contra antígenos próprios ou externos (SAKAGUCHI et al, 1995), reacendeu a idéia da existência de uma população de células com capacidades supressoras. É importante colocar que a responsabilidade da

imunorregulação parece não ser apenas de um tipo celular. De fato, outras populações de linfócitos têm demonstrado semelhante capacidade regulatória. Assim, no modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*, foi descrito que linfócitos T esplênicos que apresentam o receptor $\gamma\delta$ pode ter atividade supressora em cultura mista de linfócitos durante a fase aguda. Este poderia ser um mecanismo pelo qual linfócitos autorreativos estariam presentes em maior intensidade em animais velhos do que novos – onde nesses últimos existe atividade supressora de células T $\gamma\delta$ (CARDILLO et al, 1993).

1.8.2 Fenótipo

O CD25, também conhecido como a cadeia alfa do receptor da IL-2, é classicamente referido como um marcador de ativação celular recente. Ele é expresso após ativação do linfócito *naïve* pela célula apresentadora de antígeno (APC) e forma, juntamente com as cadeias gama e beta, o receptor de alta afinidade pela IL-2 (revisto em SAKAGUCHI, 2004). Tal citocina é necessária para a ativação e replicação linfocitária e age de forma autócrina e parácrina. Em 1995, foi identificado por SAKAGUCHI et al, que o isolamento de células CD4CD25 era enriquecida de linfócitos T regulatórios (Tregs). Tal população, denominada posteriormente de células T regulatórias naturais (do inglês *naturally occurring Tregs* - nTregs) é praticamente em sua totalidade de origem tímica e possui como característica principal a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T estimulados via TCR. Diferentemente das células T convencionais, que diminuem

a expressão de tal marcador após ativação, as Tregs apresentam constitutivamente o marcador CD25 (HORI et al, 2003). A importância de tal molécula para as Tregs, entretanto, não está bem esclarecida. Várias linhas de evidência indicam que esta é indispensável para a manutenção da população de Tregs. De fato, animais deficientes em IL-2, CD25 (IL-2 α R) ou CD122 (IL-2 β R) desenvolvem uma doença inflamatória letal, denominada síndrome da deficiência de IL-2, a qual pode ser prevenida pela inoculação de células CD4+CD25+ juntamente com uma fonte de IL-2 (PAPIERNIK et al, 1998; MALEK et al, 2002). Do mesmo modo, o tratamento de animais com anticorpo neutralizante anti-IL-2 induz diminuição das Tregs e o aparecimento de doença autoimune. Curiosamente, a IL-2 necessária para a manutenção destas células parece ser proveniente de células não-regulatórias recém ativadas, CD4+CD25^{baixo}, as quais incluem células auto-reativas (SETOGUCHI et al, 2005). Isto porque Tregs, além de serem anérgicas, proliferando pouco após estímulo do TCR, são incapazes de produzir IL-2, ao menos sobre estímulos convencionais utilizados em ensaios in vitro, tais como anti-CD3, concavalina A (ConA) ou células apresentadoras de antígeno (APC) esplênicas (FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004). Além da manutenção, a IL-2 parece ser também necessária para ativar a função supressora das Treg (PAPIERNIK et al, 1998; THORNTON et al, 2004).

Além do CD25, foi verificado que tais células com capacidade supressora expressam também uma variedade de marcadores de superfície, mas comumente relacionados às células ativadas e/ou de memória, entre eles o CD45RB^{low},

CD62L, CD103, CTLA-4 (do inglês *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, CD152) e GITR (do inglês *glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene*) (FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004). O CD103 (integrina $\alpha E\beta 7$), em especial, em adição ao CD25, torna-se um importante marcador para Tregs. Enquanto apenas 4% das células CD4⁺ provenientes de órgãos linfóides são positivas para o CD103, esta proporção aumenta para 25% quando se analisa as células CD4⁺CD25⁺. Além disso, os linfócitos CD4⁺CD25⁺ $\alpha E\beta 7$ ⁺ possuem uma elevada atividade supressora, podendo exercer sua atividade regulatória mesmo estando em baixíssimas proporções (taxas de 1:19). Diferentemente, sua contraparte $\alpha E\beta 7$ ⁻ necessita de proporções muito maiores para exercer sua função supressora, assim também como linfócitos negativos para CD25 (CD25⁻) e que são CD4⁺ e $\alpha E\beta 7$ ⁺ (LEHMANN et al, 2002).

Nenhum dos marcadores de superfície citados até então identifica unicamente as Tregs, sendo estes expressos também em outros tipos celulares. Em 2003, entretanto, analisando animais “*Scurfy*”, os quais desenvolvem uma doença linfoproliferativa semelhante a IPEX (do inglês “*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*”) em humanos, HORI et al (2003) e KHATTRI et al (2003) demonstraram que tais animais eram deficientes de nTregs, em virtude de possuírem uma forma defeituosa do gene *Foxp3*. De fato, a expressão retroviral deste gene em células *naive* é capaz de convertê-las em células com fenótipo regulatório, inclusive com atividade supressora e expressando o GITR (KHATTRI et al, 2003; HORI et al, 2003). *Foxp3* mRNA e seu

produto protéico, o “*Scurfin*”, parecem ser uma característica única das células T regulatórias, pelo menos no camundongo, não sendo expresso por nenhuma outras linhagens de linfócitos (FONTENOT et al, 2003). Ainda que exista uma pequena população de células Foxp3+CD25-, é importante ressaltar que tais linfócitos ainda mantêm sua atividade supressora, embora sejam negativos para CD25 (FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004).

Uma outra molécula, o GITR, está associada às células CD4+CD25+ com capacidades regulatórias. Como a maioria dos marcadores utilizados para identificar as nTregs, este também tem sua expressão aumentada em linfócitos T CD4+ ativados (McHUGH et al, 2002). Além disso, seu bloqueio com anticorpo neutralizante DTA-1 (anti-camundongo GITR) é capaz de impedir a supressão *in vitro* por parte das células CD4+CD25+, bem como leva à indução de autoimunidade através do aumento da proliferação de células CD4+CD25- (SHIMIZU et al, 2002; KANAMARU et al, 2004). Contudo, é provável que a ligação do DTA-1 às células T CD4+CD25- ativadas, e não às nTregs, induz sua resistência à supressão. Seu ligante, o GITRL é expresso em APCs, sendo esta diminuída com a maturação (TONE et al, 2003).

1.8.3 Mecanismo de Ação

Apesar da caracterização fenotípica das células Tregs estar bastante avançada e, sua função supressora estar sendo estabelecida, os mecanismos que estas células utilizam para exercer tal função é um tema bastante controverso. Entretanto, parece que a função imunossupressora deste tipo celular é dependente de contato com a célula alvo. Tais células são incapazes de exercer supressão *in vitro* quando estas são separadas das células alvo através de membranas permeáveis a moléculas mas não à células. Assim, um forte candidato seria o CTLA-4, visto que animais *knockout* para tal molécula de superfície desenvolvem doença linfoproliferativa fatal devido a uma falha na indução de apoptose em linfócitos e, conseqüentemente, uma sobrevivência elevada destes (WATERHOUSE et al, 1995). Embora alguns estudos apontem o CTLA-4 como molécula alvo das Tregs, outros excluem a possibilidade desta estar envolvida na supressão linfocitária. De fato, linfócitos de animais CTLA-4 *-/-* são prontamente suprimidos por células CD4+CD25+ de animais normais, da mesma forma que linfócitos de animais intactos. Não obstante, é importante que os linfócitos Tregs possuam o CTLA-4 para exercerem sua função, visto que linfócitos CD4+CD25+ provenientes de animais CTLA-4 *-/-* são incapazes de exercer atividade supressora. Um detalhe interessante reside no fato de que Tregs de animais deficientes para o CD28 (molécula que compete com o CTLA-4 pelo B7.1 e B7.2 das APCs) não são funcionalmente modificadas, apontando para a idéia de que o CTLA-4, mas não o CD-28, é necessário para a ativação das Tregs (TAKAHASHI et al, 2000).

Estudos têm mostrado que a IL-10 é importante para a atividade supressora de Tregs. Se por um lado, as células CD4CD25⁺ são incapazes de suprimir células CD4CD25⁻ sem que haja contato, modelos experimentais de IBD (do inglês “*inflammatory bowel disease*”) mostram que, ao menos *in vivo*, a atividade da CD4CD25⁺ parece ser dependente da IL-10, visto que nTregs provenientes de animais IL-10 KO são incapazes de atividade supressora, como descrito pela equipe de BANDEIRA (ANNACKER et al, 2001). Aparentemente, a nTreg após estímulo do TCR aumenta sua expressão de IL-2R, diminuindo assim a quantidade de IL-2 do microambiente, ao mesmo tempo que passa a produzir IL-10, a qual exerceria sua atividade supressora (BARTHLOTT et al, 2005).

Uma outra molécula que parece estar associada à ação das células nTregs é o TGF β 1. Embora alguns trabalhos tenham apontado para o TGF β de membrana como meio pelo qual a nTreg induz supressão, células CD4CD25⁺ de animais TGF β KO possuem atividade funcional inalterada. Entretanto, tais células regulatórias são incapazes de suprimir linfócitos CD4⁺CD45RB^{alto} provenientes de animais dnT β RII (do inglês *dominant negative TGF- β receptor type II*), mostrando que uma fonte externa de TGF β pode ser necessária, juntamente com a nTreg, para induzir supressão no modelo experimental de colite auto-imune (FAHLÉN et al, 2005). Contudo, outros trabalhos mostram que o TGF β é completamente dispensável para a ação supressora das nTregs, ao menos *in vitro* (PICCIRILLO et al, 2002).

1.9 A Ciclofosfamida e Seu Efeito Sobre a Infecção Crônica pelo T. cruzi.

A Ciclofosfamida (CY), um dos vários compostos derivado da mostarda de nitrogênio, foi sintetizado em 1958 por ARNOLD et al e, em 1967 foi confirmado por BROCK & HOHORST ser uma excelente substância para uso terapêutico contra tumores. Embora tenha sido desenhado para ser metabolizado nas células alvo tumorais liberando Nor-mostarda de nitrogênio, foi verificado que tal droga necessitava ser parcialmente metabolizada por microssomos de hepatócitos para se tornar ativa (FOLEY et al, 1961). De fato, a Ciclofosfamida no estado primário não apresenta atividade tóxica sobre células tumorais ou linfócitos quando incubados *in vitro* (CONNORS et al, 1970). Entretanto, o soro de animais que foram recentemente injetados com CY apresentavam altos níveis de toxicidade quando acrescentados à cultura de tais células (BERENBAUM et al, 1973). Hoje em dia sabe-se que a Ciclofosfamida é convertida a 4-hidroxíciclofosfamida, por oxidases hepáticas, a qual existe em equilíbrio com seu tautâmero, a Aldofosfamida. A Aldofosfamida é então convertida à carboxifosfamida, sem atividade citotóxica relevante, através de sua oxidação pela enzima Aldeído Dehidrogenase (ALDH). Entretanto, em tipos celulares com baixos níveis de ALDH, a Aldofosfamida é dissociada espontaneamente a Fosforamida Mostarda (e Acroleína), a qual possui, juntamente com seu derivado, o Nor-N-mostarda, uma elevada atividade citotóxica (CONNORS et al, 1974; BROCK, 1996).

A atividade citotóxica dos metabólitos da Ciclofosfamida está intimamente relacionada ao radical-N-mostarda ($-N(C_2H_4Cl)_2$) e é sobretudo acentuada no composto Fosforamida mostarda. Ela é capaz de formar ligação cruzada entre as cadeias de DNA, levando principalmente as células que ciclam rapidamente à morte (BROCK, 1996). Esta propriedade de matar seletivamente células com baixos níveis de ALDH e/ou que ciclam rapidamente dá à Ciclofosfamida um enorme potencial clínico, podendo ser utilizada com segurança no tratamento quimioterápico de linfomas e também na imunossupressão. Pode ser então, utilizado como alternativa à irradiação, tanto para induzir tolerância (evitando a rejeição de transplantes), quanto no combate a desordens auto-imunes como o lúpus eritematoso sistêmico e anemia hemolítica auto-imune, por exemplo (revisão em BRODSKY, 2002). De fato, pulsoterapia com Ciclofosfamida (muitas vezes associado a outras drogas, como corticosteróides) é o tratamento padrão para o lúpus eritematoso - embora o reagente "micofelonato mofetil" tenha mostrado vantagens consideráveis sobre este, apresentando maior taxa de cura e efeitos colaterais mais brandos (ADAMS et al, 2006; GINZLER et al, 2005).

Os efeitos colaterais da Ciclofosfamida são normalmente relacionados à dosagem utilizada e ao período de tratamento, sendo decorrentes da citotoxicidade da Ciclofosfamida sobre outros tipos celulares ou da imunossupressão que provoca no paciente, deixando-o susceptível a infecções (OPASTIRAKUL & CHARTAPISAK, 2005) ou agravando doenças infecciosas crônicas (PRYON et al, 1996; HOUGH & ROBINSON, 1975). A multiplicação parasitária no hospedeiro pode acontecer, no caso de doenças crônicas como a Doença de Chagas, após o

tratamento dos indivíduos com reagentes imunossupressores (ALTCLAS et al, 2005; DICTAR et al, 1998). Outros efeitos colaterais são a depleção da medula óssea, alopecia, cistite hemorrágica e falência de ovário (KATSIFIS & TZIOUFAS, 2004). Embora o mecanismo pelo qual a Ciclofosfamida seja eficaz no tratamento do lúpus eritematoso não esteja bem definido, este agente pode ser capaz de resolver a deposição de complexos imunes nos rins e a nefrite. Isto pode ser em função da redução da produção de anticorpos, inclusive os anti-DNA, e modulação de quimiocinas nos sítios de inflamação, o que seria a principal causa do agravamento do quadro da doença, resultando em óbito dos indivíduos acometidos por esta desordem auto-imune (SCHIFFER et al, 2003). Curiosamente, a Ciclofosfamida, em doses próximas à utilizada no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (200-350mg/kg) é capaz de induzir diabetes auto-imune em camundongos NOD, acelerando o aparecimento da doença (HARADA & MAKINO, 1984).

A diabetes auto-imune é claramente uma doença de origem genética (WICKER et al, 1992). Deste modo, a administração de Ciclofosfamida só é capaz de induzir diabetes em camundongos NOD, sendo ineficaz na indução da doença em outras linhagens (HARADA & MAKINO, 1984). Entretanto, em um outro modelo experimental de diabetes mellitus, a de ratos BB tratados com 60-175 mg/kg da droga, a Ciclofosfamida foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença. Neste caso reduziu também os níveis de IL-2, IL-12, IFN γ , IL-1beta e TNF α , além de

aumentar as quantidades de IL-4 produzidos por esplenócitos (SOBEL et al, 2000).

Ensaio biológicos com a Ciclofosfamida têm mostrado, contudo, que sua atividade imunossupressora está intimamente relacionada à dose em que é utilizada, normalmente por volta de 200 mg/kg de massa corporal. Assim, por exemplo, o tratamento de camundongos com 250 mg/kg em uma única dose antes da infecção com *Toxoplasma gondii* é capaz de induzir um atraso no aparecimento de anticorpos, aumentando a mortalidade dos animais em 70% (HAFIZI & MODABBER, 1978). Doses mais baixas, entretanto, não demonstram tal propriedade imunossupressora generalizada; de fato parecem ser mais seletivas para determinados tipos celulares, embora não estejam ainda claramente descritas quais as células de maior ou menor susceptibilidade.

Em 1975, ASKENASE et al demonstraram que a Ciclofosfamida na dose de 20-30 mg/kg, a qual é ineficaz em suprimir a síntese de anticorpos, poderia aumentar dramaticamente a reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) quando a droga era administrada antes da sensibilização antigênica. Em um outro estudo utilizando o tratamento de Ciclofosfamida, seguido de inoculação de LPS foi verificado que clones autorreativos de linfócitos T podiam ser detectados transitoriamente (L'AGE-STEHR & DIAMANTSTEIN, 1978). Por outro lado, tratando de modelos experimentais de infecção, ANDRADE et al (1987) verificaram que cães cronicamente infectados pelo *T. cruzi* exibiam uma miocardite aumentada quando tratados com Ciclofosfamida (50 mg/kg) durante 3

semanas. Aparentemente não foi encontrada alguma imunodepressão específica contra o *T. cruzi*, sendo que os títulos de anticorpos continuaram elevados e não havia evidências de exagerada multiplicação parasitária. Em um interessante modelo que associa a infecção crônica pelo *T. cruzi* com uma atenuação da artrite induzida por adjuvante completo de Freud em ratos, REVELLI et al (1992) mostraram que o tratamento com Ciclofosfamida (40mg/kg) 48 horas antes da indução era capaz de restabelecer a artrite nos animais infectados e exacerbá-la nos ratos não infectados.

Em todos os estudos acima citados e em muito outros realizados até antes do presente estudo, a ação inibitória específica da Ciclofosfamida (em doses inferiores a 50mg/kg) sob populações linfocitárias supressoras foi apontada como um possível fator responsável pela exacerbação da resposta imune a despeito do tratamento com uma droga tida até então como imunossupressora.

2. JUSTIFICATIVA

Dados da literatura apontam para um efeito pró-inflamatório da Ciclofosfamida em baixas doses. Embora muitas especulações indicaram existir uma alteração populacional e/ou funcional de linfócitos “supressores” como fator responsável pelo aumento da inflamação observado em animais infectados e tratados com Ciclofosfamida em tais doses, nenhum estudo havia sido feito analisando diretamente a participação destas células na exacerbação da inflamação provocada pelo tratamento. Isso deveu-se, em parte, à inexistência de um marcador confiável para identificar populações linfocitárias com capacidades regulatórias. Contudo, com o recente estabelecimento de marcadores que reconhecem populações altamente enriquecidas de células com capacidade regulatórias, é possível investigar as alterações populacionais que tais células possam estar sofrendo com o tratamento. Ademais, é vantajoso conhecer as propriedades imunomodulatórias de drogas tão bem conhecidas e já utilizadas com segurança na clínica, como a Ciclofosfamida, tendo em vista, em longo prazo, a expansão de sua aplicação com fins terapêuticos. Cumpre ressaltar que será utilizada neste estudo a dose de 30mg/kg, visto que determinadas populações celulares possam estar diminuídas ou aumentadas mediante o tratamento descrito.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Investigar as possíveis alterações da resposta imune ao *T. cruzi* provocadas pelo tratamento com Ciclofosfamida na dose de 30mg/kg. Estas alterações incluem o estudo detalhado de populações esplênicas e dos infiltrados inflamatórios, marcadores de células de memória e efetora, células regulatórias e perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Verificar os efeitos pró-inflamatórios do tratamento com Ciclofosfamida (30mg/kg) no modelo de infecção crônica pelo *T. cruzi*, através da análise de parâmetros como necrose tissular, infiltrado inflamatório e fibrose;
- Analisar, através da citometria de fluxo (FACS), os perfis de memória e ativação dos esplenócitos de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e possíveis alterações com o tratamento. Serão utilizados marcadores para linfócitos T CD4 ou CD8 positivos, cada um deles conjugados à fluoresceína, sendo estas populações alternativamente marcadas para CD45RB, CD62L e CD44 conjugados à outros fluorocromos.

- Estudar os perfis de citocinas e as possíveis alterações que sucedem o tratamento, sendo este estudo realizado tanto em cultura de esplenócitos, quanto no soro de animais infectados. Serão dosadas citocinas como a IL-10, IFN γ , IL-17, IL-23 e IL-12;
- Verificar as alterações populacionais de células com capacidades regulatórias e/ou imuno-modulatórias, como as nTregs (linfócitos T CD4+CD25+CD103+) e as células NK T naturais (NKT, marcadas pelo anticorpo monoclonal NK1.1 em conjunto com o anti-receptor de células T $\alpha\beta$), tanto no baço como nos infiltrados do músculo esquelético.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos da linhagem C57Bl/6 e Balb/c com 4 a 6 semanas de vida, usados nos experimentos, foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Osvaldo Cruz. Todos os protocolos usados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animal (CEUA, CPqGM-Fiocruz).

4.2 Parasitas

Para os experimentos foram utilizadas duas cepas do *Trypanosoma cruzi*: cepa Colombiana e a cepa Tulahuen. As cepas utilizadas têm sido mantidas no Laboratório de Doença de Chagas, Autoimunidade e Imunidade Celular (LACEI-CPqGM-Fiocruz) através de sucessivas passagens em camundongos. Para efetuar a infecção dos grupos experimentais, o sangue de animais previamente infectados foi retirado, os parasitas contados segundo método descrito por MELO & BRENER (1978) e a concentração de parasitas foi ajustada para 1000 formas tripomastigotas/0,1ml, utilizando como diluente PBS (solução salina tamponada com fosfato). Cada animal recebeu então 0,1 ml da solução contendo os parasitas.

4.3 *Parasitemia*

Os níveis parasitêmicos foram avaliados pela contagem, em microscópio óptico, dos parasitas presentes em 50 campos microscópicos (magnitude de 400x) em uma lâmina contendo 5 μ l de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberta com uma lamínula 22x22 mm, segundo o método descrito por MELO & BRENER em 1978.

4.4 *Tratamento com Ciclofosfamida*

Os camundongos foram tratados (via intraperitoneal) com 30 mg/kg de Ciclofosfamida (Genuxal, Asta Médica Ltda) durante um mês, três vezes por semana. A droga era diluída no dia do tratamento, em concentração tal que cada camundongo recebesse 0,1ml da solução. Para o cálculo da concentração foi utilizado a média de peso dos animais a serem tratados. O início do tratamento se deu após o completo estabelecimento da fase crônica da doença, cerca de 4 meses após a infecção. Os animais controles foram tratados com o mesmo diluente usado como veículo para a Ciclofosfamida, geralmente PBS ou solução salina 0,9%, em condições de esterilidade.

4.5 *Protocolo Experimental*

Como mostrado na Figura 1, dois modelos experimentais foram usados: camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen, e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*. O inóculo utilizado em ambos os casos foi de 1000 formas tripomastigotas por animal. Após 4-5 meses de infecção, os animais foram tratados por um mês com Ciclofosfamida, conforme descrito acima. Dois pontos de análise foram utilizados no experimento: 7-15 dias e 4 meses após o término do tratamento. Nestes pontos, os animais foram sacrificados e coletados tecidos (músculo cardíaco em formol 10% tamponado) para análise histopatológica, células esplênicas e células mononucleares infiltrando músculo esquelético (MnIME) para análise por citometria de fluxo. A dosagem de citocinas se deu pela técnica de ELISA, tanto no soro dos animais quanto no sobrenadante de cultura de células esplênicas por 48 horas.

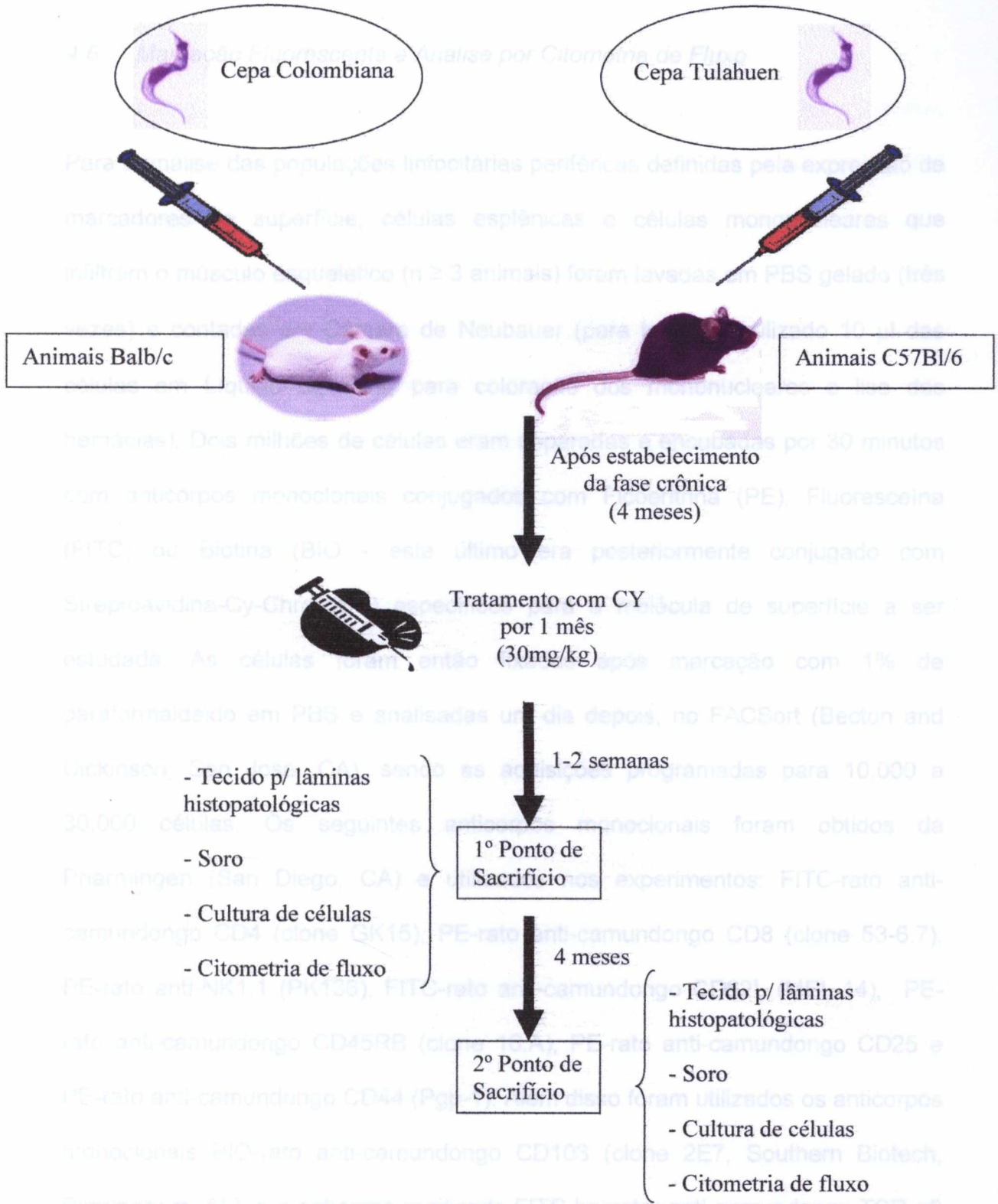


Figura 1- Desenho experimental esquemático: modelo utilizado para a investigação sobre o efeito do tratamento com Ciclofosfamida (CY) em baixas doses em animais crônicos infectados.

4.6 *Marcação Fluorescente e Análise por Citometria de Fluxo*

Para a análise das populações linfocitárias periféricas definidas pela expressão de marcadores de superfície, células esplênicas e células mononucleares que infiltram o músculo esquelético ($n \geq 3$ animais) foram lavadas em PBS gelado (três vezes) e contadas em Câmara de Neubauer (para tanto foi utilizado 10 μ l das células em Líquido de Turk, para coloração dos mononucleares e lise das hemácias). Dois milhões de células eram separadas e encubadas por 30 minutos com anticorpos monoclonais conjugados com Ficoeritrina (PE), Fluoresceína (FITC) ou Biotina (BIO - este último era posteriormente conjugado com Streptoavidina-Cy-Chrome™) específicos para a molécula de superfície a ser estudada. As células foram então fixadas após marcação com 1% de paraformaldeído em PBS e analisadas um dia depois, no FACSsort (Becton and Dickinson, San Jose, CA), sendo as aquisições programadas para 10,000 a 30,000 células. Os seguintes anticorpos monoclonais foram obtidos da Pharmingen (San Diego, CA) e utilizados nos experimentos: FITC-rato anti-camundongo CD4 (clone GK15), PE-rato anti-camundongo CD8 (clone 53-6.7), PE-rato anti-NK1.1 (PK136), FITC-rato anti-camundongo CD62L (MEL-14), PE-rato anti-camundongo CD45RB (clone 16.A), PE-rato anti-camundongo CD25 e PE-rato anti-camundongo CD44 (Pgp-1). Além disso foram utilizados os anticorpos monoclonais BIO-rato anti-camundongo CD103 (clone 2E7, Southern Biotech, Birmingham, AL) e o anticorpo purificado FITC-hamster anti-camundongo TCR $\alpha\beta$ (Caltag, Burlingame, CA).

Para análise dos dados obtidos com a leitura no FACSort, foi utilizado o software Cell Quest (Becton Dickinson). Os dados “gated” em linfócitos (granulosidade-SSC por tamanho-FSC) eram então distribuídos segundo os fluorocromos utilizados e as populações relativas de cada quadrante eram calculadas como percentagem do tipo celular que apresentava o marcador CD4+ ou CD8+, conforme o caso (Figura 2.1 e 2.2). Para cálculo das populações em número absoluto, o total numérico de cada quadrante foi multiplicado pela celularidade do baço de cada animal, e sua média apresentada em gráfico.

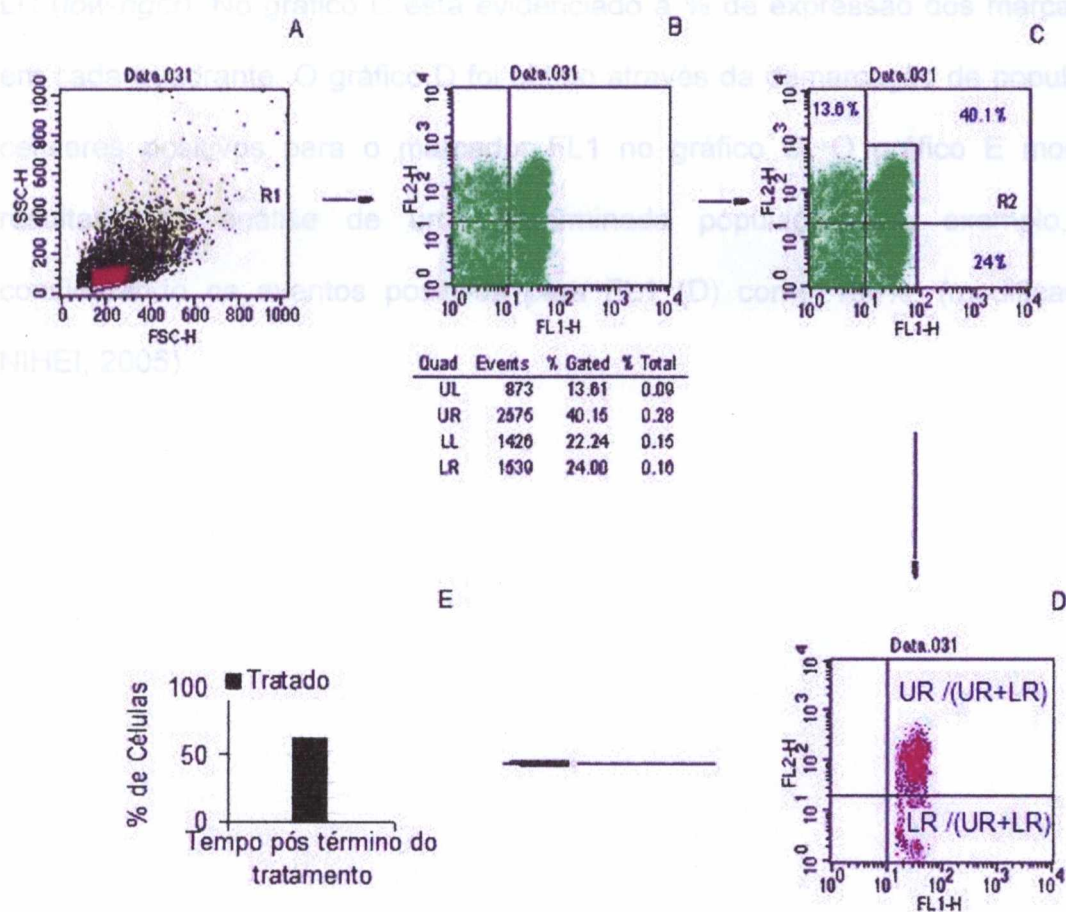


Figura 2.1. Esquema do protocolo experimental para análise dos dados obtidos do Citômetro de fluxo. De modo ilustrativo, o gráfico A mostra os esplenócitos diferenciados por granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). A região R1 no gráfico A representa uma área com alta densidade de linfócitos, a qual foi utilizada nas análises. O gráfico B mostra a população de R1 analisada para a presença de marcadores FL1 (CD4+ ou CD8+) e FL2 (para todos os outros marcadores aqui verificados). Como exemplo, acima está descrito CD62L, sendo a proporção de cada população determinada através da colocação de barreiras, separando os vários quadrantes: UL (*upper-left*), UR (*upper-right*), LL (*low-left*) e

LR (*low-right*). No gráfico C está evidenciado a % de expressão dos marcadores em cada quadrante. O gráfico D foi obtido através da demarcação de populações celulares positivas para o marcador FL1 no gráfico C. O gráfico E mostra o resultado da análise de uma determinada população (no exemplo, UR) considerando os eventos positivos para FL1 (D) como 100%. (modificado de NIHEI, 2005).

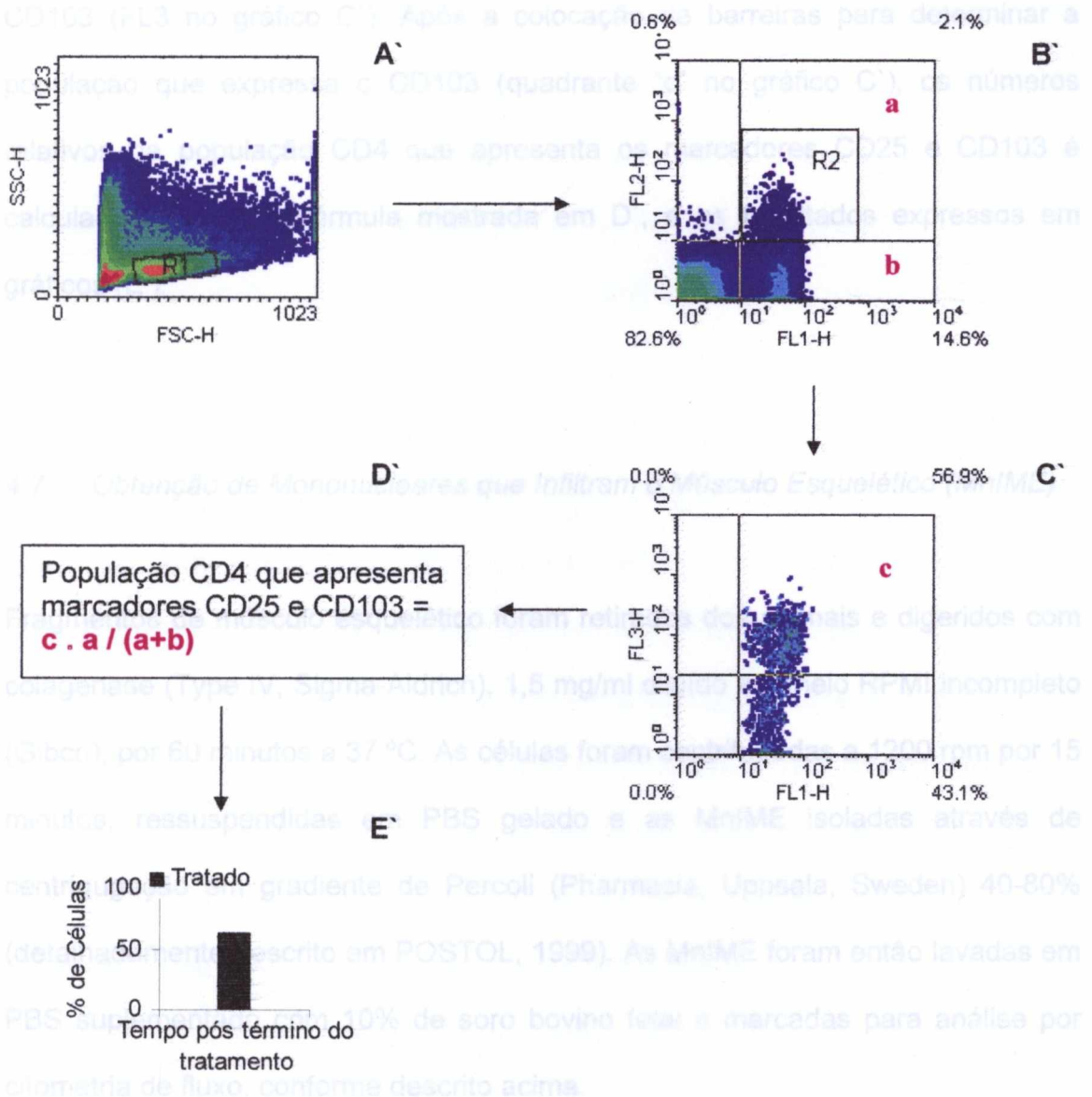


Figura 2.2. Esquema do protocolo experimental para análise das populações de nTreg (CD4+CD25+CD103+). Uma região enriquecida em linfócitos (R1 no gráfico A') através dos parâmetros de granulosidade por tamanho celular é selecionada e analisada para a presença dos marcadores CD4 e CD25 (respectivamente FL1 e FL2 no gráfico B'). A região positiva para CD25 e CD4 (R2 no gráfico B') é então selecionada e analisada para a presença do marcador

CD103 (FL3 no gráfico C'). Após a colocação de barreiras para determinar a população que expressa o CD103 (quadrante "c" no gráfico C'), os números relativos da população CD4 que apresenta os marcadores CD25 e CD103 é calculado através da fórmula mostrada em D', e os resultados expressos em gráficos (E').

4.7 *Obtenção de Mononucleares que Infiltram o Músculo Esquelético (MnIME)*

Fragments de músculo esquelético foram retirados dos animais e digeridos com colagenase (Type IV, Sigma-Aldrich), 1,5 mg/ml diluído em meio RPMI incompleto (Gibco), por 60 minutos a 37 °C. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 15 minutos, ressuspendidas em PBS gelado e as MnIME isoladas através de centrifugação em gradiente de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 40-80% (detalhadamente descrito em POSTOL, 1999). As MnIME foram então lavadas em PBS suplementado com 10% de soro bovino fetal e marcadas para análise por citometria de fluxo, conforme descrito acima.

4.8 *Cultura de Células e Dosagem de Citocinas*

Esplenócitos foram obtidos em condições assépticas, lavados em PBS gelado e cultivados (5×10^6 células/ml) em meio RPMI (suplementado com FCS 10%) completo por 48 horas, sob estímulo com antígeno de *T. cruzi* (100µg/ml), IL-2

(200ng/ml) e/ou não estimulados. A produção de interleucina (IL)-10, IL-17, IL-23, IL-12 e IFN γ pelos esplenócitos foi avaliada no sobrenadante de cultura através do ensaio de ELISA “duplo-sandwich”, utilizando para captura, os seguintes anticorpos monoclonais: rato anti-camundongo INF- γ (clone 37801.11, 37875.11), anti-camundongo IL-10 (clone JES052A5), anti-camundongo IL-12/IL-23 (clone 30517, anti-p40), anti-camundongo IL-17 (clone 50101.11), obtidos da R&D Systems (Minneapolis-USA), e rato anti-camundongo IL-12 (clone C15.1, anti-p40/p70), adquirido da Pharmingen (San Diego, CA-USA). Os seguintes anticorpos purificados foram utilizados para a detecção da citocina específica: BIO anti-camundongo IFN γ , BIO anti-camundongo IL-12, BIO anti-camundongo IL-17, BIO anti-camundongo IL-10, coelho anti-camundongo IL-23 p19 e cabra anti-coelho Peroxidase (R&D Systems, Minneapolis-USA). A quantificação de cada citocina foi realizada comparando-se a densidade óptica (DO) de cada amostra com a DO de uma curva padrão, feita com a citocina purificada obtida comercialmente da Pharmingen: rIL (interleucina recombinante)-10, rIL17, rIFN- γ , rIL-23 e rIL-12 (Pharmingen, San Diego, CA).

A dosagem de citocinas foi realizada também no soro dos animais. Para esta dosagem os mesmos anticorpos acima descritos foram utilizados.

4.9 Ensaio de ELISA

Em geral, a primeira fase do ensaio imunoenzimático (ELISA) é a preparação da superfície dos poços de placas de 96 poços (Maxisorp-Nunc), através da adição de anticorpos monoclonais purificados anti-citocina específica (previamente citados), que aderem na superfície dos poços. São adicionados então cerca de 50 μL da solução de anticorpo monoclonal, diluído em PBS, a cada poço, e incubado a 4°C durante a noite. Foi posteriormente adicionado a cada poço 150 μL de PBS contendo 5% (p/v) de proteínas (caseína) do leite desnatado (Molico-Nestlé) e incubado por 1 hora a 4°C. Este passo tem como objetivo o bloqueio de ligações inespecíficas, através da ação da caseína presente no leite. Após a incubação, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20 e as amostras aplicadas em volume de 50 μL por poço. A curva da citocina recombinante foi realizada através de diluições seriadas, a partir de 50 ng/ml. A citocina recombinante foi diluída em PBS contendo 0,1% (p/v) de BSA (Albumina bovina - Sigma). Após esses passos, a placa foi então incubada por no mínimo 12 horas a temperatura de 4°C. Na fase final do procedimento, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20. Adicionou-se em seguida 50 μl de anticorpo anti-citocina específica biotinilado (no caso específico da IL-23 foi utilizado um anticorpo anti-IL23 produzido em coelho), diluído em PBS-0,05% Tween 20, seguindo-se de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 μL /poço de Streptoavidina conjugada a Peroxidase na diluição de 1:4000 (no caso da IL-23 foi utilizado anticorpo anti-coelho produzido

em cabra e conjugado a Peroxidase), diluída em PBS e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. No final do processo, a reação foi revelada com 50µL/poço de solução reveladora contendo 10ml de tampão citrato 0,1M (pH 5.0), 3µL de H₂O₂ (0,3% v/v) e 5 mg de OPD, no volume de 50 µl por poço. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de 50µl/poço de ácido Sulfúrico (H₂SO₄) na concentração de 4N. Em seguida, a placa foi submetida à quantificação através do leitor de ELISA, com o comprimento de onda de 490 nm.

4.10 Análise Histopatológica

Fragmentos de coração dos animais foram fixados em solução de PBS contendo 10% (v/v) de formaldeído (Merck), emblocada em parafina e os cortes histológicos foram corados por H.E. (Hematoxilina e Eosina). As secções histopatológicas de tecido muscular esquelético e cardíaco foram analisados por estudo duplo-cego e o infiltrado quantificado morfologicamente com a ajuda do software Motic Images Plus 2.0. Para tanto, foram selecionados aleatoriamente 5 campos microscópicos (400x) de cada caso e as células mononucleares infiltrantes contadas, sendo sua densidade expressa em células infiltrantes/mm² de tecido.

O tecido cardíaco foi corado também com picrossírius, para determinação da fibrose. A quantificação da fibrose foi realizada através de análise morfométrica, selecionando-se 5 campos microscópicos aleatórios (400x) e identificando-se a

área de fibrose, sendo os resultados expressos pela porcentagem do tecido positivo para fibrose.

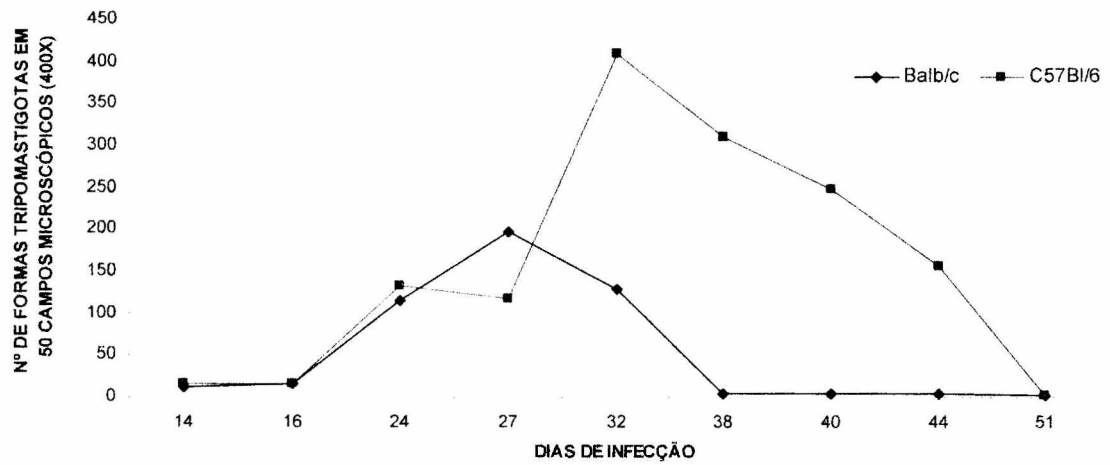
4.11 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como médias. A significância das diferenças observadas é avaliada através do teste estatístico de Mann-Whitney, entre o grupo teste e seu grupo controle. Valores de p abaixo de 0,05 são considerados significante (assinalados por *).

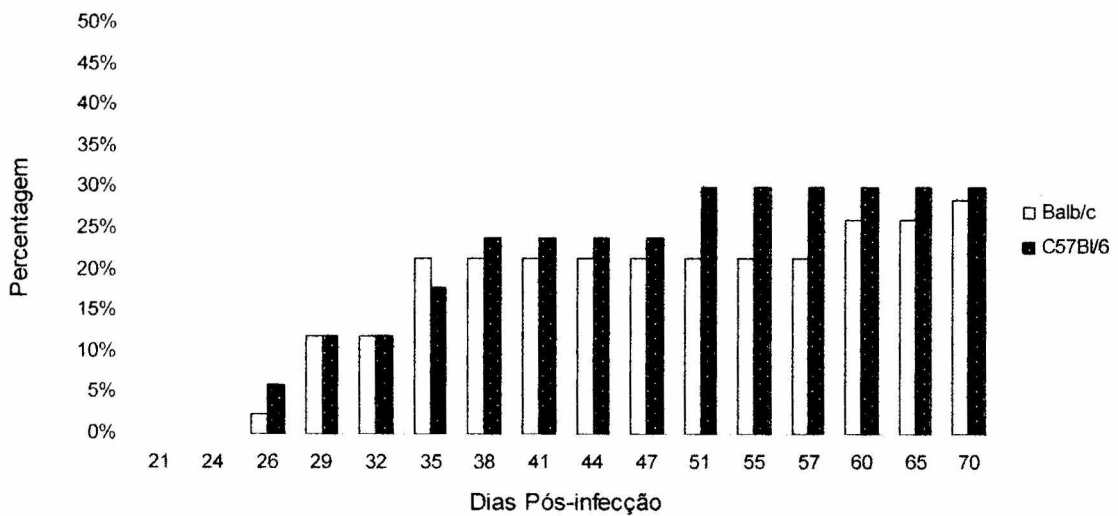
5. RESULTADOS

5.1 *Parasitemia e Mortalidade*

Dados parasitêmicos e a taxa de mortalidade foram analisados durante a fase aguda da infecção para verificar como se comportam as duas diferentes linhagens de animais infectados durante este período. Como verificados na Figura 3, embora os animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen apresentem um crescimento dos níveis parasitêmicos no mesmo período que os animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, os mesmos mostram redução na capacidade de controlar a replicação parasitária quando comparado aos animais C57Bl/6. Isto pode ser verificado através do pico parasitêmico mais elevado e da “eliminação” mais tardia dos parasitas circulantes, até a passagem para a fase sub-patente da infecção (Figura 3a). Este fato pode estar relacionado a uma maior mortalidade verificada nos animais C57Bl/6, entre o 51º dia ao 57º pós-infecção, quando comparados aos animais Balb/c (Figura 3b).



a



b

Figura 3 – Parasitemia (a) e mortalidade (b) dos animais Balb/c e C56Bl/6 infectados com a cepa Colombiana e Tulahuen do *T. cruzi* respectivamente. Dados obtidos durante a fase aguda da infecção. n ≥ 5.

A parasitemia foi também realizada semanalmente durante o tratamento com Ciclofosfamida (já na fase crônica da infecção) e, esporadicamente, após o mesmo, até o sacrifício dos animais. A análise parasitêmica do sangue não apresentou alterações com o tratamento, permanecendo ambos os grupos infectados (tratados ou não) com parasitemias subpatentes, ou até mesmo, negativas (Figura 4). Este resultado foi o mesmo tanto para as linhagens Balb/c, quanto para os animais C57Bl/6.

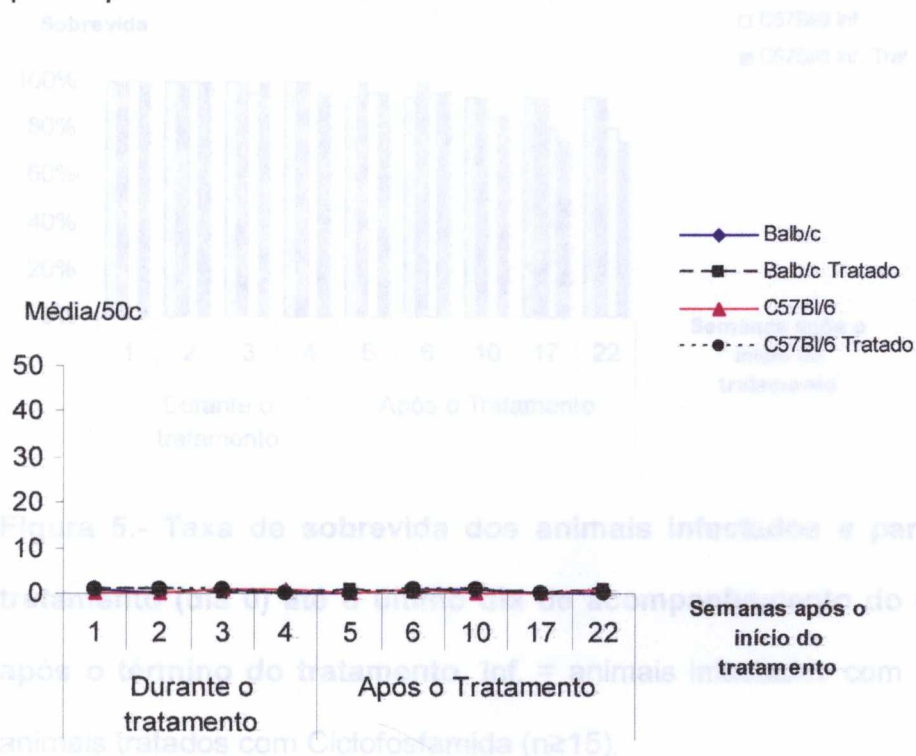


Figura 4 – Médias parasitêmicas durante e após o tratamento. Animais Balb/c e C57Bl/6 infectados com as cepas Colombiana e Tulahuen do *T. cruzi*, respectivamente, tratados ou não com Ciclofosfamida (n=5).

A mortalidade dos animais também não foi afetada significativamente com o tratamento com Ciclofosfamida. De fato, como mostra a Figura 5, os grupos de animais infectados e tratados apresentaram taxas de mortalidade semelhantes aos animais que receberam apenas PBS.

Tratamento com Ciclofosfamida aumentou a celularidade do baço dos animais Balb/c (mas não dos animais C57Bl/6) quando analisado 1-2 semanas pós-tratamento. Entretanto, a celularidade do baço dos animais tratados volta ao mesmo patamar dos animais infectados, após 4

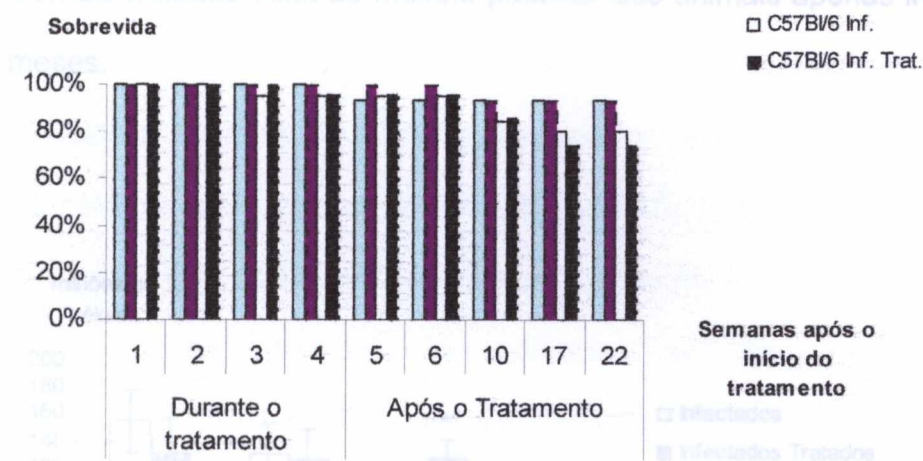


Figura 5.- Taxa de sobrevida dos animais infectados a partir do início do tratamento (dia 0) até o último dia de acompanhamento do grupo, 4 meses após o término do tratamento. Inf. = animais infectados com *T. cruzi*; Trat. = animais tratados com Ciclofosfamida ($n \geq 15$).

Figura 6 – Contagem das células mononucleares do baço, Camundongos Balb/c infectados com a cepa Colombiana e de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuén do *T. cruzi*. * $p < 0,05$ ($n \geq 3$) Mann-Whitney.

5.2 Celularidade dos Órgãos Linfóides

Os resultados da contagem das células mononucleares do baço são mostrados na Figura 6. Como pode-se observar, o tratamento com Ciclofosfamida aumentou a celularidade do baço dos animais Balb/c (mas não dos animais C57Bl/6) quando analisado 1-2 semanas pós tratamento. Entretanto, a celularidade do baço dos animais tratados volta ao mesmo patamar dos animais apenas infectados, após 4 meses.

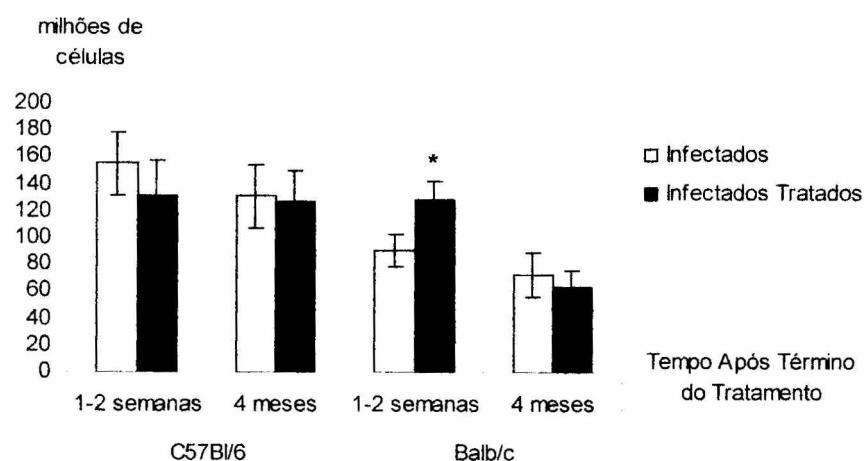


Figura 6 – Contagem das células mononucleares do baço. Camundongos Balb/c infectados com a cepa Colombiana e de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. * $p < 0,05$ ($n \geq 3$) Mann-Whitney.

5.3 *Análise Fenotípica das Células T*

A análise fenotípica dos linfócitos T foi realizada tanto nas células do baço quanto nas células que infiltraram o músculo esquelético.

5.3.1 *Baço*

No baço foram analisadas as proporções celulares que são indicativas para ativação e memória imunológica, segundo a baixa expressão, ausência ou alta intensidade dos marcadores CD45RB^{low}, CD62L^{neg} e CD44^{alto}. Nestas populações celulares foram ainda evidenciados os marcadores de linfócitos T CD4 e CD8 e, adicionalmente, a frequência de linfócitos nTregs (aqui consideradas as células CD4+CD25+CD103+). Nos camundongos C57Bl/6 foram analisadas também as proporções de linfócitos NKT ($\alpha\beta$ +NK1.1+), por se tratar de uma linhagem que apresenta o marcador NK1.1 (KOO & PEPPARD, 1984) sobre algumas das populações de linfócitos T e de células NK (“*natural killer*”).

5.3.1.1 - *Ativação e Memória*

A análise fenotípica para marcadores de ativação e memória mostrou variação com o tempo que sucedeu o término do tratamento. Como verificado na Figura 7 e 8, há uma diminuição significativa, na linhagem C57Bl/6, do número absoluto das populações CD45RB^{baixo} e CD62L^{neg} (respectivamente Figura 7C e Figura 8C),

logo após o tratamento, principalmente para a população de células T CD8. Contudo, com o cessar do tratamento, e decorridos 4 meses, os camundongos tratados retomam às mesmas proporções encontradas no animal infectado apenas (Figuras 7A,C e 8A,C). Estes resultados foram observados no que se refere à infecção com a cepa Tulahuen em camundongos C57Bl6 Colombiana, sendo que nos animais Balb/c as populações absolutas não se alteram, embora os números relativos indiquem uma tendência à redução com o tratamento após 1-2 semanas.

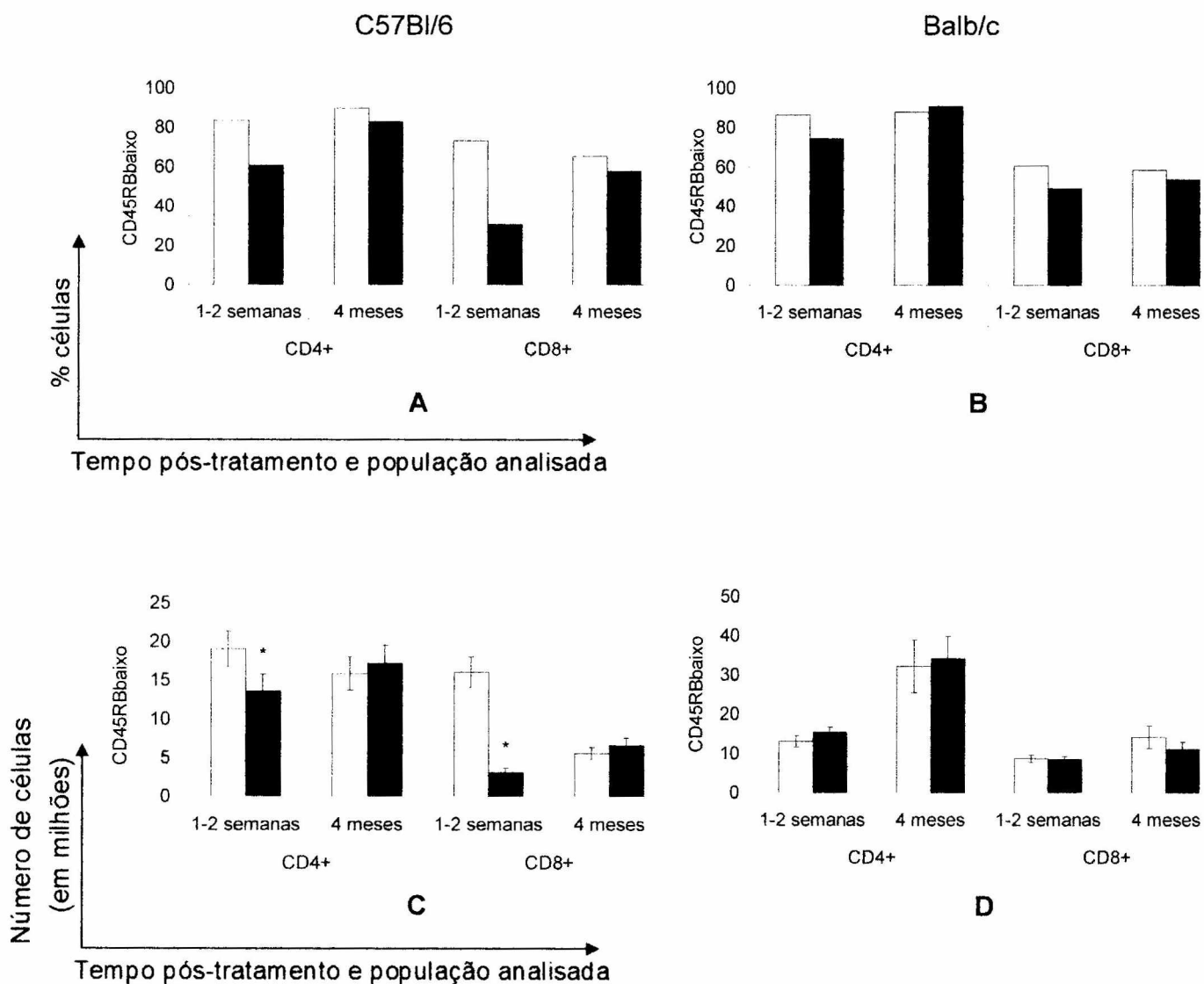


Figura 7. Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ ou CD8+ que expressam baixos níveis de CD45RB. (A) e (B) números relativos; (C) e (D), número absoluto de células. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen (A, C) e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana (B, D) do *T. cruzi*. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

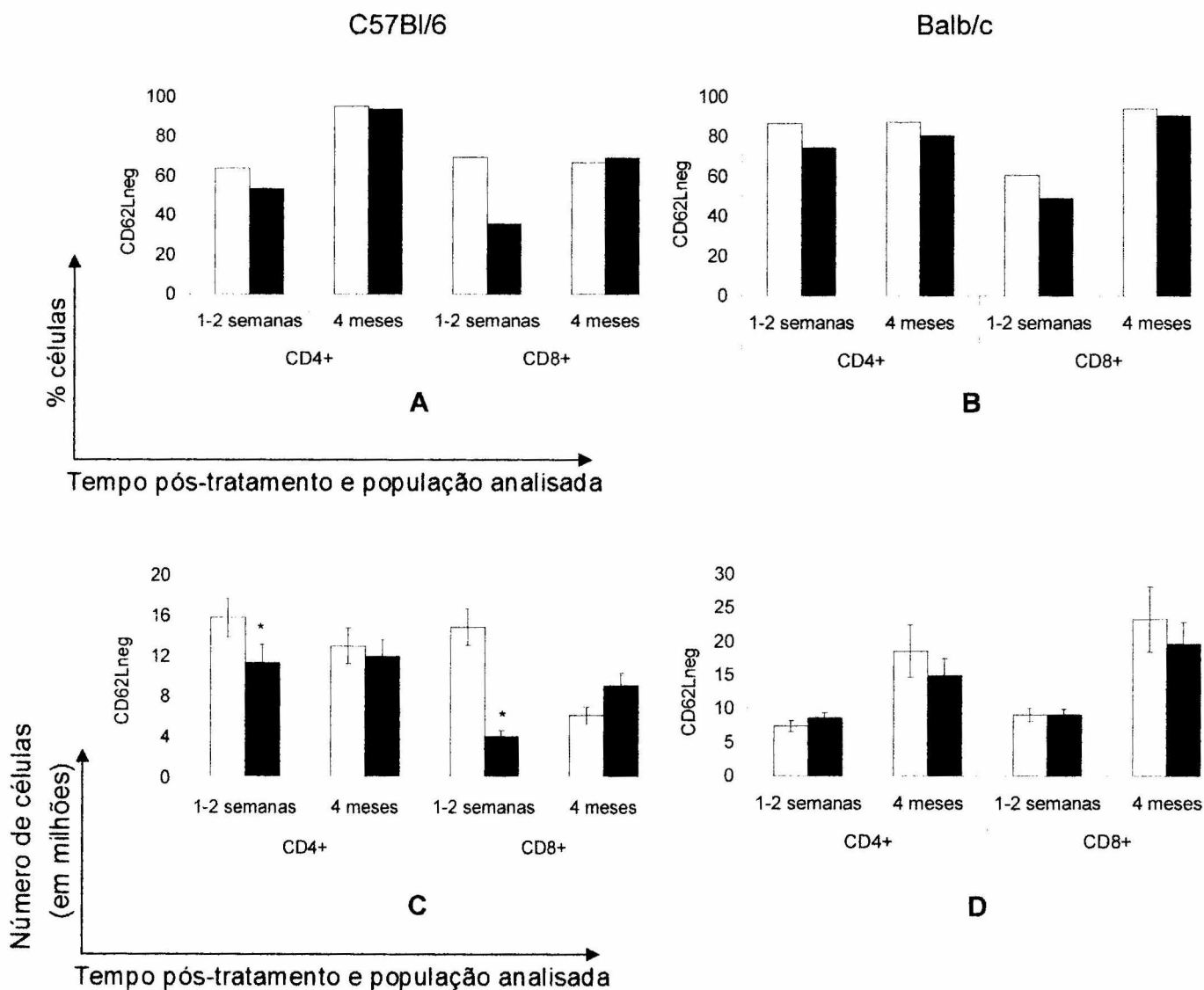


Figura 8. Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ ou CD8+ que são negativos para o CD62L. (A) e (B) números relativos; (C) e (D), número absoluto de células. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen (A, C) e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana (B, D) do *T. cruzi*. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

Também para as populações de células T que expressam o marcador CD44^{alto}, o tratamento determinou uma diminuição dos números relativos e absolutos, nos animais C57Bl/6 (Figura 9A,C). Tal diferença só pode ser observada 1-2 semanas após o tratamento, visto que com 4 meses o número de células T com CD44^{alto} dos animais tratados volta a se igualar àquela dos animais apenas infectados. Novamente as células T CD8 mostram ser mais afetadas pela administração de Ciclofosfamida na dose utilizada. De fato, a linhagem C57Bl/6 tendeu a apresentar os mesmos resultados observados para CD45RB^{low} e CD62L^{neg} (Figuras 7 e 8). A linhagem Balb/c, no entanto, apresentou apenas um pequeno aumento da população CD8+CD44^{alto}, 1-2 semanas após o tratamento (Figura 9D).

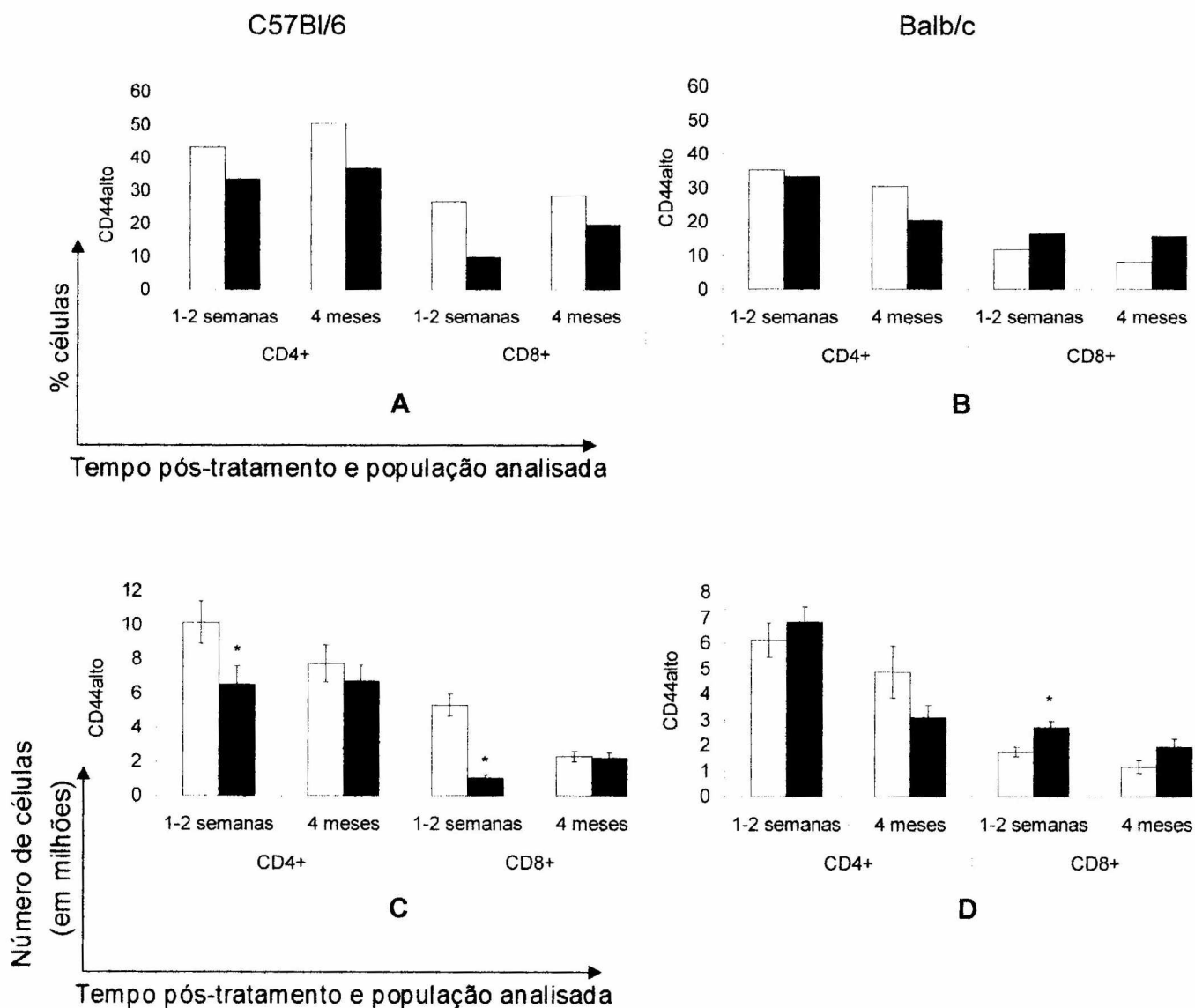


Figura 9. Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4⁺ ou CD8⁺ que apresentam altos níveis de CD44 na superfície celular. (A) e (B) números relativos; (C) e (D), número absoluto de células. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen (A, C) e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana (B, D) do *T. cruzi*. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

5.3.1.2 - Células Regulatórias e Células NKT

Para quantificar as células nTregs (células regulatórias naturais) foram utilizados simultaneamente a coloração para os marcadores CD4, CD25 e CD103. Foram analisados a frequência e os números absolutos de células positivas para CD25+CD103+ dentro da população duplo-positiva CD4+CD25+, conforme descrito em materiais e métodos (Figura 2.2). Este procedimento leva ao enriquecimento de células CD103 positivas somente na população duplamente marcada com CD4+ e CD25+ conjuntamente, já desde a aquisição de células marcadas positivamente.

Verifica-se na Figura 10 que o tratamento induziu um aumento dos números absolutos e relativos tanto de células triplamente marcadas (CD4+CD25+CD103+) como na população de CD4+CD25+. É interessante notar que a frequência de células TCD4+CD25+CD103+ é reduzida com o envelhecimento do animal no modelo de infecção crônica (Figura 10), isto é, mediante provável e constante estimulação antigênica, em ambas as linhagens. Concomitante a isso há uma importante involução tímica em animais maduros ou velhos, o que provavelmente modifica os níveis de ativação dos linfócitos periféricos, pela menor saída de células *naïve* tímicas.

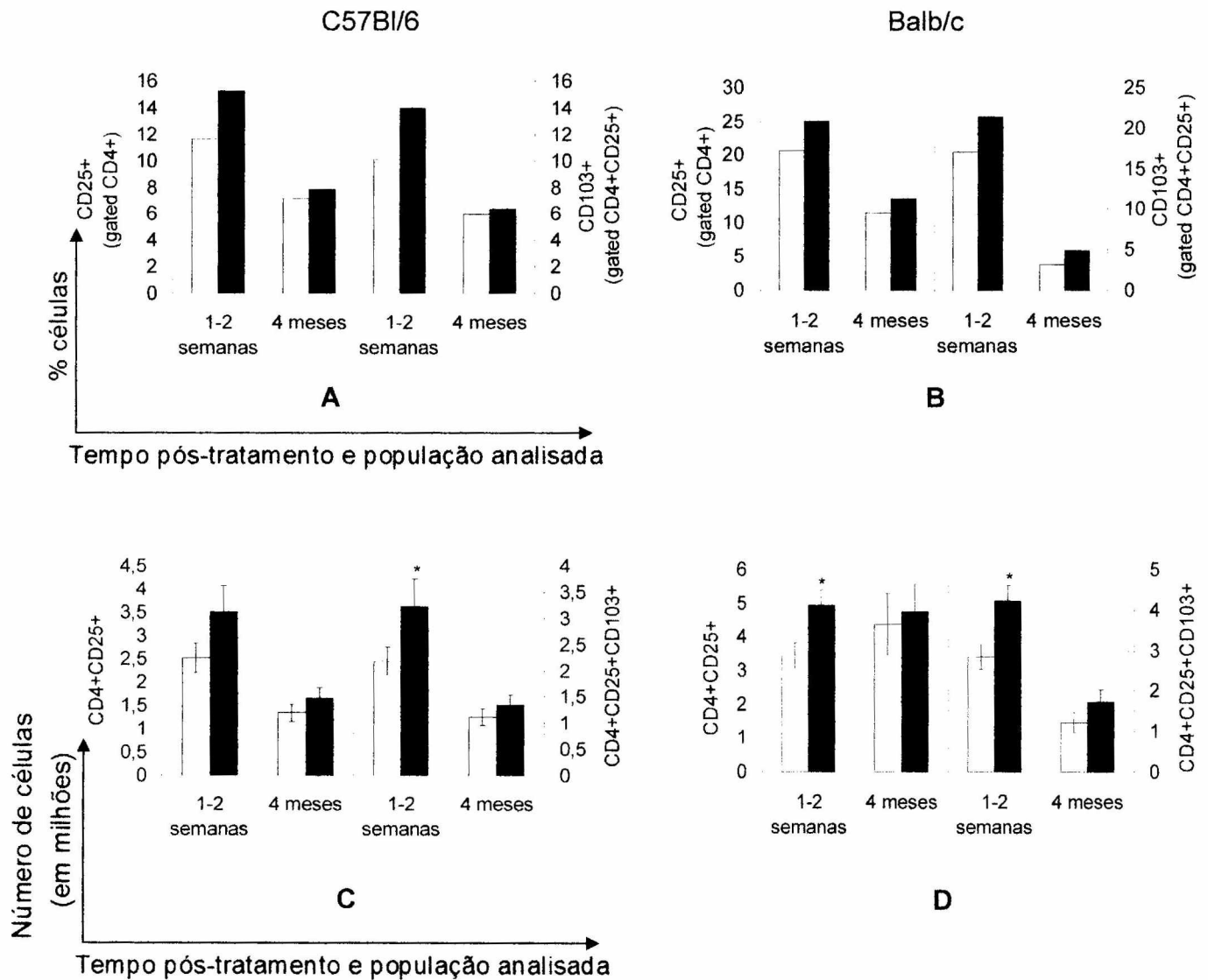


Figura 10- Números relativos e absolutos dos esplenócitos CD4+ que são CD25+ e dos que são CD25+CD103+. (A) e (B) números relativos; (C) e (D), número absoluto de células. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen (A, C) e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana (B, D) do *T. cruzi*. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

Diferentemente das células T CD4CD25+ que apresentaram discreto aumento com o tratamento (Figura 10), as células $\alpha\beta$ +NKT1.1 apresentaram um enorme aumento com o tratamento. Essa alteração se manteve mesmo passados os 4 meses do término do tratamento, embora em proporções menores que a encontrada anteriormente (Figura 11).

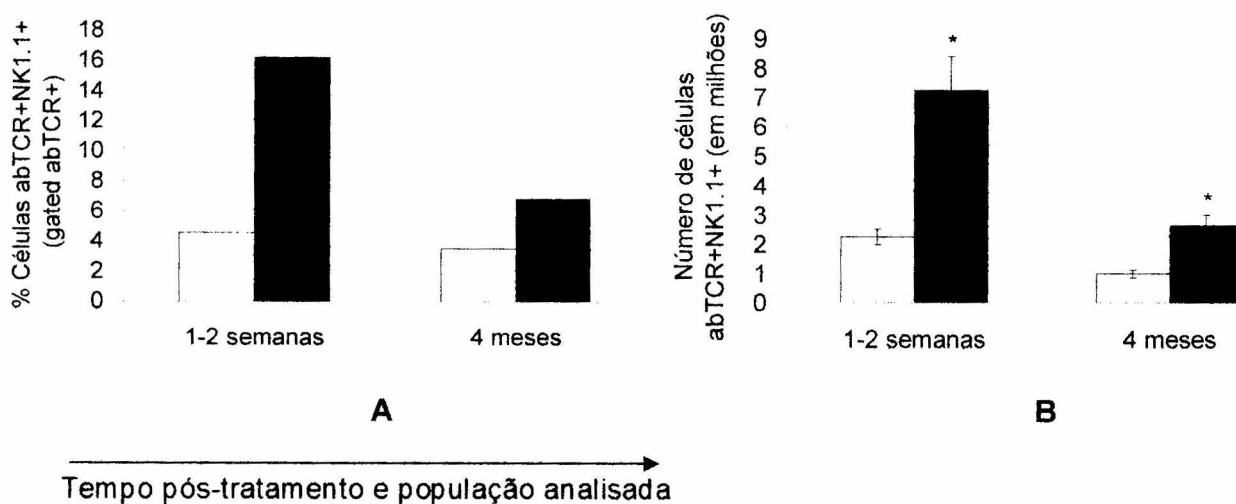


Figura 11. Números relativos (A) e absoluto (B) dos esplenócitos TCR $\alpha\beta$ + que apresentam o marcador de superfície NK 1.1. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa do *T. cruzi*. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (*Mann-Whitney p<0,05; n \geq 3).

5.3.2 Músculo Esquelético

Do mesmo modo que acontece no baço, a análise dos linfócitos que infiltram o músculo esquelético o tratamento induz considerável aumento da proporção de células CD4 que expressam os marcadores CD25 e ambos os marcadores CD25 e CD103 (Figura 12), indicando que tais células estão migrando para o sítio de inflamação, proporcionalmente a seu número relativo nos órgãos linfóides secundários. O aumento indicado foi de até 100% em animais C57Bl/6 tratados, em relação ao seu controle infectado, 1-2 semanas após o tratamento.

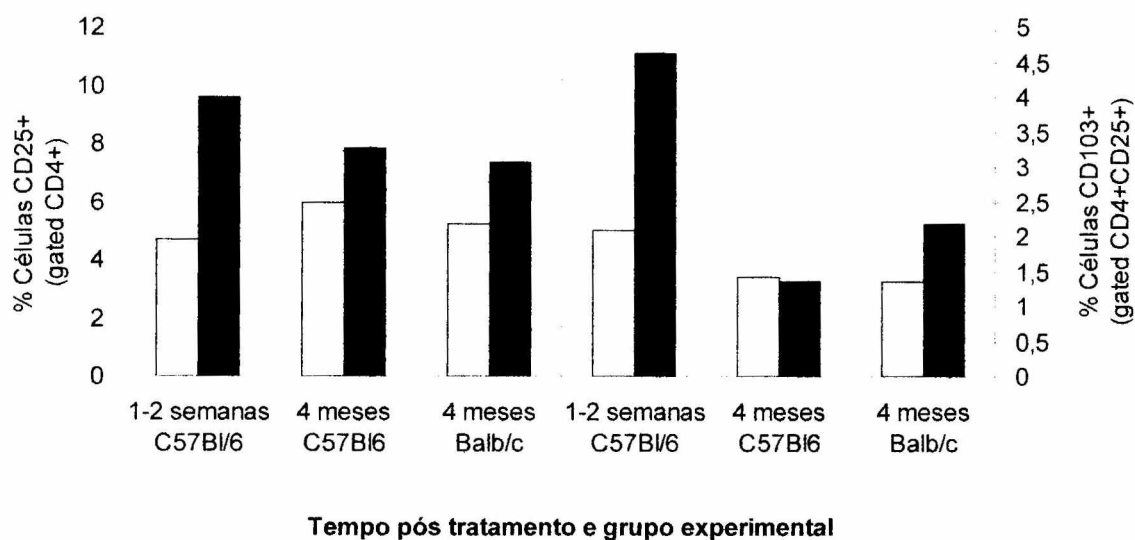


Figura 12- Números relativos e dos linfócitos MnIME CD4 que são CD25+CD103+. □ Camundongos infectados; ■ Camundongos infectados e tratados. Animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen e animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Análises feitas com 1-2 semanas ou 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida.

Diferentemente do que ocorre com a CD4+CD25+, as células NKT não seguem a proporção encontrada no baço. De fato, como mostrado na Figura 13, o tratamento não consegue induzir uma alteração importante desta população no infiltrado do músculo esquelético.

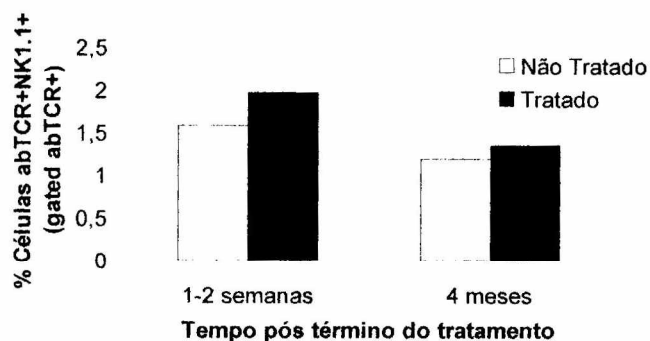


Figura 13- Números relativos dos linfócitos M α IME $\alpha\beta$ que são NK 1.1+, infiltrando o músculo esquelético, 7 a 15 dias e 4 meses após o término do tratamento com Ciclofosfamida (30mg/kg). Animais C57bl/6 infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*.

5.4 *Análise dos Perfis de Citocinas*

Foram realizadas dosagens de diferentes citocinas, tanto no sobrenadante de esplenócitos, quanto no soro dos diferentes grupos experimentais. Os resultados encontrados estão descritos abaixo.

5.4.1 *Dosagem de Citocinas no Sobrenadante de Cultura de Esplenócitos*

Citocinas como IL-10 ou citocinas pró-inflamatórias como IFN γ , IL-12, IL-23, e IL-17 foram dosadas no sobrenadante de cultura de esplenócitos dos diferentes grupos experimentais.

Como verificado na Figura 14, após o tratamento com Ciclofosfamida houve uma diminuição dos níveis de IFN γ , sendo esta mais expressiva na linhagem C57Bl/6 infectado com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Essa diminuição, verificada já 7-15 dias após término do tratamento, se manteve constante após 4 meses do tratamento.

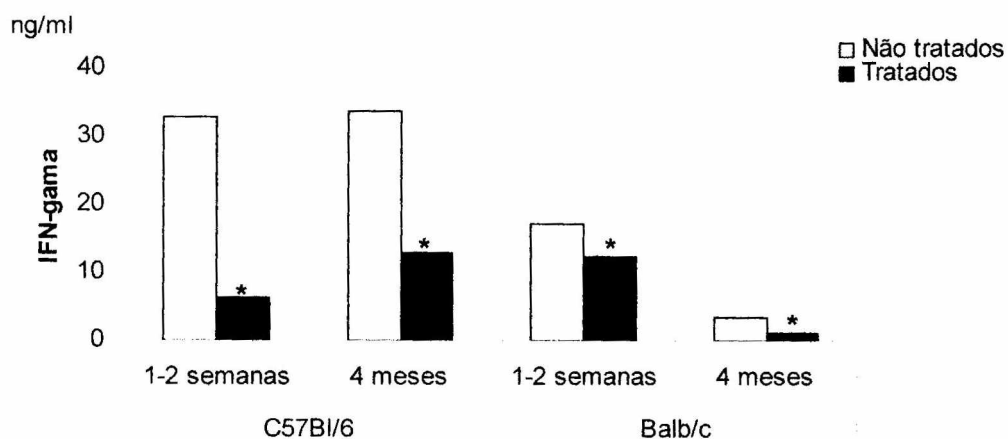


Figura 14- Níveis de IFN γ encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos. Cultura de 48h com 5×10^6 células/ml, estímulos com IL-2 e antígeno do *T. cruzi*. (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

Com relação à citocina antiinflamatória IL-10, houve um pequeno, porém significativo aumento na sua produção por parte dos esplenócitos. Esta foi verificada 7-15 dias após o término do tratamento e também se manteve mesmo após 4 meses (Figura 15).

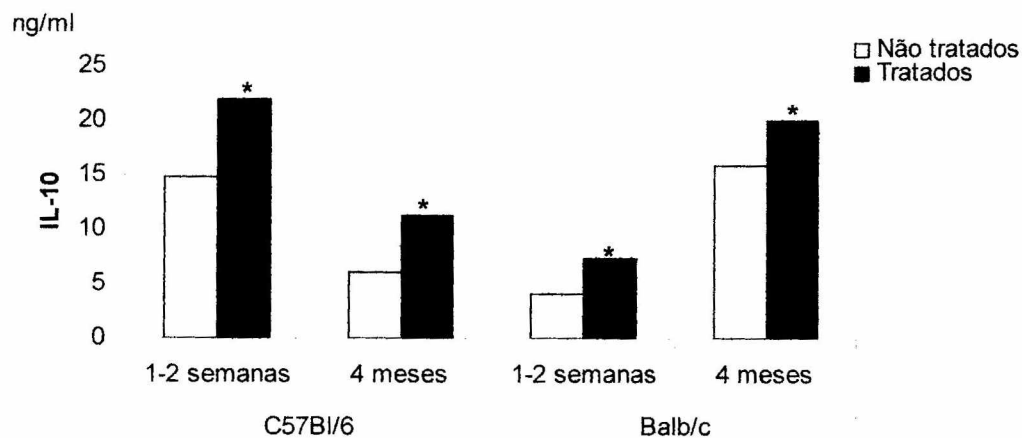


Figura 15- Níveis de IL-10 encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos. Cultura de 48h com 5×10^6 células/ml, estímulos com IL-2 e antígeno do *T. cruzi*. (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

Quanto às citocinas pró-inflamatórias, IL-12 e IL-23, estas não foram encontradas no sobrenadante (resultados não mostrados). Por outro lado, no grupo experimental Balb/c infectado com a cepa Colombiana, foi encontrado IL-17, a qual apresentou-se aumentado após o tratamento com Ciclofosfamida. Esse aumento, encontrado 7-15 dias após o tratamento não se manteve, voltando aos valores do grupo infectado passados 4 meses (Figura 16).

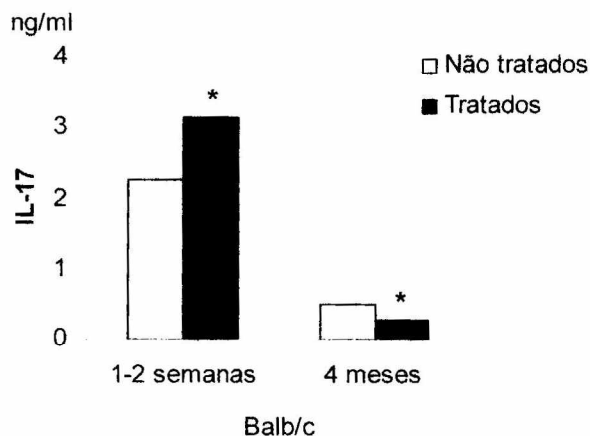


Figura 16 –Níveis de IL-17 encontrados no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Cultura de 48h com 5×10^6 células/ml, estímulos com IL-2 e antígeno do *T. cruzi*. (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

5.4.2 Avaliação das Citocinas Detectadas no Soro de Animais Infectados e Tratados ou Não com Ciclofosfamida.

A dosagem de diversas citocinas foi realizada também em amostras de soro dos animais infectados, submetidos ao tratamento com Ciclofosfamida ou não. Foram realizadas dosagens para IL-12, TNF e IL-17. A partir das citocinas citadas, foi difícil a detecção no soro, provavelmente por estarem ausentes ou em níveis abaixo do limite de detecção pelo ELISA.

Claramente, as quantidades de IL-12 estão diminuídas no soro de animais Balb/c infectados e tratados com Ciclofosfamida, após 1-2 semanas do término do mesmo (Figura 17). Este padrão de alteração se correlaciona com o do IFN γ no sobrenadante de cultura de esplenócitos, que também diminui nas primeiras semanas pós-tratamento (Figura 14). Entretanto, passados 4 meses, as quantidades de IL-12 no soro se igualam à dos animais apenas infectados (Figura 17).

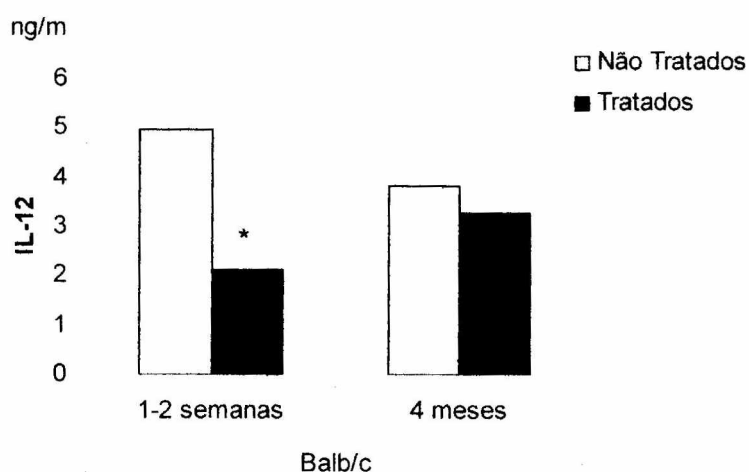


Figura 17 – Níveis de IL-12 no soro de camundongos Balb/c após 7-15 dias e 4 meses pós-término do tratamento. Animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. (*Mann-Whitney $p < 0,05$; $n \geq 3$).

5.4.3 Resumo dos Perfis de Citocinas

Um resumo simplificado das alterações observadas nos perfis de citocinas, tanto de cultura de esplenócitos quanto no soro dos animais, está mostrado na Tabela 1, assim (nos casos com 7-15 dias e 4 meses pós-tratamento), para quantificação do infiltrado inflamatório e piocossinus (nos casos com 4 meses pós-tratamento), para avaliação de fibrose.

Tabela 1- Resumo dos perfis de citocinas analisados no presente trabalho, comparando-se animais Balb/c e C57Bl/6 infectados e tratados (Ciclofosfamida) com os animais apenas infectados.

		IFN γ	IL-10	IL-17	IL-12	IL-23
Cultura de esplenócitos	1-2 semanas	↓	↑	↑	ND	-
	4 meses	↓	↑	↓	-	-

Nota: Cultura de esplenócitos realizada com estímulos de antígeno de *T. cruzi* (100 μ g/ml) e IL-2 (200ng/ml). Dosagem realizada através de ELISA por 2 ou 3 vezes, de maneira independente. Símbolos utilizados: (↑) aumenta com o tratamento; (↓) diminui com o tratamento; (-) citocina ausente ou abaixo dos níveis de detecção da curva; (ND) ensaio não realizado.

5.5 Análise Histopatológica

O músculo cardíaco e esquelético foi retirado dos animais, fixado em formol Milloning 10% (tamponado em pH 7,4), processado e corado com Hematoxilina e Eosina (nos casos com 7-15 dias e 4 meses pós-tratamento), para quantificação do infiltrado inflamatório, e picrossírius (nos casos com 4 meses pós-tratamento), para avaliação da fibrose.

A análise histopatológica mostrou que a infecção crônica pelo *T. cruzi* determina uma miocardite de diferentes intensidades, variando de leve a intensa, composta quase absolutamente de mononucleares. O tipo de infiltrado varia de focal a difuso, em ambos os casos associados às áreas de necrose com cardiomiócitos destruídos. O infiltrado e, conseqüentemente a necrose tissular, são mais intensos, normalmente, nos átrios, seguido pelo ventrículo direito. Quase sempre os infiltrados não estão associados à presença do parasita, ao menos sob análise ao microscópio óptico de cortes corados com HE. De fato, no grupo de animais infectados foram encontrados apenas 2 casos positivos de 27 analisados, enquanto que no grupo tratado apenas 3 casos de 26 apresentavam vestígios de parasita (Figura 18).

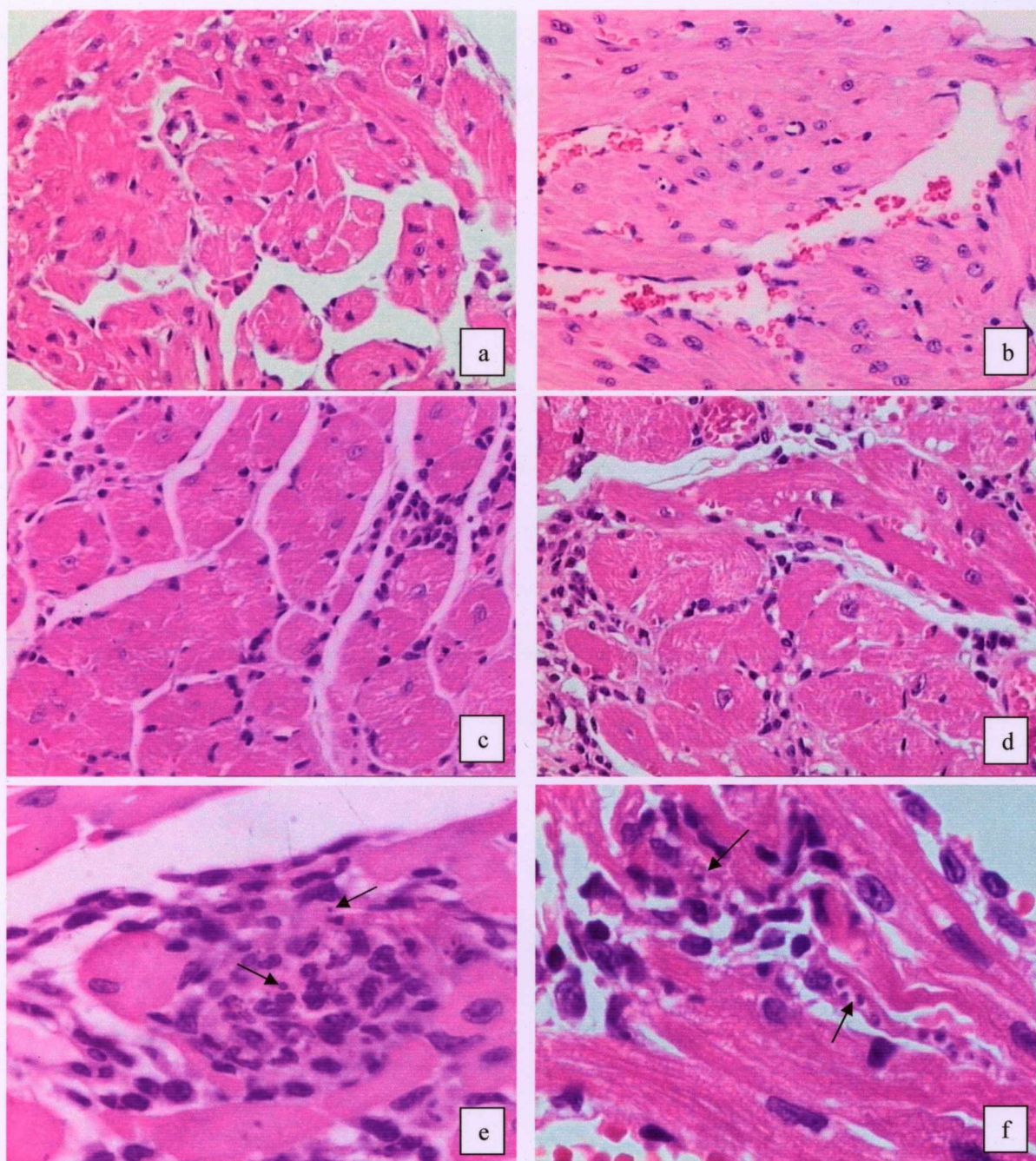
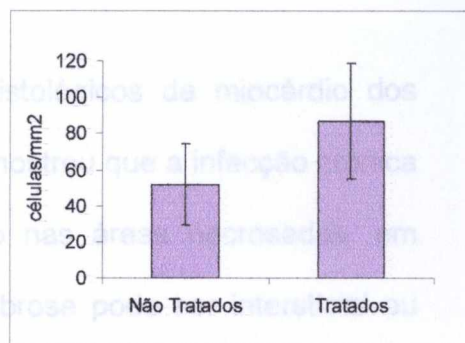


Figura 18 – Tecido cardíaco de camundongos Balb/c após 1-2 semanas do fim do tratamento com Ciclofosfamida (30mg/kg). a- animal intacto (400x); b- animal normal tratado (400x); c- campo representativo do grupo infectado apenas (400x); d- campo representativo do grupo infectado e tratado (400x); e- foco de

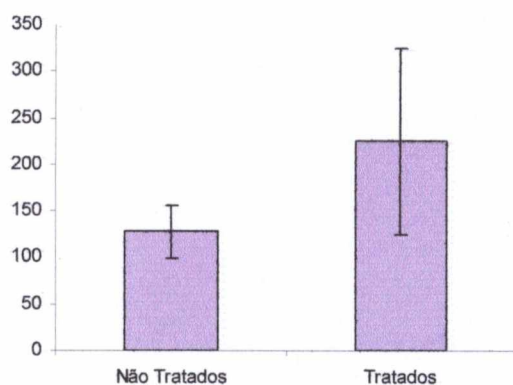
destruição tecidual e possíveis restos de parasitas presentes (1000x); f-
cardiomiócito infectado sendo destruído por células mononucleares inflamatórias
(1000x). Setas indicam formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. Coloração
HE.

A análise morfométrica para infiltrado inflamatório em animais Balb/c infectados
mostra que, embora o tratamento com Ciclofosfamida, na dose utilizada não induz
a um aumento significativo do infiltrado, este mostra uma tendência a intensificar
entre a primeira e segunda semana, tanto no coração (Figura 19a-b) quanto no
músculo esquelético (Figura 19c). A ausência de uma significância estatística
pode estar relacionada a uma alta variação no grau de infiltrado, dentro do grupo
tratado. A análise histopatológica do miocárdio após 4 meses mostra que esta
tendência não se mantém com o passar do tempo (Figura 19 a-b).

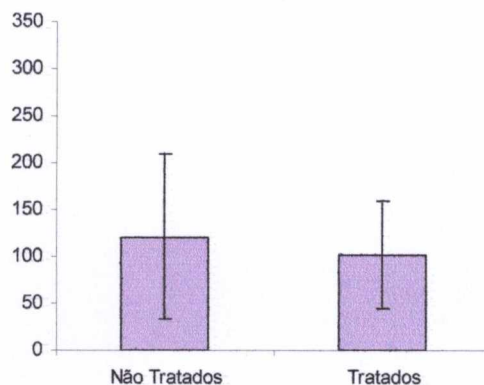
A análise histopatológica da fibrose em cortes histológicos do miocárdio dos animais Balb/c e C57Bl/6 tratados com picrosínus mostrou que a infecção pela cepa T. cruzi determina a deposição de colágeno nas áreas afetadas, com a substituição das fibras musculares destruídas. Tal fibrose pode ser considerada paravascular, variando, em ambos os grupos, de leve a intensa (Figura 20).



c

células / mm²

a

células/mm²

b

Figura 19 – Quantificação do infiltrado inflamatório em fragmentos de tecido muscular de animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*.

Análise do tecido cardíaco realizada nos casos com 7-15 dias (a) ou com 4 meses (b) pós-termino do tratamento com Ciclofosfamida. (Mann-Whitney $p > 0,05$; $n \geq 3$).

No detalhe (c), quantificação do infiltrado inflamatório no músculo esquelético de animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*: análise realizada no músculo esquelético entre 7 a 15 dias pós-termino do tratamento com Ciclofosfamida. (Mann-Whitney $p > 0,05$; $n = 7$, representativo de 2 experimentos independentes).

A análise histopatológica da fibrose em cortes histológicos de miocárdio dos animais Balb/c e C57Bl/6 corados com picrossírius mostrou que a infecção crônica pelo *T. cruzi* determina a deposição de colágeno nas áreas necrosadas, em substituição às fibras musculares destruídas. Tal fibrose pode ser intersticial ou perivascular, variando, em ambos os grupos, de leve a intenso (Figura 20).

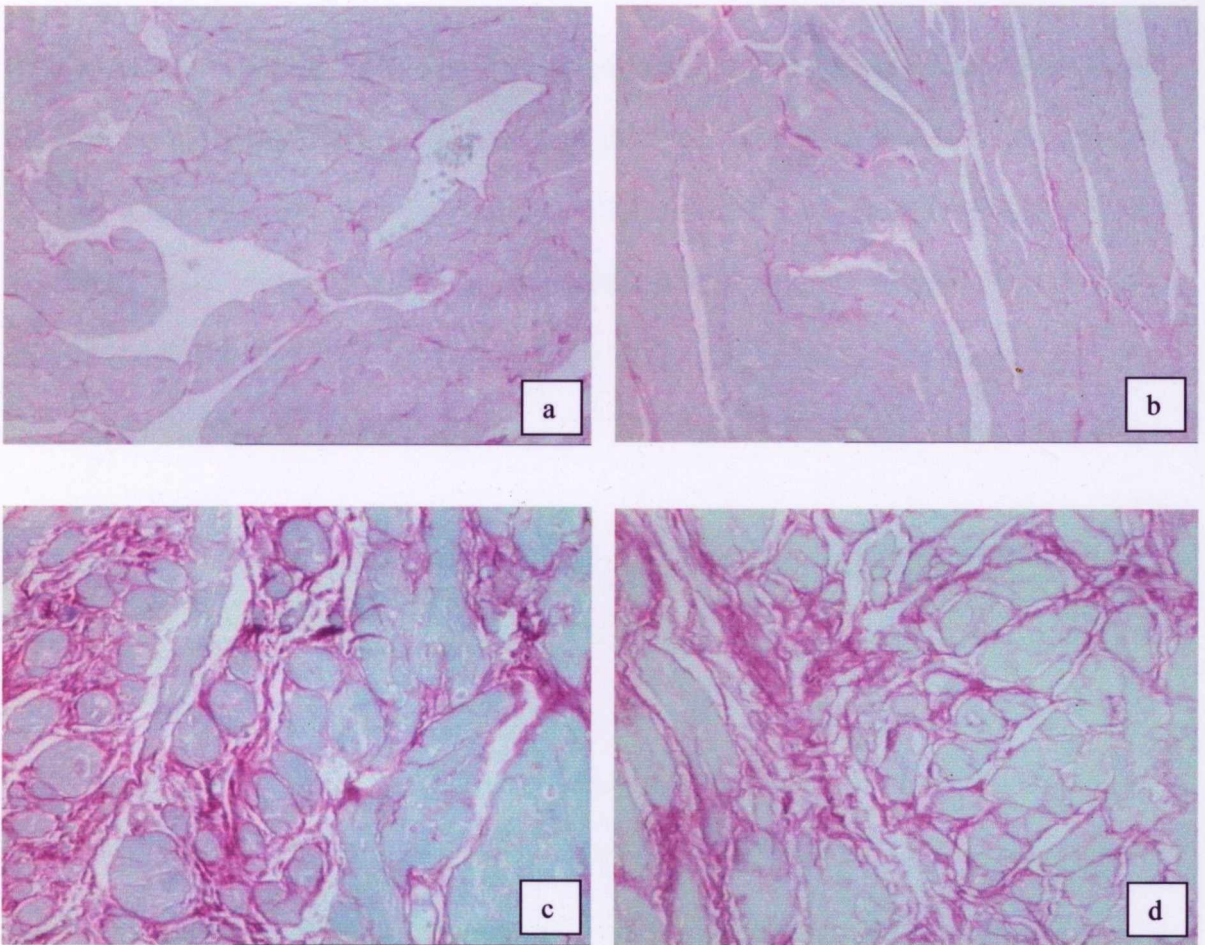


Figura 20 – Coloração com picrossírius realizado no miocárdio de camundongos Balb/c passados 4 meses pós término do tratamento com Ciclofosfamida. a, b, d – ventrículo direito; c - átrio direito. (a) animal intacto; (b) animal normal tratado; (c) animal infectado pelo *T. cruzi*; (d) animal infectado e tratado. Aumento = 200x.

A análise morfométrica, para verificar se o tratamento influencia de modo direto ou indireto na deposição de colágeno, não mostrou alteração significativa entre os grupos. De fato, como mostra na Figura 21, a área positiva para deposição de colágeno nos animais infectados é bastante semelhante àquela dos animais infectados e tratados.

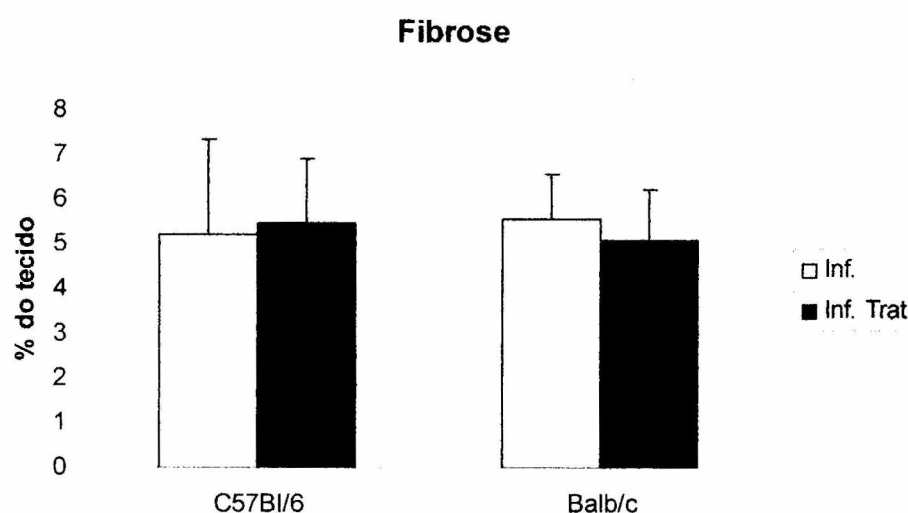


Figura 21 – Quantificação da fibrose em miocárdio de animais C57Bl/6 e Balb/c infectados com a cepa Colombiana e Tulahuen do *T. cruzi*. Análise realizada nos casos com 4 meses pós término do tratamento com Ciclofosfamida. (Mann-Whitney $p > 0,05$; $n \geq 3$).

6. DISCUSSÃO

O principal efeito patogênico na Doença de Chagas reside na miocardite intensa que leva à falência cardíaca progressiva em cerca de 30% dos portadores crônicos do *T. cruzi*, em seres humanos (revisão em WHO 2002). Embora o modelo murino não represente claramente o que se descreve como fase indeterminada da doença, a qual caracteriza-se pela presença de discretos focos de infiltrado inflamatório no miocárdio (sendo que as funções cardíacas estão inalteradas), este tem sido um bom modelo para o estudo da miocardite crônica (ANDRADE, 1990; revisão em ANDRADE, 2000). De fato, verificamos que, a despeito da enorme variação que ocorre dentro do grupo experimental, (mesmo utilizando-se linhagens isogênicas para o estudo), a infecção crônica de animais Balb/c pela cepa Colombiana, e de C57Bl/6 pela cepa Tulahuen determina a disposição de um infiltrado inflamatório no miocárdio, variando esta de leve a intenso. Como demonstrado no presente estudo, tal infiltrado determina a necrose de cardiomiócitos visivelmente infectados ou, mais comumente, de cardiomiócitos que não apresentam evidências visíveis de parasitismo ao microscópio óptico (Figura 18). A necrose provocada pelo infiltrado induz ao estabelecimento de fibrose, com depósitos de fibronectina, laminina e pró-colágenos tipo III e IV. Em camundongos, esta fibrose só regride com o tratamento quimioterápico específico contra o *T. cruzi*, como observado por ANDRADE et al (1991). Também verificamos a presença de fibrose no miocárdio dos animais cronicamente infectados, a qual teve intensidade variada dependendo do caso (Figura 20).

A Ciclofosfamida, quando utilizada em altas doses (200-350 mg/kg), possui uma atividade imunossupressora bem estabelecida (SHAND, 1978). Esta propriedade tem sido explorada pela clínica que utiliza tal dosagem para o tratamento de doenças auto-imunes, bem como em transplantes, para evitar a rejeição do órgão pelo hospedeiro (revisão em SHAND, 1979). É certo que tal característica pode ser bastante prejudicial em casos de infecção ativa, onde a imunossupressão favorece o estabelecimento e proliferação de microorganismos patogênicos.

No que se referem aos modelos experimentais para o estudo de diabetes tipo I, animais NOD (do inglês, *non-obese diabetes*) vêm sendo amplamente estudados. Embora os animais NOD, a partir da quinta semana em diante de vida, venham a apresentar insulite em praticamente todos os casos, apenas uma pequena porcentagem destes animais evolui para o diabetes. A administração de Ciclofosfamida induz uma diminuição inicial da insulite seguida de uma rápida ressurgência do infiltrado, composto de linfócitos T, com conseqüente destruição das ilhotas de células-beta. A depleção, pela Ciclofosfamida, de células envolvidas nos mecanismos que mantêm a insulite sob controle, tem sido relatada como o motivo que leva ao aparecimento do diabetes neste modelo experimental (CHARLTON et al, 1989). De certa forma, tais mecanismos são parcialmente reestruturados pelo G-CSF (um fator hematopoiético da linhagem mielóide), visto que o tratamento com esta citocina após administração de Ciclofosfamida é capaz de inibir a indução da diabetes por esta droga, além de prevenir a perda de células regulatórias CD4+CD25+ (HADAYA et al, 2005). Curiosamente a imunoregulação da insulite não ocorre diretamente pela IL-10 visto que animais deficientes desta

citocina apresentam taxas semelhantes de diabetes, mesmo após tratamento com Ciclofosfamida (RAJAGOPALAN et al, 2006). Entretanto, diversas citocinas pró-inflamatórias relacionadas à exacerbação da insulite e conseqüente apoptose das células beta, entre elas o $IFN\gamma$ (ABLAMUNITIS et al, 1999), $TNF\alpha$, $TNF\beta$, IL-5 apresentaram níveis aumentados nos sítios inflamatórios (KORAVIK et al, 1997).

A imunossupressão que pode estar presente no tratamento *in vivo* com drogas parece, entretanto, estar ausente quando se utiliza doses mais baixas de Ciclofosfamida (abaixo de 50mg/kg). Na infecção crônica pelo *T. cruzi*, como observado aqui com duas cepas diferentes (Colombiana e Tulahuen), o tratamento prolongado com Ciclofosfamida não determinou aumento no número de parasitas circulantes no sangue periférico (Figura 4a), nem tão pouco no tecido cardíaco. Apesar disso, a inflamação no miocárdio destes animais tendeu a aumentar (embora não tenha sido estatisticamente significativa), quando comparado aos animais não tratados (Figura 19a). Esses dados corroboram estudos prévios que mostraram um aumento na intensidade da inflamação do miocárdio após o tratamento com Ciclofosfamida (50mg/kg), em cães cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, sem contudo alterar os níveis de parasitas no hospedeiro (ANDRADE et al, 1987).

Além do mais, em certos modelos livres de patógenos, como por exemplo, na imunização de camundongos com baixas doses de hemácias de carneiro, o tratamento com Ciclofosfamida em doses de 20 mg/kg induz a um aumento na

reação de hipersensibilidade tardia, sem contudo afetar a produção de anticorpos (ASKENASE et al, 1975). Estes fatos indicam haver uma propriedade imunomoduladora da Ciclofosfamida quando utilizada em nestas doses mais baixas. Muitos autores, durante a década de 70-80, apontaram para uma atividade inibitória/citotóxica específica desta dosagem sobre os linfócitos denominados então supressores (ASKENASE et al, 1975; SCHWARTZ et al, 1978; ANDRADE et al, 1987). Atualmente estes vêm sendo designados como linfócitos T regulatórios, constituindo a depleção dos mesmos a explicação mais provável para a exacerbação da inflamação aqui observada (PESSINA et al, 2005). Em outras palavras, uma possibilidade seria a de que os linfócitos regulatórios seriam fisiologicamente mais susceptíveis à ação da Ciclofosfamida que os linfócitos inflamatórios. Esta diminuição seletiva de linfócitos regulatórios implicaria então em uma deficiência no controle da inflamação, com exacerbação da mesma por células inflamatórias.

Entretanto, nenhuma evidência direta que comprovasse a hipótese de citotoxicidade específica havia sido demonstrada nos anos que sucederam tais investigações, em parte devido à ausência de um marcador que claramente identificasse os denominados linfócitos supressores. Embora ainda hoje não tenha sido encontrado um marcador que seja único de tais células, várias moléculas têm sido relacionadas a populações altamente enriquecidas de linfócitos T com atividade regulatória. Dentre elas, marcadores como CD25, CD103, GITR e mais recentemente o fator de transcrição FoxP3 têm sido fortemente associados a populações com altas capacidades regulatórias (SAKAGUCHI et al, 1995;

LEHMANN et al, 2002; McHUGH et al, 2002; HORI et al, 2003), denominadas atualmente como células regulatórias naturais (nTregs). Isto tem mobilizado diversos estudos acerca da imunorregulação, tendo como foco principal os linfócitos T (revisão em FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004).

Utilizando esta nova ferramenta, LUTSIK et al (2005), tratando animais C57Bl/6 normais com Ciclofosfamida a 2mg/kg (dose esta bem abaixo da utilizada em nossos estudos), verificou que esta era capaz de reduzir a população de células CD4+CD25+, através da indução de apoptose em tais células, mas não em células CD4+CD25-. Os autores verificam que tal redução atinge o máximo 4 dias após a administração da droga, sendo que com 7 dias o número de células nTreg volta ao normal. Assim, os autores demonstraram não só que as nTregs são mais sensíveis aos efeitos da Ciclofosfamida, como também possuem uma alta capacidade de renovação/reposição. Entretanto o estudo é conduzido com uma única dose de 2mg/kg sobre um organismo em homeostasia imunológica.

Semelhantemente ao trabalho anteriormente citado (LUTSIK et al, 2005), o tratamento com Ciclofosfamida, induziu uma diminuição da população CD4+CD25+CD103+ em nosso sistema experimental, após 2 dias do tratamento (resultados descritos no Anexo 1a-b, PESSINA & CARDILLO, 2006). Como observado, o tratamento reduz não só a população CD4+CD25+, mas também a proporção destas células que expressam o marcador CD103, que cai de 17% para 10,7% com o tratamento (Anexo 1b). Uma outra possibilidade é que tratamento

prolongado com Ciclofosfamida aqui descrito possa também estar induzindo o estabelecimento de populações CD4+CD25+ resistentes a esta droga.

O aumento da inflamação ocorrida após 1-2 semanas do tratamento pode ser o fator responsável pela indução do aumento da população CD4+CD25+ aqui encontrado (Figuras 10 e 12), através de uma tentativa geral do sistema em compensar a intensificação do dano tecidual. A presença do CD103 nestas células (CD4+CD25+) indicam serem estas uma população com alta capacidade regulatória (LEHMANN et al, 2002). Seu aumento, correlacionado a uma diminuição relativa dos marcadores de memória e ativação (Figuras 7, 8 e 9) parece ser uma tentativa de controle da inflamação, a qual mostra indícios de ter sido exacerbada com o tratamento (Figura 19).

A diminuição da produção de IFN γ com o tratamento, bem como o aumento na produção de IL-10, por esplenócitos em cultura (sob estímulo de IL-2 e antígeno do *T. cruzi*) mostra que o aumento relativo na população das Tregs se traduz também em um possível aumento funcional de sua capacidade regulatória. De fato, a IL-10 mostrou ser fundamental em certos modelos experimentais de doença auto imune, como a IBD (“*inflammatory bowel disease*”), para a ação *in vivo* das células nTregs (ANNACKER et al, 2001). Esta citocina anti-inflamatória, além de diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7-1 e secreção de IL-12 (ou seja, diminuindo conseqüentemente a ativação/diferenciação de linfócitos Th1), inibe a função microbicida e a produção

de NO por parte dos macrófagos (GAZZINELLI et al, 1992; revisão em KAYE, 1995). Deste modo, sua produção aumentada poderia estar diminuindo o dano tecidual decorrente da ação de radicais reativos de oxigênio nos focos de infiltrado inflamatório. O mesmo pode ser corroborado pela diminuição dos níveis de IL-12 no soro dos animais tratados, o que foi verificado após 1-2 semanas após o tratamento (Figura 17). O $IFN\gamma$, conhecida citocina pró-inflamatória, está relacionada fortemente com a indução da iNOS em macrófagos, e conseqüentemente, produção de NO (óxido nítrico) nos sítios inflamatórios. A produção diminuída de $IFN\gamma$ certamente correlaciona-se com o aumento da IL-10, visto que esta última parece possuir um efeito supressor da produção de $IFN\gamma$. Por outro lado, quatro meses após o término do tratamento, é possível verificar um retorno no número de células Tregs no baço dos animais tratados para níveis semelhantes à dos animais apenas infectados, o que coincide com o retorno nos níveis de ativação das células CD4+ e CD8+ (Figuras 7, 8 e 9), bem como da produção de IL-12 no soro (Figura 17), para um patamar semelhante àquele dos animais apenas infectados.

É importante notar também que foi encontrado um aumento de IL-17 no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais tratados com Ciclofosfamida (Figura 16). Esta potente citocina pró-inflamatória é produzida predominantemente por células de memória, TCD4+CD45RO+ em humanos (FOSSIEZ et al, 1996), as quais apresentam um perfil de citocinas diferentes da Th1 ou Th2, denominado atualmente como Th17 (HARRINGTON et al, 2005). Sua expressão depende de

ativação via TCR (LIU et al, 2005) e é estimulada tanto por IL-2 quanto, sobretudo, por IL-23 (HOEVE et al, 2006). Esta última citocina, juntamente com a IL-17, tem sido fortemente associada a doenças auto-imunes como artrite reumatóide (CHABAUD et al, 1999; revisão em LUBBERTS et al, 2005), lupus eritematoso sistêmico (WONG et al, 2000), encefalomielite autoimune experimental (HOFSTETTER et al, 2005; revisão em McGEACHY, 2005) e síndrome do intestino irritável (revisão em McKENZIE et al, 2006). Contudo, em nossos ensaios, não foi possível verificar a presença da IL-23 na cultura de esplenócitos. Ainda assim não se pode descartar um papel para esta citocina na patogênese observada na infecção crônica pelo *T. cruzi*, tendo em vista que os estímulos utilizados foram o IL-2 e antígenos de *T. cruzi*, e que, para que tal citocina seja detectada em ensaios *in vitro*, possivelmente necessite de estímulos apropriados, como por exemplo, o LPS (MA et al, 2004).

Quanto aos marcadores de memória e ativação é importante verificar que, apesar do aumento na celularidade do baço e de uma tendência ao aumento do infiltrado inflamatório, há uma diminuição dos números relativos e absolutos de células expressando marcadores de memória e ativação em animais C57Bl/6 (Figuras 7 a 9). Tais marcadores geralmente são modulados durante a ativação de uma célula “naive” de modo que a expressão de CD62L e CD45RB é diminuída, enquanto a expressão de CD44 é aumentada. Tais células classicamente respondem muito mais rapidamente a um desafio antigênico, além de responderem mais eficientemente, liberando quantidades mais elevadas de citocinas (revisão em SPRENT, 1993).

A diminuição aqui relatada é verificada no período logo após o tratamento, porém não se mantêm com o passar do tempo. Na verdade, suas proporções retornam a valores semelhantes aos animais infectados apenas, ao mesmo tempo em que a celularidade do baço também se equipara à destes animais (Figuras 7 a 9). É curioso observar que a diminuição relativa nas populações de linfócitos T de memória esteja associada a um aumento na celularidade do baço, que se trata de um indicio de linfoproliferação. Esse aumento pode ser decorrente de uma expansão policlonal de linfócitos B, que poderia ser devido a um possível aumento da oferta de IL-4 por parte das células NKT que aqui se apresentaram em número elevado (Figura 11).

É interessante observar que o aumento de células CD4+CD25+CD103+ no baço (Figura 10) se traduziu num aumento maior destas células no infiltrado do músculo esquelético (Figura 12), indicando que estas, a despeito de sua atividade supressora sobre a ativação nos órgãos linfóides periféricos, estão migrando para os sítios de inflamação. Apesar disso, a existência de um infiltrado aumentado (Figura 19c), juntamente com um aumento de células nTregs neste infiltrado sugerem que, ou o infiltrado não é do tipo inflamatório, ou o aumento de tais células não é o suficiente para contrapor os possíveis efeitos pró-inflamatórios da Ciclofosfamida na dose utilizada. Para se ter uma visão mais apurada acerca do verdadeiro motivo deste contraste, são necessários estudos aprofundados sobre as Tregs no modelo experimental de infecção crônica pelo *T. cruzi*, visto que estudos desta natureza são bastante escassos. Dando seguimento a estes

estudos, a cinética após diferentes dias do tratamento com Ciclofosfamida está em andamento em nosso laboratório.

Uma outra população encontrada aumentada no baço dos animais infectados tratados foi a dos linfócitos NKT (Figura 13). Tais células são distintas dos linfócitos T convencionais e expressam moléculas características tanto de células T convencionais (TCR $\alpha\beta+$) quanto de células NK (NK1.1). Em contraste com as células T convencionais, estas são estimuladas por glicolípídios, os quais são apresentados associado à molécula CD1d (MHC tipo I não clássico- revisão em GODFREY et al, 2000). Estudos têm demonstrado que, durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, tais células parecem contribuir para a exacerbação da inflamação tecidual (DUTHIE et al, 2002). Funcionalmente, esta célula tem sido relatada como grande produtora de IL-4 e IFN γ . No presente trabalho, foi verificado que a produção de IFN γ no sobrenadante de cultura de esplenócitos está diminuída (Figura 14), a população NK T pode estar produzindo seletivamente IL-4, a qual seria uma fonte de estimulação primária para diferenciação em Th2 a nível periférico (BENDELAC, 1992). Interessantemente, tais células estão aumentadas no baço e não nos infiltrados do músculo esquelético, indicando que estas células não migram ou que, diferentes populações funcionais de células $\alpha\beta$ +NK1.1+ estão sendo distintamente influenciadas (Figura 11 e Figura 13).

Tomando em conjunto os dados da literatura e os resultados aqui verificados, o tratamento com Ciclofosfamida (na dose de 30mg/kg) em animais cronicamente infectados parece induzir uma imunomodulação bastante dinâmica, envolvendo as células regulatórias naturais. Apesar dos efeitos deletérios da Ciclofosfamida sobre este tipo celular, houve aumento desta população ao se passarem 1-2 semanas do término do tratamento. Estes resultados mostram que, no modelo de infecção crônica pelo *T. cruzi*, tais células possuem uma alta taxa de reposição. De fato, nossos estudos indicam que esta população celular pode ainda estar diminuída mediante o tratamento *in vivo* com Ciclofosfamida, na dependência da cinética pós-tratamento (Anexo 1 e resultados em andamento).

Assim, em nosso sistema experimental descrevemos que, no caso especial do aumento de células regulatórias (CD4+CD25+CD103+) após o tratamento com Ciclofosfamida (na cinética avaliada) pode estar acontecendo como resposta à destruição tecidual intensificada pelo tratamento. Finalmente, propomos que o aumento de células regulatórias associado ao aumento da produção de IL-17 pode indicar que esta é uma resposta que acontece *in vivo* no sentido de minimizar os efeitos deletérios de células T CD4 potencialmente patogênicas no microambiente tecidual, como anteriormente proposto em outros modelos com enfoque em linfócitos T CD4 autorreativos (Figura 22). Em consequência, poderíamos propor que a diminuição de interleucina-17 e interferon-gama, tardiamente após o tratamento com Ciclofosfamida, seria decorrente da ação de populações celulares que serão futuramente avaliadas em nossos estudos.

7. CONCLUSÕES

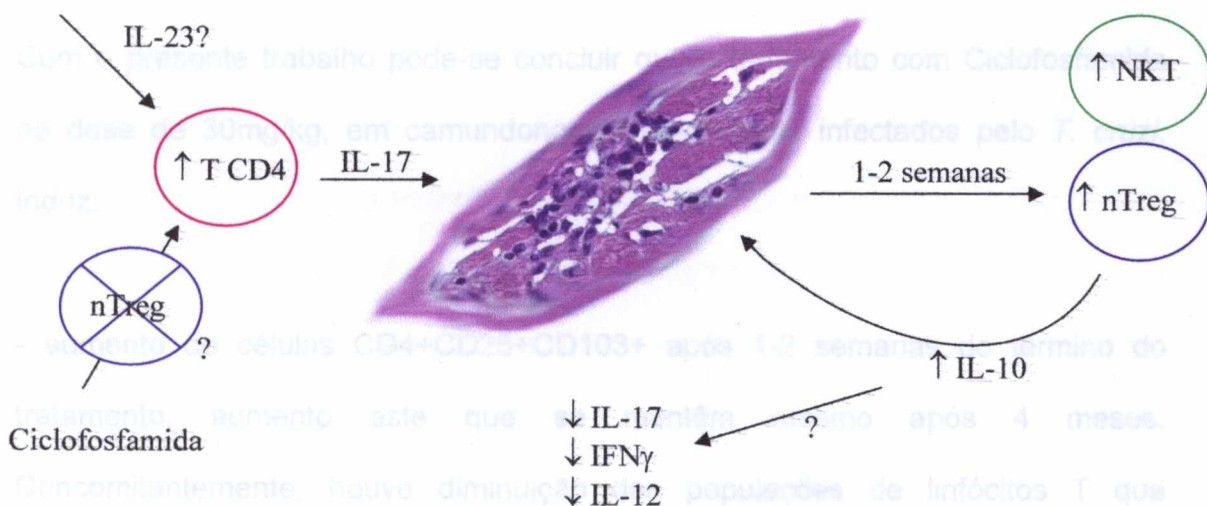


Figura 22 – Esquema mostrando a possível dinâmica imunológica que ocorre em decorrência do tratamento com Ciclofosfamida em animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*.

de linfócitos T observada 1-2 semanas após o tratamento

o aumento na produção de IL-10 por esplenócitos e diminuição na produção de IFN γ após 1-2 semanas, que permanece mesmo após 4 meses pós-tratamento. O aumento na produção de IL-10 parece estar relacionado à maior atividade de células T regulatórias. Nesta mesma situação, houve ainda diminuição nos níveis de IL-12 no soro dos animais tratados após 1-2 semanas. Após 4 meses os níveis de IL-12 retornam ao mesmo patamar dos animais infectados controle, estando relacionado com os baixos níveis de IFN γ encontrados após o tratamento.

7. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho pode-se concluir que o tratamento com Ciclofosfamida na dose de 30mg/kg, em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, induz:

- aumento de células CD4+CD25+CD103+ após 1-2 semanas do término do tratamento, aumento este que se mantém mesmo após 4 meses. Concomitantemente, houve diminuição das populações de linfócitos T que apresentam marcadores de memória e ativação, em camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen, após as primeiras semanas pós-tratamento. Esses resultados, associados aos perfis de citocina encontrados, indicam que o aumento de células regulatórias pode estar relacionado à diminuição da ativação de linfócitos T observada 1-2 semanas após o tratamento.

- aumento na produção de IL-10 por esplenócitos e diminuição na produção de IFN γ após 1-2 semanas, que permanece mesmo após 4 meses pós-tratamento. O aumento na produção de IL-10 parece estar relacionado à maior atividade de células T regulatórias. Nesta mesma situação, houve ainda diminuição nos níveis de IL-12 no soro dos animais tratados após 1-2 semanas. Após 4 meses os níveis de IL-12 retornam ao mesmo patamar dos animais infectados controle, estando relacionado com os baixos níveis de IFN γ encontrados após o tratamento.

- tendência ao aumento de infiltrado inflamatório em animais Balb/c infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, após 1-2 semanas do tratamento, período em que se encontra aumento na produção de IL-17 por esplenócitos destes animais. Aos 4 meses, a quantidade do infiltrado está nitidamente semelhante à dos animais infectados e não tratados, momento em que a produção de IL-17 pelos esplenócitos encontra-se diminuída nos animais tratados. Esta diminuição de IL-17 pode ser decorrente da ação persistente de células regulatórias (aumentadas desde 1-2 semanas após o tratamento).

Concluimos finalmente que o sistema experimental avaliado poderá contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos na atividade regulatória dos linfócitos T aqui descritos, no sentido de minimizar uma resposta inflamatória na doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLAMUNITS, V.; QUINTANA, F.; RESHEF, T.; ELIAS, D.; COHEN, I.R. Acceleration of autoimmune diabetes by cyclophosphamide is associated with an enhanced IFN-gamma secretion pathway. **J. Autoimmun.**, **13(4)**:383-92, 1999.

ADAMS, A.; MACDERMOTT, E.J.; LEHMAN, T.J. Pharmacotherapy of lupus nephritis in children : a recommended treatment approach. **Drugs.**, **66(9)**:1191-1207, 2006

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, **64(6)**:1961-1967, 1996.

ALTCLAS, J.; SINAGRA, A.; DICTAR, M.; LUNA, C.; VERÓN, M.T.; DE RISSIO, A.M.; GARCÍA, M.M.; SALGUEIRA, C.; RIARTE, A. Chagas disease in bone marrow transplantation: an approach to preemptive therapy. **Bone Marrow Transplant.**, **36(2)**:123-129, 2005.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo baiano. **Rev. Patol. Trop.**, **3**: 65 – 121, 1974.

ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardialopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **85(1)**:17-27, 1990.

ANDRADE, S.G. Patologia Experimental da Doença de Chagas. Em: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap 11:177-200, 2000.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHAES, J.B.; NETTO, M.B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Trop Med Parasitol.**, **79(4)**:397-407, 1985b.

ANDRADE, S.G., MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30(1)**:27-35, 1997

ANDRADE, S.G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A.S.; GRIMAUD, J.A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **86(2)**:187-200, 1991.

ANDRADE, V.; ANDRADE, S.G.; BARRAL NETTO, M.; PONTES, ^aL.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 143-154, 1985c.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M., ANDRADE, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **18(4)**: 499-506, 1985

ANDRADE, Z.A. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Found Symp.**, **99**:214-33, 1983.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am. J. Pathol.**, **127(3)**:467-73, 1987.

ANNACKER, O.; PIMENTA-ARAUJO, R.; BURLIN-DEFRANOUX, O.; BARBOSA, T.C.; CUMANO, A.; BANDEIRA, A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of

peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. **J. Immunol.**, **166(5)**:3008-18, 2001.

ARAUJO, F.G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. **Infect. Immun.**, **57(7)**:2246-8, 1989.

ARAÚJO-JORGE, T.C. & CASTRO, S.L. Resposta imune inata, inflamatória e de fase aguda na doença de Chagas. Em: Araújo-Jorge & Castro (Eds). *Doença de Chagas – Manual para experimentação animal*. Editora Fiocruz. Cap 4.1: 39-47, 2000

ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature**, **181(4613)**:931, 1958.

ASKENASE, P.W.; HAYDEN, B.J.; GERSHON, R.K. Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. **J. Exp. Med.**, **141(3)**:697-702, 1975.

BARTHLOTT, T.; MONCRIEFFE, H.; VELDHOEN, M.; ATKINS, C.J.; CHRISTENSEN, J.; O'GARRA, A.; STOCKINGER, B. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. **Int. Immunol.**, **17(3)**: 279-88, 2005.

BENDELAC, A. Intrathymic activation events and the generation of IL-4 producer CD4+8- thymocytes. **Semin. Immunol.**, **4(3)**:187-193, 1992.

BERENBAUM, M.C.; COPE, W.A.; DOUBLE, J.A. The effect of microsomal enzyme inhibition on the immunosuppressive and toxic effects of cyclophosphamide. **Clin Exp Immunol.**, **14(2)**:257-270, 1973.

BRENER, Z. A descoberta (Homenagem aos 80 anos da descoberta da Doença de Chagas). **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.** **84(Supp. II):** 1-6, 1989.

BROCK, N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. **Cancer;** **78(3):** 542-547, 1996.

BROCK, N. & HOHORST, H.J. Metabolism of cyclophosphamide. **Cancer,** **20(5):**900-904, 1967.

BRODSKY, R.A. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. **Scientific World Journal,** **2:**1808-1815, 2002.

CARDILLO, F.; FALCAO, R.P.; ROSSI, M.A.; MENGEL, J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur. J. Immunol.,** **23(10):**2597-605, 1993.

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. The role of the thymus in modulating gammadelta T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Int. Immunol.,** **10(2):**107-116, 1998

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; POSTOL, E.; MENGEL, J. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Med. Sci. Monit.,** **10(8):** BR259-267, 2004 .

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.,** **64(1):**128-34, 1996.

CERDAN, C.; MARTIN, Y.; COURCOUL, M.; MAWAS, C.; BIRG, F.; OLIVE, D. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. **Res. Immunol.**, **146(3)**: 164-168, 1995.

CHABAUD, M.; DURAND, J.M.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.; MIOSSEC, P. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum.**, **42(5)**:963-970, 1999.

CHARLTON, B.; BACELJ, A.; SLATTERY, R.M.; MANDEL, T.E. Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/WEHI mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus. **Diabetes**, **38(4)**:441-447, 1989.

CONNORS, T.A.; COX, P.J.; FARMER, P.B.; FOSTER, A.B.; JARMAN, M. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. **Biochem. Pharmacol.**, **23(1)**:115-29, 1974.

CONNORS, T.A.; GROVER, P.L.; MCLOUGHLIN, A.M. Microsomal activation of cyclophosphamide in vivo. **Biochem. Pharmacol.**, **19(4)**:1533-1535, 1970.

DE MEIS, J.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; CORREA-DE-SANTANA, E.; PINTO-MARIZ, F.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BONOMO, A.; SAVINO, W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. **Microbes Infect.** **8(1)**:221-31, 2006.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Editora – Guanabara Koogan. cap 5:48-74, 2000.

DICTAR, M.; SINAGRA, A.; VERON, M.T.; LUNA, C.; DENGRA, C.; DE RISSIO, A.; BAYO, R.; CERASO, D.; SEGURA, E.; KOZINER, B.; RIARTE, A. Recipients and donors of bone marrow transplants suffering from Chagas' disease: management and preemptive therapy of parasitemia. **Bone Marrow Transplant.**, **21(4)**:391-393, 1998.

DUTHIE, M.S.; WLEKLINSKI-LEE, M.; SMITH, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; KAHN, S.J. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. **Infect. Immun.**, **70(1)**:36-48, 2002.

FAHLEN, L.; READ, S.; GORELIK, L.; HURST, S.D.; COFFMAN, R.L.; FLAVELL, R.A.; POWRIE, F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, **201(5)**:737-46, 2005.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, F.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, **272(5258)**: 50-54, 1996.

FEHERVARI, Z. & SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. **J. Clin. Invest.**, **114(9)**: 1209 –1217, 2004.

FOLEY, G.E.; FRIEDMAN, O.M.; DROLET, B.P. Studies on the mechanism of action of cytoxan. Evidence of activation in vivo and in vitro. **Cancer Res.**, **21**:57-63, 1961

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, **4(4)**:330–336, 2003.

FOSSIEZ, F.; DJOSSOU, O.; CHOMARAT, P.; FLORES-ROMO, L.; AIT-YAHIA, S.; MAAT, C.; PIN, J.J.; GARRONE, P.; GARCIA, E.; SAELAND, S.; BLANCHARD, D.; GAILLARD, C.; DAS MAHAPATRA, B.; ROUVIER, E.; GOLSTEIN, P.; BANCHEREAU, J.; LEBECQUE, S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J Exp Med.** **183(6)**:2593-603, 1996.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.**, **148(6)**:1792-1796, 1992.

GERSHON, R.N. & KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, **18(5)**:723-737, 1970.

GINZLER, E.M.; DOOLEY, M.A.; ARANOW, C.; KIM, M.Y.; BUYON, J.; MERRILL, J.T.; PETRI, M.; GILKESON, G.S.; WALLACE, D.J.; WEISMAN, M.H.; APPEL, G.B. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. **N. Engl. J. Med.**, **353(21)**:2219-2228, 2005.

GODFREY, D.I.; HAMMOND, K.J.; POULTON, L.D.; SMYTH, M.J.; BAXTER, A.G. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunol. Today.**, **21(11)**:573-583, 2000.

HADAYA, K.; KARED, H.; MASSON, A.; CHATENOU, L.; ZAVALA, F. G-CSF treatment prevents cyclophosphamide acceleration of autoimmune diabetes in the NOD mouse. **J. of Autoimmun.**, **24(2)**: 125-134, 2005.

HAFIZI, A. & MODABBER, F.Z. Effect of cyclophosphamide on *Toxoplasma gondii* infection: reversal of the effect by passive immunization. **Clin. Exp. Immunol.**, **33(3)**:389-394, 1978.

HARADA, M. & MAKINO, S. Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. **Diabetologia**; **27(6)**:604-606, 1984.

HARRINGTON, L.E.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; TURNER, H.; MURPHY, T.L.; MURPHY, K.M.; WEAVER, C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol.**, **6(11)**:1123-1132, 2005.

HOEVE, M.A.; SAVAGE, N.D.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D.M.; DE WAAL MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T.H.; VERRECK, F.A. Divergent effects of IL-12 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. **Eur J Immunol.**, **36(3)**:661-70, 2006.

HOFSTETTER, H.H.; IBRAHIM, S.M.; KOCZAN, D.; KRUSE, N.; WEISHAUPT, A.; TOYKA, K.V.; GOLD, R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cell Immunol.**, **237(2)**:123-130, 2005.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, **299(5609)**:1057–1061, 2003.

HOUGH, V. & ROBINSON, T.W. Exacerbation and reactivation of Herpesvirus hominis infection in mice by cyclophosphamide. **Arch Virol.**, **48(1)**:75-83, 1975.

KANAMARU, F.; YOUNGNAK, P.; HASHIGUCHI, M.; NISHIOKA, T.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S.; ISHIKAWA, I.; AZUMA, M. Costimulation via glucocorticoid-

induced TNF receptor in both conventional and CD25⁺ regulatory CD4⁺ T cells. **J. Immunol.**, **172(12)**:7306-7314, 2004.

KATSIFIS, G.E. & TZIOUFAS, A.G. Ovarian failure in systemic lupus erythematosus patients treated with pulsed intravenous cyclophosphamide. **Lupus**,**13(9)**: 673-678, 2004.

KAYE, P.M. Costimulation and the regulation of antimicrobial immunity. **Immunol. Today.**,**16(9)**:423-7, 1995.

KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S.A.; RAMSDELL, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **Nat. Immunol.** **4(4)**:337–342, 2003.

KOEBERLE, G. & PENHA, P.D. Chagas' mega-esophagus. (Quantitative studies on the intramural nervous-system of the esophagus). **Z. Tropenmed. Parasitol.**, **10**: 291-295, 1959.

KOO, G.C. & PEPPARD, J.R. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. **Hybridoma.** **3(3)**:301-3, 1984.

KOVARIK, J.; FAULKNER-JONES, B.E.; KOULMANDA, M.; MANDEL, T.E. Cytokines and autoimmune beta cell destruction in NOD mouse fetal pancreas isografts in cyclophosphamide-induced diabetes. **Autoimmunity**, **26(4)**: 245-252, 1997.

KUMAR, S. & TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, **20(5)**:207-16, 1998.

L'AGE-STEHR, J. & DIAMANTSTEIN, T. Studies on induction and control of cell-mediated autoimmunity. I. Induction of "autoreactive" T lymphocytes in mice by cyclophosphamide. **Eur. J. Immunol.**, **8(9)**: 620-624, 1978.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **J. Exp. Med.** **172(3)**:921-9, 1990.

LEHMANN, J.; HUEHN, J.; DE LA ROSA M, MASZYNA F, KRETSCHMER U, KRENN V, BRUNNER M, SCHEFFOLD A, HAMANN A. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **99(20)**: 13031–13036, 2002.

LEITE-DE-MORAES, M.C.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; MINOPRIO, P.; EISEN, H.; BANDEIRA, A. Skewed V β TCR repertorie of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Int. Immunol.**, **6(3)**: 387-392, 1994.

LIU, X.K.; CLEMENTS, J.L.; GAFFEN, S.L. Signaling through the murine T cell receptor induces IL-17 production in the absence of costimulation, IL-23 or dendritic cells. **Mol. Cells.**, **20(3)**: 339-347, 2005.

LOPES, M.F. & DOS REIS, G.A.. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. **Apoptosis**, **5(3)**: 221-4, 2000.

LUBBERTS, E.; KOENDERS, M.I.; VAN DEN BERG, W.B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. **Arthritis Res. Ther.**, **7(1)**: 29-37, 2005.

LUTSIAK, M.E.; SEMNANI, R.T.; DE PASCALIS, R.; KASHMIRI, S.V.; SCHLOM, J.; SABZEVARI, H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood**, **105(7)**: 2862-2868, 2005.

MA, X.T.; ZHANG, X.J.; ZHANG, B.; GENG, Y.Q.; LIN, Y.M.; LI, G.; WU, K.F. Expression and regulation of interleukin-23 subunits in human peripheral blood mononuclear cells and hematopoietic cell lines in response to various inducers. **Cell Biol. Int.**, **28(10)**: 689-697, 2004.

MALEK, T.R.; YU, A.; VINCEK, V.; SCIBELLI, P.; KONG, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. **Immunity**. **17(2)**: 167–178, 2002.

MARTIN, D. & TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol. Rev.**, **201**: 304-317, 2004.

MARTINS, G.A.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; SILVA, J.S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol. Lett.**, **63(2)**: 113-120, 1998.

MCGEACHY, M.J. & ANDERTON, S.M. Cytokines in the induction and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cytokine**, **32(2)**:81-4, 2005.

MCHUGH, R.S; WHITTERS, M.J.; PICCIRILLO, C.A.; YOUNG, D.A.; SHEVACH, E.M.; COLLINS, M.; BYRNE, M.C. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity.**, **16(2)**: 311-323, 2002.

MCKENZIE, B.S; KASTELEIN, R.A; CUA, D.J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends Immunol.**, **27(1)**: 17-23, 2006.

MELO, R.C. & BRENER, Z.. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, **64(3)**: 475-482, 1978.

MENGEL, J.O. & ROSSI, M.A. Chronic chagasic myocarditis pathogenesis: dependence on autoimmune and microvascular factors. **Am. Heart. J.**, **124(4)**: 1052-1057, 1992.

MINAMI, Y.; KONO, T.; MIYAZAKI, T.; TANIGUCHI, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. **Annu. Rev Immunol.**, **11**: 245-267, 1993.

MINOPRIO, P. & COUTINHO, A. Lymphocyte subpopulations and clonal repertoires participate in immune response to acute *T. cruzi* infection. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** **83 (Suppl 1)**:356-9, 1988.

MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand. J. Immunol.** **24(6)**:661-8, 1986.

MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P.; COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **J. Immunol.**, **139(2)**:545-550, 1987.

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TcR1 T cells. **Immunol. Rev.** **112**:183-207, 1989.

NIHEI, J. **Estudo de células que migram para os infiltrados inflamatórios na ausência de linfócitos B e durante a infecção experimental pelo T cruzi: o**

papel de células T NK1.1. 2005. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e Universidade Federal da Bahia.

NORRIS, K.A.; BRADT, B.; COOPER, N.R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.**, **147(7)**:2240-2247, 1991.

OPASTIRAKUL, S. & CHARTAPISAK, W. Infection in children with lupus nephritis receiving pulse and oral cyclophosphamide therapy. **Pediatr. Nephrol.**, **20(12)**: 1750-1755, 2005.

PAPIERNIK, M.; DE MORAES, M.L.; PONTOUX, C.; VASSEUR, F.; PENIT, C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **Int. Immunol.** **10(4)**: 371–378, 1998.

PESSINA, D. ; ANDRADE, S. G.; CARDILLO, F. The effect of cyclophosphamide treatment on Tregs and on their immunomodulatory mechanisms during experimental Chagas' Disease. Resumo em: Congresso Brasileiro de Imunologia, 2005, Águas de São Pedro. Annual meeting of society of immunology, 2005.

PESSINA, D. & CARDILLO, F. Tregs may be associated to immune alterations induced after cyclophosphamide treatment in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Resumo em: 16th European Congress of Immunology, Paris, 2006.

PICCIRILLO, C.A.; LETTERIO, J.J.; THORNTON, A.M.; MCHUGH, R.S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E.M. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. **J. Exp. Med.**, **196(2)**: 237-246, 2002.

POSTÓL, E. **O papel das células NK1.1+ no lupo eritematoso sistêmico experimental.** 1999. 171f. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

PRYOR, B.D.; BOLOGNA, S.G.; KAHL, L.E. Risk factors for serious infection during treatment with cyclophosphamide and high-dose corticosteroids for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, **39(9)**:1475-1482, 1996.

RAJAGOPALAN, G.; KUDVA, Y.C.; SEN, M.M.; MARIETTA, E.V.; MURALI, N.; NATH, K.; MOORE, J.; DAVID, C.S. IL-10-deficiency unmasks unique immune system defects and reveals differential regulation of organ-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. **Cytokine**, **34(1-2)**: 85–95, 2006.

RASSI, A. Doença de Chagas. Em. *Doenças Infeciosas e Parasitárias*. RJ: Editora Guanabara Koogan. 674, 1987.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. Em: *Molecular Approaches to Parasitology*. New York: Wiley-Liss, Inc, pp 443-453, 1995.

REVELLI, S.; DAVILA, H.; MORENO, H.; BOTRASSO, O. Depressed adjuvant arthritis in chronically *Trypanosoma cruzi* infected rats: reversal by cyclophosphamide. **J. Rheumatol.**, **19(4)**:513-516, 1992.

REVELLI, S.; GOMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O.; BASOMBRIIO, M.A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, **85(2)**: 147-150, 1999.

REY, L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas. Em. *Bases da Parasitologia Médica*. RJ: Editora Guanabara Koogan. cap 3 : 24-41, 2002.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SILVA, J.S.; SAVINO, W.; MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **175(1)**: 29-39, 1992.

ROTTENBERG, M.E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.** **61(12)**:5129-33, 1993.

ROTTENBERG, M.E.; CARDONI, R.L.; SEGURA, E.L. Involvement of L3T4+, LYT2.2+ T cell subsets and non-T cells in the resistance of mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Int. J. Parasitol.**, **20(3)**: 397-400, 1990.

RUSSO, M.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Depletion of L3T4+ T lymphocytes during acute *Trypanosoma cruzi* infection abolish macrophage and B lymphocyte activation but not tissue inflammatory reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83**: 527-538, 1988.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** **22**: 531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, **155(3)**: 1151-1164, 1995.

SAMUDIO, M.; MONTENEGRO-JAMES, S.; DE CABRAL, M.; MARTINEZ, J.; ROJAS DE ARIAS, A.; WORONIECKY, O.; JAMES, M.A. Differential expression of

systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. **Acta Trop.**, **69(2)**: 89-97, 1998.

SATO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M.L.; DUARTE, A.J. CD8⁺ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Infect. Immun.** **60(3)**:1024-1030, 1992.

SCHIFFER, L.; SINHA, J.; WANG, X.; HUANG, W.; VON GERSDORFF, G.; SCHIFFER, M.; MADAIO, M.P.; DAVIDSON, A. Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. **J. Immunol.**, **171(1)**: 489-497, 2003.

SCHWARTZ, A.; ASKENASE, P.W.; GERSHON, R.K. Regulation of delayed-type hypersensitivity reactions by cyclophosphamide-sensitive T cells. **J Immunol.**, **121(4)**: 1573-1577, 1978.

SCOLLAY, R.G.; BUTCHER, E.C.; WEISSMAN, I.L. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. **European Journal of Immunology**, **10 (3)**: 210-218, 1980.

SETOGUCHI, R.; HORI, S; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Homeostatic maintenance of natural *Foxp3*⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **J. Exp. Med.**, **201(5)**: 723-735, 2005.

SHAND, F.L. The capacity of microsomally-activated cyclophosphamide to induce immunosuppression in vitro. **Immunology**, **35(6)**: 1017-1025, 1978.

SHAND, F.L. The immunopharmacology of cyclophosphamide. **Int. J. Immunopharmacol.**, **1(3)**: 165-171, 1979.

SHERLOCK, I.A. Vetores. Em: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Editora – Guanabara Koogan. cap 3:21-40, 2000.

SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T.; ISHIDA, Y.; SAKAGUCHI, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat. Immunol.** **3(2)**: 135-142, 2002.

SOBEL, D.O.; AHVAZI, B.; JUN, H.S.; CHUNG, Y.H.; YOON, J.W. Cyclophosphamide inhibits the development of diabetes in the diabetes-prone BB rat. **Diabetologia**, **43(8)**:986-994, 2000.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **83(2)**:141-152, 1996.

SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. Em: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Editora – Guanabara Koogan. cap 7:88-126, 2000

SPRENT, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, **5(3)**:433-8, 1993.

SPRENT J. & SURH, C.D. Generation and maintenance of memory T cells. **Curr. Opin. Immunol** **13(2)**:248-54., 2001

STEFANI, M.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Immunol. Lett.**, **7(2)**: 91-97, 1983.

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunol.**, **145(11)**:3796-806, 1990.

TAIT, A. Sexual processes in the kinetoplastica. **Parasitology**, **86(Pt 4)**: 29-57, 1983.

TAKAHASHI, T., TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; UEDE, T.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, N.; MAK, T.W.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte- associated antigen 4. **J. Exp. Med.** **192(2)**:303–310, 2000.

TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H.; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp Parasitol.**, **52(1)**: 137-146, 1981.

TAMBOURGI, C.V.; KIPNIS, T.L.; DIAS DA SILVA, W.; HEATH, S.; HALL, B.F.; SHER, A.; JOINER, K.A.; OGDEN, G.B. A parcial cDNA clone of T-DAF, a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infect. Immun.**, **61(9)**:3656-3663, 1993.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, **144(2)**:717-24, 1990.

THORNTON, A.M.; DONOVAN, E.E.; PICCIRILLO, C.A.; SHEVACH, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. **J. Immunol.** **172(11)**: 6519–6523, 2004.

TONE, M.; TONE, Y.; ADAMS, E.; YATES, S.F.; FREWIN, M.R.; COBBOLD, S.P.; WALDMANN, H. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, **100(25)**: 15059-15064, 2003.

WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J.M.; TIMMS, E.; WAKEHAM, A.; SHAHINI, A.; LEE, K.P.; THOMPSON, C.B.; GRIESSER, H.; MAK, T.W. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. **Science.** **270(5238)**: 985-988, 1995.

WICKER, L.S.; APPEL, M.C.; DOTTA, F.; PRESSEY, A.; MILLER, B.J.; DELARATO, N.H.; FISCHER, P.A.; BOLTZ, R.C. JR.; PETERSON, L.B. Autoimmune syndromes in major histocompatibility complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The NOD MHC is dominant for insulinitis and cyclophosphamide-induced diabetes. **J. Exp. Med.**, **176(1)**: 67-77, 1992.

WHO. Control of Chagas' disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva. *WHO Technical Report Series.*, 905:40-68, 2002

WONG, C.K.; HO, C.Y.; LI, E.K.; LAM, C.W. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, **9(8)**: 589-593, 2000.

YOUNÈS-CHENNOUFI, A.B.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; TRICOTTET, V.; EISEN, H.; REYNES, M.; SAID, G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **82(1)**:77-83, 1988

ZHANG, L. & TARLETON, R.L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur. J. Immunol.**, **26(1)**: 102-9, 1996.

9- ANEXO 1

ANEXO 1a – Resumo apresentado no 16th European Congress of Immunology, Paris, França: “TREGS MAY BE ASSOCIATED TO IMMUNE ALTERATIONS INDUCED AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE TREATMENT IN CHRONICALLY *Trypanosoma cruzi*-INFECTED MICE.”; PESSINA, D & CARDILLO, F; 2006.

ANEXO 1b – Pôster apresentado no congresso acima citado.

ANEXO 1a

3450	<p>TREGS MAY BE ASSOCIATED TO IMMUNE ALTERATIONS INDUCED AFTER CYCLOPHOSPHAMIDE TREATMENT IN CHRONICALLY TRYPANOSOMA CRUZI-INFECTED MICE</p> <p>D PESSINA¹, F CARDILLO¹</p> <p>(1) , Oswaldo Cruz Foundation; Gonçalo Moniz Research Center, Cellular Immunology, Autoimmunity and Experimental Chagas' Disease Laboratory. R Valdemar Falcão 121. Candeal, 40295-001, Salvador-BA. Supported by FAPESP and CNPq., Brazil.</p>
<p>Preferred presentation format: Poster Abstract category 1 (mandatory): B25-Regulatory T cells. EFIS / ECI Grants (CF "Grants"): NO.</p>	<p>During <i>Trypanosoma cruzi</i> infection, many T cell-subpopulations are involved in the inflammatory response found in many tissues. It has been described that mice treated with low doses of Cyclophosphamide (CY) may have an imbalance of the immunoregulatory mechanisms, during <i>T. cruzi</i> infection. The pattern of T cell activation, the presence of Tregs and the cytokines that are produced in both C57Bl/6 and BALB/c mice after CY treatment were analyzed during infection. BALB/c and C57Bl/6 mice were infected respectively with the Colombian or the Tulahuen strain of <i>T. cruzi</i>. During the chronic phase of infection, these mice were treated during one month with CY (30 mg/kg). Thereafter, mice were analyzed in three different time-points: very early after CY treatment, one week and three months after. In those two last time-points, memory/effector T cells were decreased in spleens from C57Bl/6 CY-treated mice. Increased NK T cells and T regs were found in splenocytes and mononuclear cells from skeletal muscle inflammatory infiltrates (MNSkM). Regarding cytokine production, IL-10 was found to be increased in peripheral mononuclear cells (PBMC) and in spleencells supernatants while IFN-g was decreased when evaluated in the same compartments. Studies with infected and CY-treated BALB/c mice have shown slightly differences of cell activation and cytokine production. Surprisingly, IL-17 was profoundly increased one week after treatment being decreased after 3 months in CY-treated BALB/c mice. After CY-treatment, increased Tregs in spleens and MNSkM correlated with increased IL-10 and decreased IFN-g produced in spleen-cell supernatants, with a lower percentage of memory/effector splenic T cells. As a matter of fact, this may occur as a compensatory regulatory mechanism in order to minimize inflammation or tissue damage, after treatment. Studies are under way to evaluate the role of IL-17 in relation to potentially pathogenic T cells in our experimental system.</p>

