



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

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS T NK1.1+NO
MÚSCULO ESTRIADO, DURANTE A INFECCÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* EM ANIMAIS
DESPROVIDOS DE LINFÓCITOS B FUNCIONAIS.**

JORGE SADA O NIHEI

**Salvador - Bahia - Brasil
2005**



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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS T NK1.1+ NO
MÚSCULO ESTRIADO, DURANTE A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* EM ANIMAIS
DESPROVIDOS DE LINFÓCITOS B FUNCIONAIS.**

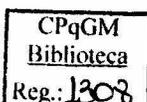
JORGE SADAQ NIHEI

**Orientador(es): Dr. José Orivaldo Mengele Júnior
Dr^a. Fabiola Cardillo**

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

Salvador - Bahia - Brasil

2005



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

N687e Nihei, Jorge Sadao
Estudo da migração de células T Nk1.1+ no músculo estriado, durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma Cruzi* em animais desprovidos de linfócitos B funcionais. [manuscrito]. / Jorge Sadao Nihei. - 2005. 157 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientadores: Prof. Dr. José Orivaldo Mengele Júnior e Dr^a. Fabiola Cardillo, Laboratório de Chagas-Autoimunidade e Imunologia Celular.

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

CDU 577.27:593.161

1 011598 12

PHL
117V 1308
577

Estudo da migração de células T Nk1.1+ no músculo estriado, durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma Cruzi* em animais desprovidos de linfócitos B funcionais

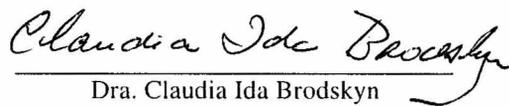
JORGE SADA O NIHEI

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Edilberto Postól
Analista do Laboratório de Imunologia
Instituto do Coração/InCor-SP



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Associada
CPqGM-FIOCRUZ



Dra. Fabíola Cardillo
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

APOIO FINANCEIRO

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo reagente necessário ao isolamento de linfócitos.

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

AOS ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES

Os meus agradecimentos aos Órgãos e Instituições que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

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

Ao curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental e aos professores das disciplinas ministradas durante o curso.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de Mestrado nos períodos de 2003 a 2005.

*"A Deus pela vida,
Aos meus pais Ryuichi Nihei e Ayako
Nihei (in memoriam) por guiar meus
passos,
E aos meus irmãos, Kenji, Yoko e
Shiguo pelo incentivo, apoio e carinho
dedicados em todos os momentos da
minha vida".*

AGRADECIMENTOS

- Aos orientadores **Dr. José Orivaldo Mengele Jr. e Dr^a. Fabiola Cardillo** por permitir o desenvolvimento do trabalho de mestrado sob orientação de ambos e pela amizade, empenho, dedicação e paciência na orientação do mesmo, sem poupar esforços para garantir o seu bom desenvolvimento, e por compartilhar comigo a sua experiência na bancada e nas discussões científicas.
- À **Dr^a. Sonia Gumes Andrade** pelo auxílio nas análises histopatológicas, pelas discussões e conselhos durante o período do estudo e pela inestimável contribuição no estabelecimento de nosso laboratório no CPqGM.
- Ao **Dr. Auro Nomizo** pela sua amizade, apoio e companheirismo de valores inestimáveis desde os meus primeiros passos na iniciação científica. Agradeço ao Auro por sua paciência em passar os seus conhecimentos e por permitir e sempre me incentivar na realização deste trabalho.
- Aos responsáveis pelo Biotério, **Fabienne** no cuidado dos animais fornecidos. e **Victor** por fornecer as amostras de sangue para triagem dos animais C57Bl/6 IL-10 KO e μ MT.
- Ao amigo **Daniel Huber Pessina** pelo auxílio nos experimentos, amizade e discussões importantes para o desenvolvimento do trabalho.
- Aos amigos **Renata Siqueira Portella, Torricelli The de Souza, Karina Sobral, Celma Duarte e Isis Magalhães** pelo apoio e companheirismo durante todo este trabalho.
- Um agradecimento especial a **Dinalva França de Jesus** pela amizade, carinho e amparo de valor inestimável durante o desenvolvimento do trabalho e por me auxiliar no meu desenvolvimento espiritual.
- Aos outros integrantes do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI), pelo companheirismo e amizade: **Juracy Magalhães, Maria de Fátima Magalhães, Ariane Pimentel e Presciano Correa** pelo auxílio na realização deste trabalho.
- Ao **Dr. Luiz Antônio de Freitas**, por permitir a utilização do Criostato do Laboratório de Patologia e Bioinvestigação (LPBI). E aos integrantes do LPBI pelo auxílio na utilização do Criostato. À **Dra. Aldina Barral**, pela facilidade no uso do Citometro de Fluxo.

- Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX): **Elisangela Trindade, Liliâne Cunha, Cláudia, Antonio Carlos, Joaquim, Bárbara** pela amizade e auxílio prestado.
- Às equipes da Biblioteca, do setor de Histopatologia, de Informática e de Recursos Audio-visuais, e do Biotério do CPqGM, que sempre se mostraram prontos para prestar o auxílio necessário.
- Ao pessoal da Limpeza (MASP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, especificamente, **Dona Lia, Cláudio** e outros que mesmo não envolvidos neste trabalho se mostraram sempre prestativos para outras eventualidades.
- **Aos amigos**, que mesmo distantes me apoiaram em todos os momentos de minha caminhada nesses 2 anos de mestrado.
- **À Tatiana Simas** que através de seu amor, compreensão e apoio me ajudou nesta parte de minha caminhada.
- Aos amigos **Paulo Melo e Matheus Santos de Sá** que através de suas amizades sinceras permitiu a formação de um laço de família entre nós.
- A **todos** aqueles que, mesmo não sendo citados nominalmente, colaboraram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>Aspectos Gerais da Doença de Chagas</i>	23
1.2 <i>Fases e Observações sobre a Doença de Chagas</i>	24
1.3 <i>Resposta Inata</i>	26
1.4 <i>Mecanismos efetores: Citocinas produzidas durante a infecção por Trypanosoma cruzi</i>	29
1.5 <i>A importância de linfócitos T durante a infecção por Trypanosoma cruzi</i>	31
1.6 <i>As células T NK e a molécula CD1</i>	33
1.7 <i>A resposta humoral e a importância de linfócitos B durante a infecção pelo Trypanosoma cruzi</i>	37
1.8 <i>Estudo de mecanismos envolvidos na memória imunológica</i>	39
2 OBJETIVOS	43
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	43
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	43

3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	<i>Animais</i>	45
3.2	<i>Parasitas</i>	45
3.3	<i>Determinação do número de parasitas no sangue circulante</i>	45
3.4	<i>Infecção Aguda e Crônica</i>	46
3.5	<i>Transferência adotiva de células B</i>	46
3.6	<i>Tratamento com Imunoglobulinas</i>	47
3.7	<i>Depleção de células NK1.1+ in vivo</i>	48
3.8	<i>Cultura de células do baço para obtenção de sobrenadante</i>	48
3.9	<i>Dosagem de citocinas</i>	48
3.10	<i>Isolamento de células mononucleares do músculo estriado esquelético</i>	50
3.11	<i>Preparação das células do baço total para coloração por Citometria de fluxo.(FACS)</i>	50
3.12	<i>Análise das populações celulares por citometria de fluxo</i>	51
3.13	<i>Protocolo experimental para análise de populações linfocitárias após coleta de células no FACS</i>	51
3.14	<i>Avaliação histológica</i>	54
3.15	<i>Imunohistoquímica</i>	54
3.16	<i>Forma de análise dos resultados</i>	56
4	RESULTADOS	57

4.1	<i>Avaliação dos padrões de resistência à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando-se a cepa Tulahuen em camundongos C57Bl/6.....</i>	57
4.1.1	<i>Níveis de formas tripomastigotas circulantes em animais μMT e C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen de <i>T. cruzi</i>.....</i>	57
4.1.2	<i>Taxa de mortalidade/sobrevida.....</i>	58
4.2	<i>Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase aguda (30 dias) da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</i>	60
4.3	<i>Marcadores de superfície celular sobre linfócitos T do baço evidenciados por citometria de fluxo (FACS) durante a fase aguda da infecção (30 dias).....</i>	61
4.3.1	<i>Alterações quantitativas das populações de células T de baço que apresentam marcadores de memória imunológica CD45RB^{neg}.....</i>	61
4.3.1.1	<i>Gráficos representativos das populações de células T de baço que apresentam marcadores de memória imunológica: a expressão de CD45RB^{neg} na fase aguda.....</i>	63
4.3.2	<i>Alterações na quantidade de esplenócitos que apresentam marcador NK1.1+ com receptor α β+, na fase aguda (30 dias) da infecção.....</i>	66
4.3.3	<i>Análise de populações de células B do baço que apresentam marcador CD1+ sobre células IgM positivas, na infecção aguda.....</i>	69
4.3.3.1	<i>Ilustração gráfica referente aos marcadores CD1+ e IgM+ na fase aguda.....</i>	69

4.4	<i>Celularidade do baço na fase crônica inicial de animais μMTI reconstituídos com células B.....</i>	72
4.4.1	<i>Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase crônica inicial de infecção por <i>T. cruzi</i>.....</i>	72
4.5	<i>Análise dos marcadores de superfície celular dos linfócitos do baço de animais na fase crônica inicial (60 dias) da infecção.....</i>	73
4.5.1	<i>Alterações quantitativas das populações de células T de baço em fase crônica inicial, e que não apresentam o marcador CD45RB.....</i>	73
4.5.2	<i>Alteração das proporções de células NK1.1+ $\alpha\beta$ positivas: diminuição de NK1.1+ no baço de animais μMT, na fase crônica inicial.....</i>	75
4.5.3	<i>Quantificação das populações de células B do baço que apresentam marcador IgM+ e CD1+, aos 60 dias da infecção.....</i>	76
4.6	<i>Análise de marcadores de superfície celular presentes nas células mononucleares do músculo esquelético de animais na fase crônica inicial da infecção.....</i>	77
4.6.1	<i>Alterações quantitativas das populações de células T encontradas no músculo esquelético que não apresentam o marcador de memória imunológica CD45RB.....</i>	77
4.6.2	<i>Análise das populações de células NK1.1 positivas presentes no músculo esquelético, durante a fase crônica inicial da infecção por <i>T. cruzi</i>.....</i>	78
4.6.2.1	<i>Gráfico de NK1.1+ sobre as células T CD4+ e $\alpha\beta$.....</i>	79
4.7	<i>Número total de células do baço dos animais crônicos: tratados (ou não) com anti NK1.1+.....</i>	81

4.8	<i>Efeito da depleção de células NK1.1+ quanto aos marcadores de superfície celular nos linfócitos do baço, durante a fase crônica inicial (70 dias).....</i>	82
4.8.1	<i>Alterações quantitativas das populações de esplenócitos que apresenta baixa ou ausência da expressão de CD45RB, na fase crônica inicial.....</i>	82
4.8.2	<i>Alterações na quantidade de esplenócitos que apresentam marcadores CD4+ NK1.1+ e/ou receptor $\alpha\beta$+ NK1.1+ após tratamento com anti NK1.1.....</i>	83
4.9	<i>Análise dos marcadores de superfície celular de linfócitos T do infiltrado inflamatório do músculo esquelético de animais tratados ou não com anti NK1.1, durante a fase crônica inicial... </i>	84
4.9.1	<i>Alterações quantitativas das populações de células T CD4+ e CD8+ encontradas no músculo esquelético e que apresentam baixa ou ausência da expressão do marcador CD45RB.....</i>	84
4.9.1.1	<i>Representações gráficas de linfócitos T do músculo esquelético com CD45RB^{baixo/neg} na fase crônica inicial.....</i>	85
4.9.2	<i>Análise das populações de células do infiltrado: células NK1.1+ no músculo esquelético de animais tratados ou não com anti NK1.1, durante a fase crônica inicial da infecção por T. cruzi.....</i>	88
4.10	<i>Avaliação da resposta inflamatória no músculo em animais tratados com anti-NK1.1+ durante a fase crônica inicial: histopatologia.....</i>	89
4.10.1	<i>Alterações de aspectos microscópicos do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular de animais μMT infectados e tratados ou não com anti-NK1.1+.....</i>	89

4.11	<i>Dosagem da produção de TNF-α no baço (ELISA) e detecção da expressão desta citocina no tecido muscular esquelético (Imunohistoquímica).....</i>	91
4.11.1	<i>Secreção de TNF-α in vitro em células de baço de animais μMT infectados.....</i>	91
4.11.2	<i>Análise imunohistoquímica para TNF-α nos cortes histológicos do músculo esquelético dos diferentes grupos experimentais.....</i>	92
5	DISCUSSÃO.....	94
6	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Anti-	Anticorpo
BSA	Soro Albumina Bovino
CD4+ ou CD8+	Moléculas de superfície de subpopulações de células T.
CD45RB ^{neg}	Marcador que caracteriza células T efectoras/memória.
DAB	Diaminobenzidina
HBSS	Solução Tampão Rica em Sais
H.E.	Hematoxilina e Eosina
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina – 2
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-10 KO	Inativação gênica para produção de IL-10.
iNOS	enzima óxido nítrico sintetase induzível.
LPS	Lipopolissacarideo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Natural Killer ou célula NK
NK1.1	Marcador NK1.1 sobre células T e NK
nm	nanômetro

NO	Óxido Nítrico
OPD	orto-fenil-diamina
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pg/mL	Picogramas por mililitro
RPMI	Meio de cultura celular
SFB	Soro Bovino Fetal
TBS	Solução Tampão com Tris
TCR	Receptor de linfócitos T
T. cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	Fator de Transformação e Crescimento Tumoral
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th1 ou Th2	Padrão de linfócitos T auxiliar (1 ou 2).
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa.
$\alpha\beta+$	TCR formado pelas cadeias α e β
$\gamma\delta+$	TCR formado pelas cadeias γ e δ .
μ MT C57Bl/6	animais C57Bl/6 desprovidos de linfócitos B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do protocolo experimental para análise dos dados obtidos do Citômetro de fluxo.....	53
Figura 2	Números de parasitos circulantes.....	59
Figura 3	Taxa de mortalidade cumulativa.....	60
Figura 4	Número total das populações de células esplênicas durante aos 30 dias de infecção.....	61
Figura 5	Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) esplênicas, que apresentam expressão negativa do marcador CD45RB, na fase aguda.....	62
Figura 5.1	Citometria de fluxo de linfócitos do baço de diferentes grupos experimentais, indicando células marcadas por anti-CD4+ e anti-CD45RB na infecção aguda.....	64
Figura 5.2	Citometria de Fluxo sobre linfócitos esplênicos de grupos experimentais, mostrando o marcador CD45RB sobre células T CD8+, na fase aguda.....	65
Figura 6	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> de animais μ MT infectados, com imunoglobulina ou transferência adotiva de células B, durante a fase aguda.....	67
Figura 6.1	<i>Análise dos esplenócitos por citometria de fluxo, evidenciando o marcador NK1.1+ e receptor $\alpha\beta$+ de linfócitos T, durante a infecção aguda.....</i>	68

Figura 7	<i>Análise de populações de células B esplênicas, que apresentam o marcador CD1+ sobre células IgM positivas, na fase aguda.....</i>	69
Figura 7.1	<i>Análise dos marcadores CD1+ e IgM+ sobre esplenócitos por citometria de fluxo, em infecção aguda.....</i>	71
Figura 8	<i>Número total das populações de células esplênicas, na fase crônica inicial.....</i>	73
Figura 9	<i>Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) esplênicas, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, na fase crônica.....</i>	74
Figura 10	<i>Freqüência de células NK1.1+ em células T ($\alpha\beta$+) após transferência adotiva de células B em animais μMT, durante a infecção crônica.....</i>	75
Figura 11	<i>Análise de populações de células B esplênicas, que apresentam o marcador CD1+ sobre células IgM+, na fase crônica.....</i>	76
Figura 12	<i>Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) no músculo esquelético, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, na fase crônica.....</i>	78
Figura 13	<i>Análise de populações de células T CD4+ (A) e $\alpha\beta$+ (B), que apresentam o marcador NK1.1+, no músculo esquelético (60 dias)</i>	79
Figura 13.1	<i>Análise de células do infiltrado inflamatório do músculo esquelético que apresentam marcadores CD4+NK1.1+ e $\alpha\beta$+NK1.1+, aos 60 dias de infecção.....</i>	80

Figura 14	<i>Número total das populações de células esplênicas, após o tratamento com anti-NK1.1, na fase crônica de infecção.....</i>	81
Figura 15	<i>Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) esplênicas, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, após o tratamento com anti-NK1.1+, na infecção crônica inicial.....</i>	82
Figura 16	<i>Efeito do tratamento in vivo com anti NK1.1+ em animais μMT e C57Bl/6 infectados.....</i>	83
Figura 17	<i>Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) presentes no infiltrado inflamatório do músculo esquelético e que apresentam o marcador CD45RB^{baixo/neg}, durante a fase crônica inicial.....</i>	84
Figura 17.1	<i>Análise por Citometria de fluxo de células do infiltrado inflamatório presente no músculo esquelético de animais na fase crônica de infecção.....</i>	86
Figura 17.2	<i>Citometria de fluxo das células do infiltrado inflamatório do músculo esquelético de camundongos C57Bl/6 e μMT infectados tratados ou não com anti-NK1.1+.....</i>	87
Figura 18	<i>Populações de células T CD4+ (A) e $\alpha\beta$+ (B), que apresentam o marcador NK1.1+. presentes no músculo esquelético na fase crônica de infecção.....</i>	88
Figura 19	<i>Fotomicrografia de cortes histopatológicos do tecido cardíaco (A) e muscular esquelético (B a D) de camundongos C57Bl/6 e μMT durante a fase crônica inicial de infecção por T. cruzi, corados com H.E.....</i>	90

Figura 20	<i>Secreção de TNF-α por esplenócitos de animais infectados ou não.....</i>	91
Figura 21	<i>Fotomicrografia de imunomarcção em TNF-α em cortes histopatológicos do tecido muscular esquelético de camundongos C57Bl/6 e μMT durante a fase crônica inicial de infecção por <i>T. cruzi</i>.....</i>	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Varição na concentração de diferentes subclasses de imunoglobulina no soro de camundongos normais. Obtido de MALE e colaboradores, 1987.....	47
-----------	--	----

RESUMO

ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS T NK1.1+ NO MÚSCULO ESTRIADO, DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* EM ANIMAIS DESPROVIDOS DE LINFÓCITOS B FUNCIONAIS. JORGE SADAQ NIHEI. Foi anteriormente demonstrado que as células NK (Natural Killer) estão relacionadas às bases para resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi*, pois a depleção de células positivas para NK1.1+ resulta em alta parasitemia de camundongos C57Bl/6 infectados pelo *T. cruzi*. Estudos de nossa equipe indicaram ainda que as células T NK1.1+ poderiam induzir a formação de células T efetoras/memória, e que a resistência à infecção foi correlacionada com a quantidade de células T CD4+ CD45RB^{neg} presentes antes da infecção. No presente estudo avaliamos a função regulatória de células T NK1.1+ durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, na ausência de linfócitos B. Utilizamos os seguintes animais: C57Bl/6 controles, μ MT C57Bl/6, μ MT reconstituídos (com células B de C57Bl/6 ou B de C57Bl/6 IL-10KO) ou tratados com imunoglobulinas. Neste modelo experimental, observamos que os animais μ MT apresentaram menores números de células T efetoras/memória no baço comparados aos controles (C57Bl/6), na fase aguda de infecção. A reconstituição com células B ou o tratamento com Ig em animais μ MT infectados resultou em aumento de células T efetoras/memória, comparado ao controle (μ MT infectado). Da mesma maneira e até fase crônica de infecção, a transferência adotiva de células B em animais μ MT causa persistência de células T efetoras/memória no baço. Como a molécula de CD1 (encontrada sobre células B e dendríticas) é reconhecida por células NK1.1, a expressão desta molécula foi também avaliada durante a infecção. Após a infecção, houve diminuição de células CD1+ no baço de animais C57Bl/6, e ausência destas células nos μ MT. A recuperação desta população celular no baço de μ MT infectados após reconstituição com linfócitos B foi concomitante à reposição de células T CD4+ NK1.1 no músculo esquelético destes mesmos animais. Houve ainda aumento de CD4+ NK1.1 também no músculo esquelético dos animais μ MT reconstituídos com linfócitos B provenientes de C57Bl/6 IL-10KO. De modo interessante, a depleção de NK1.1 durante a fase crônica, causou aumento de células T efetoras/memória encontradas no músculo esquelético de animais μ MT. Esses resultados estão relacionados aos dados de histopatologia, onde foi evidenciado maior infiltrado inflamatório no tecido muscular de animais μ MT tratados com anti-NK1.1, durante a fase crônica da infecção. Nossos resultados indicam desse modo que a presença da célula B estaria ligada à formação de células T CD45RB^{neg} na fase aguda e manutenção/aumento de memória imune na fase crônica de infecção, conferindo ao grupo de animais reconstituídos com células B, maior sobrevivência. Sugere-se, portanto que as células T CD4+ NK1.1+ poderiam ser regulatórias no sentido de apresentar atividade anti-inflamatória e que as células $\alpha\beta$ +NK1.1+ exerceriam função auxiliar na geração de células T efetoras/memória em nosso sistema experimental.

Suporte Financeiro: FAPESP, FAPESB e CNPq.

Palavras chave: Célula T NK1.1+, Transferência de linfócitos B, Célula T efetora/memória, *Trypanosoma cruzi*, Imunorregulação.

ABSTRACT

EVALUATION OF NK1.1+ T CELLS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN SKELETAL MUSCLE OF μ MT MICE, DURING EXPERIMENTAL INFECTION BY *Trypanosoma cruzi*. **JORGE SADA O NIHEI**. We have previously demonstrated that NK (Natural Killer) cells have been related to resistance to *T. cruzi* infection and the depletion of NK1.1+ cells resulted in high mortality and increased parasitemia in C57Bl/6 infected mice. Recently, we suggested that the NK1.1 T cells were involved on memory T cell generation, and resistance to infection was correlated with increased numbers of CD4^{positive} CD45RB^{negative} T cells, present before infection. In this study we evaluated the regulatory function of NK1.1+ T cells during *T. cruzi* infection in μ MT C57Bl/6 infected mice. The following mice were used: C57Bl/6, μ MT C57Bl/6 and μ MT C57Bl/6 Immunoglobulin (Ig)-treated or adoptively transferred with B cells (obtained from C57Bl/6 or from C57Bl/6 IL-10KO). In this experimental model, μ MT infected mice have show decreased numbers of effector memory T cells, compared to C57Bl/6 infected controls, during acute infection. The adoptive transfer of B cells or the treatment with immunoglobulins (Igs), induced increased numbers of effector memory splenic T cells, compared to C57Bl/6 controls. Furthermore, Ig administration to μ MT uninfected mice is able to increase $\alpha\beta$ +NK1.1+ splenic cell population. As NK1.1 cells recognize CD1 molecule which is expressed on B and dendritic cells, CD1 expression was evaluated in spleens of μ MT and C57Bl/6 mice to estimate whether the expression of CD1 was modified after infection. When compared to uninfected controls, CD1-presenting cells decreased from both μ MT and C57Bl/6 mice and were increased following B cell-transfer to μ MT recipient mice. Interestingly, the depletion of NK1.1 cells also increased effector memory T cells found on skeletal muscles infiltrates from μ MT, and this was correlated to the increased inflammatory response found in these μ MT NK1.1-depleted mice, during the chronic phase of infection. In this inflammatory compartment, μ MT infected mice presented low numbers of CD4+NK1.1 T cells, when compared to C57Bl/6. Previous observations from our laboratory suggest that CD4+NK1.1+ T cells (which are decreased in skeletal muscle from infected μ MT mice), may be related to the enhanced inflammatory response during the early chronic infection. Finally, these studies suggest that CD4+NK1.1+ T cells may be regulatory with an anti-inflammatory activity and that $\alpha\beta$ +NK1.1+ T cells may be involved on effector memory T cell-generation in our experimental system.

Financial support: FAPESP, FAPESB, CNPq fellowship

Key Words: NK1.1+ T cells, B Cell Transfer, effector memory T cell, *Trypanosoma cruzi*, Immunoregulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Doença de Chagas

Carlos Chagas, em fevereiro de 1909, publicou o primeiro de uma série de artigos sobre o que mais tarde veio a ser chamado de doença de Chagas ou tripanossomíase americana, após um trabalho realizado em Lassance, interior de Minas Gerais, de 1907 a 1908 (CHAGAS, 1909). A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Essa doença se tornou de grande interesse dos domínios de saúde pública devido ao crescente número de casos registrados e das possíveis infecções nas áreas endêmicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, ela afeta entre 16 e 18 milhões de pessoas na América do Sul. Apesar das tentativas dos programas de controle, considera-se que 25% da população latino-americana está sob risco de infecção (WHO, 1991).

Através das observações, Carlos Chagas descreveu o agente etiológico *Trypanosoma cruzi* e também o inseto vetor dessa infecção que transmite o parasita aos homens. Em relação à Taxonomia, esse parasito é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

Morfologicamente apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigotas) e aflageladas (amastigotas) (BRENER, 1973 e 1971). Seu ciclo biológico inclui a passagem por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hemípteros que são hematófagos e comumente são chamados de “barbeiros”, que podem ser dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pertencentes à família Triatomidae. Essa família compreende cerca de 128 espécies classificadas em 17 gêneros em 5 tribos (SCHOFIELD *et al.*, 1999).

A principal via de transmissão para o hospedeiro mamífero é através de fezes e urina dos triatomíneos infectados (WHO, 1991 e 1995). Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasito se encontra na forma tripomastigota metacíclico. Essa forma infectiva invade células nucleadas teciduais principalmente macrófagos e células musculares e se transforma na forma amastigota replicativa. Após um período de

divisão binária ocorre maturação para se transformarem em tripomastigotas (BRENER, 1973). A célula eventualmente é rompida e ocorre liberação de formas tripomastigotas ou sangüícolas que irão circular livremente na corrente sangüínea para infectar outros tecidos e órgãos do vertebrado ou serem ingeridos pelo inseto vetor para continuar o ciclo. Nos barbeiros, transformam-se na forma epimastigota e multiplicam-se no tubo digestivo para sofrerem maturação novamente na forma infectiva tripomastigota que é eliminada com suas fezes e urina (BOGDAN *et al.*, 1999).

Além da via de transmissão vetorial que representa 80 a 90% das transmissões, outras vias de transmissão apresentam importância epidemiológica, como as vias de transmissão transfusional (5 a 20%) (NUSSENZWEIG *et al.*, 1953) e a via congênita (0,5 a 8%) (APT *et al.*, 1968; BITTENCOURT, 1976), havendo também a possibilidade de infecção por amamentação (MILES, 1972), via oral em modelos experimentais (CAMANDARоба *et al.*, 2002) e por acidentes laboratoriais em indivíduos que manipulam materiais infectados (DIAZ *et al.*, 1979).

1.2 Fases e observações sobre a Doença de Chagas.

Segundo observações de Chagas em 1936, sobre o homem e os animais de laboratório, o parasito pode incubar de 4 a pouco mais de 10 dias até que se replique dentro do hospedeiro vertebrado. O período inicial da infecção é chamado fase aguda que é seguida por uma forma crônica indeterminada, definida por vários anos de curso assintomático na grande maioria dos pacientes, havendo, no entanto, uma pequena proporção que desenvolve a forma crônica ativa sendo manifestada no sistema digestivo e no miocárdio (ANDRADE *et al.*, 1979).

Em 1916 CHAGAS, através de estudos epidemiológicos, pôde sugerir que na grande maioria dos casos o período inicial da infecção não era identificado de maneira adequada para o tratamento, às vezes até por não apresentar sintomas de uma infecção aguda clássica. Desta maneira, observou-se uma elevada prevalência de casos crônicos e pequena incidência de casos agudos. Na fase aguda da infecção em seres humanos, podem ser encontradas formas tripomastigotas no sangue periférico destes pacientes. No entanto, nas semanas subseqüentes a esse

período, o número de parasitas circulantes decresce gradualmente (CHAGAS, 1916).

Adicionalmente, podemos dizer que a infecção pelo *T. cruzi* apresenta duas fases bem distintas: a fase aguda ou inicial que pode se apresentar na forma assintomática ou oligossintomática, sendo a maioria dos casos, na forma sintomática com sintomas de febre, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, conjuntiva unilateral (Chagoma de inoculação), miocardite e/ou meningoencefalite. É possível detectar o parasito no individuo através do exame direto do sangue. Cerca de dois meses após o inicio da fase aguda, o *T. cruzi* desaparece da corrente sangüínea, podendo ser detectado somente por métodos como PCR ou hemocultura. Após um período de latência de 10 a 15 anos, chamado de forma indeterminada, os pacientes podem evoluir para três tipos principais de doença: a forma cardíaca, com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita, por arritmia cardíaca; forma digestiva, com megaesôfago e megacolon; forma mista com cardiopatia e "megas" simultaneamente (KOEBERLE, 1968).

Depois de uma fase aguda, a doença evolui para uma fase crônica em que diferentes síndromes podem aparecer. Depois de vários anos, 27% dos que contraíram a infecção desenvolvem problemas cardíacos que podem levar à morte súbita, 6% desenvolvem problemas digestivos e 3% apresentam envolvimento do sistema nervoso periférico (WHO, 1991 e 1995).

As diversas manifestações clínicas observadas na doença de Chagas passam por períodos ou fases, algumas relacionadas ao hospedeiro como a resposta imune, e outras inerentes ao parasito que apresenta distintas características evidenciadas pela diversidade de cepas isoladas dos mais diferentes hospedeiros. Através do estudo de vários parâmetros biológicos e histopatológicos das cepas de *Trypanosoma cruzi* em camundongos Swiss, ANDRADE, em 1985, classificou-as em três tipos ou biodemas: tipos I, II e III, de acordo com as características histotrópicas e de parasitêmia e virulência. No modelo experimental proposto para execução deste trabalho foi utilizada a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, que foi caracterizada como sendo do tipo II (ANDRADE, S.G. comunicação pessoal). A cepa de *T. cruzi* do tipo II apresenta curso parasitêmico mais lento entre 12^o e o 20^o dia de infecção e as

lesões predominantes ocorrem no miocárdio e no músculo esquelético, onde ocorre intenso processo inflamatório (ANDRADE, *et al*, 1985).

Semelhante a outras doenças que acometem as populações no mundo, a doença de Chagas é amplamente estudada em diversos modelos experimentais. Diferentes aspectos da doença humana são reproduzidos em vários modelos, incluindo camundongos (SATO *et al.*, 1992; SANTOS-BUCH *et al.*, 1974; RAMIREZ *et al.*, 1994; FALASCA *et al.*, 1994). Além disso, muitas descobertas sobre a participação da resposta imune no controle da infecção por *Trypanosoma cruzi*, foram realizadas utilizando modelos experimentais com camundongos geneticamente deficientes na expressão de subpopulações linfocitárias, bem como de animais deficientes na produção de certas citocinas, expressão de genes relevantes na ontogenia de células ou moléculas relevantes na resposta imune (DOS REIS *et al.*, 1979).

1.3 Resposta Inata

As moléculas e células efetoras que compõem a imunidade inata apresentam importantes funções na resposta do hospedeiro à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Semelhante a outros organismos patogênicos, o *T. cruzi* é capaz de ativar proteínas e enzimas efetoras do sistema complemento. Entretanto, pesquisadores demonstraram que somente as formas não infectivas (epimastigotas) do parasito são destruídas e as formas infectivas (tripomastigotas) são resistentes à ação lítica do complemento (NOGUEIRA *et al.*, 1975).

Por outro lado, o parasito pode ser fagocitado por células apresentadoras de antígenos profissionais, principalmente macrófagos ou invadir essas mesmas células. Esse processo inicia uma série de interações moleculares que mobilizam os mecanismos celulares da resposta imune inata do hospedeiro (ALIBERTI *et al.*, 1996).

Inicialmente, os macrófagos infectados pela forma tripomastigota do *T. cruzi* são induzidos a produzir e secretar a citocina IL-12. Esta citocina foi correlacionada com o controle da replicação do parasito, através da evidência de secreção de IFN- γ após adição de sobrenadante de cultura de macrófagos obtidos de animais

infectados, na cultura de esplenócitos de animais não infectados (CARDILLO *et al.*, 1996; ALIBERTI *et al.*, 1996). A IL-12 produzida pelos macrófagos foi descrita como um potente indutor na produção de IFN- γ pelas células NK e por outras subpopulações de células T (GATELY, 1994). Quando camundongos infectados são tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-12, ocorre aumento da parasitemia e da mortalidade neste grupo, quando comparado ao grupo controle. Em outro enfoque experimental, o tratamento, dos camundongos infectados por *T. cruzi* da linhagem BALB/c com a citocina recombinante IL-12, resultou na redução da parasitemia e um significativo aumento da sobrevivência quando comparado aos animais não tratados. As evidências mostraram que este efeito protetor poderia ser correlacionado com altos níveis de IFN- γ e TNF- α no soro destes animais. Juntos, esses dados reforçam a idéia de que a citocina IL-12 exerce um efeito protetor na regulação da parasitemia, sendo que este efeito envolve principalmente a produção de IFN- γ e TNF- α (HUNTER, 1996).

O IFN- γ é secretado principalmente por células presentes em uma resposta imune de padrão Th1 e tem sido correlacionado a resistência à infecção por diferentes patógenos como a *Leishmania* (SCOTT, 1989), o *Toxoplasma* (GAZZINELLI *et al.*, 1992c) e o *Schistosoma* (PEARCE *et al.*, 1991). Adicionalmente, o perfil de liberação de citocinas durante a infecção por *T. cruzi* ainda não está totalmente entendido. O interferon- γ tem a capacidade de ativar macrófagos e inibir a replicação intracelular do parasito através do aumento da produção de componentes oxidativos (GAZZINELLI *et al.*, 1992a).

Um dos principais mecanismos que os macrófagos utilizam para eliminar patógenos intracelulares é a produção de óxido nítrico induzida por IFN- γ e TNF- α . O óxido nítrico é um importante fator citotóxico e citostático na resposta imune mediada por células a muitos patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania major* (GREEN *et al.*, 1990), *Mycobacterium bovis* (FLESCHE *et al.*, 1991), *Toxoplasma gondii* (ADAMS *et al.*, 1990), e *Trypanosoma cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992b). Além do óxido nítrico, outros fatores foram previamente citados como fundamentais para ativar a função microbicida de macrófagos. A ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago também causa a liberação de peróxido de hidrogênio, que está envolvido na morte do *T. cruzi* (NATHAN *et al.*, 1979).

O tratamento dos camundongos C57Bl/6 com inibidores de iNOS resulta em maior suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1995). A infecção por *T. cruzi* de camundongos C57Bl/6 selvagens e iNOS^{-/-}, demonstrou que os animais iNOS^{-/-} poderiam compensar a ausência de produção de NO através do aumento qualitativo e quantitativo de outras citocinas importantes no controle imune da infecção. Esse dado mostra que a produção de NO é importante, mas não é essencial para o controle da infecção. (TARLETON *et al.*, 2004).

Pela sua capacidade de ativar mecanismos microbicidas, o IFN- γ tem sido amplamente estudado. Desse modo, CARDILLO e colaboradores, mostraram em 1996, através de experimentos *ex vivo* que no sobrenadante de esplenócitos de camundongos eutímicos ou atímicos cultivados com tripomastigotas vivos (e não mortos por irradiação ultravioleta ou aquecimento), houve indução da produção de IFN- γ por células NK. Mais além, o tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ causou exacerbação da parasitemia somente se administrado antes ou logo depois da infecção. Em outro experimento, animais depletados da população de células NK apresentaram alta parasitemia, mostrando a importância das células NK que fazem parte do sistema imune inato. Desse modo, os dados revelam que o IFN- γ produzido principalmente por células NK do sistema imune inato é importante no controle da replicação do parasito no início da infecção (CARDILLO *et al.*, 1996). Adicionalmente, foi demonstrado por TARLETON e colaboradores (1991) que os níveis séricos de IFN- γ decaem gradualmente com o fim da fase aguda da infecção.

As células NK determinantes na resistência a infecção pelo *T. cruzi* possuem um marcador NK1.1+, que é expresso em diferentes tipos de células linfóides, incluindo células CD3⁻ (KOO *et al.*, 1984; BALLAS *et al.*, 1990) e certas subpopulações de células T, como as duplo negativas ou células T CD4⁺ $\alpha\beta$ ⁺ (LEVITSKY *et al.*, 1991), e células T $\gamma\delta$ ⁺ (AZUARA *et al.*, 1997; AZUARA *et al.*, 1998). Tem sido demonstrado que as células T, com marcador NK1.1, também participam na modulação da resistência do hospedeiro à infecção intracelular (EMOTO *et al.*, 1999).

1.4 Mecanismos efetores e citocinas produzidas durante a infecção por *Trypanosoma Cruzi*.

Após a estimulação por células apresentadoras de antígenos, as células T CD4⁺ podem se diferenciar em células efetoras do padrão Th1 ou Th2. O padrão de uma resposta imune é intimamente regulado por citocinas presentes durante a fase inicial de ativação da célula T. As citocinas IFN- γ e IL-12 orientam o desenvolvimento celular para o padrão Th1 e inibem o padrão Th2. Enquanto que a citocina IL-4 dirige para o padrão Th2 e inibe a diferenciação Th1. Esses padrões podem ser observados de modo exclusivo *in vitro* (revisto em PAUL, 1989). *In vivo* ambos os padrões podem coexistir, embora um dos padrões de resposta seja dominante sobre o outro, sugerindo uma regulação mais complexa. (KAPLAN *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 1997; WURTZ *et al.*, 2004.).

Uma função importante da citocina IL-10 em controlar a imunidade mediada por células foi revelada através de estudos demonstrando a correlação entre maior suscetibilidade de linhagens murinas a infecção e uma maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (REED *et al.*, 1994; MINOPRIO *et al.*, 1993). Em outro estudo, utilizando a infecção de camundongos C57BL/6 IL-10 (IL-10 $-/-$) com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, foi mostrado que esses animais controlam a parasitemia quando comparados ao C57BL/6 selvagem. No entanto, esses animais apresentam morte precoce devido aos efeitos tóxicos causados pelo excesso de produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ (HUNTER *et al.*, 1997). Adicionalmente, o tratamento desses animais com IL-10 recombinante reverte à mortalidade precoce. Outro dado importante é que o com tratamento desses animais com anticorpos monoclonais anti-CD4⁺, resulta na diminuição dos níveis de IFN- γ mesmo na ausência de IL-10, mostrando que as células T CD4⁺ também estariam envolvidas na produção de IFN- γ (HUNTER *et al.*, 1997). Cardillo e colaboradores em 1996, ao tratarem os camundongos com anticorpos monoclonais para IFN- γ ou NK1.1⁺, observaram aumento da suscetibilidade à infecção bem como a elevação na produção de IL-10. Esses dados sugerem que as células T que estariam produzindo o IFN- γ seriam as T NK1.1⁺, nesse modelo experimental.

Além da IL-10, o TGF- β é outra citocina com propriedades supressoras que pode regular a resposta inicial a infecção (SILVA *et al.*, 1991). A IL-10 e TGF- β também podem inibir atividades macrófágicas, incluindo a síntese de óxido nítrico (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Assim, a IL-10 e o TGF- β têm sido associados à regulação negativa da síntese e/ou dos efeitos mediados por IL-12 e a síntese de IFN- γ (HUNTER *et al.*, 1995; TRIPP *et al.*, 1993). De outra maneira, a IL-1 β e TNF- α potenciam a produção de IL-12. O tratamento de animais com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ é mais prejudicial do que tratamento com anti-IL-12 sobre os níveis de parasitemia e mortalidade de camundongos infectados (SILVA *et al.*, 1998). Portanto, é possível que durante a infecção o parasito possa ativar duas vias para síntese de IFN- γ , uma via dependente e outra independente de IL-12 (revisto em SILVA *et al.*, 1998). Provavelmente, a via independente de IL-12 de produção de IFN- γ por células T seja mediada pela citocina IL-18, como discutido em outro sistema experimental (MÜLLER *et al.*, 2001).

O TNF tem sido associado com a atividade microbicida dos macrófagos, embora a função desta citocina na infecção por *T. cruzi* ainda seja controversa. Quanto à habilidade do TNF- α em induzir a atividade contra o *T. cruzi*, sugerida por DE TITTO e colaboradores (1986), muitos pesquisadores não conseguiram confirmar esses dados (WIRTH *et al.*, 1988). O tratamento de camundongos C57BL/6 com anticorpo monoclonal anti-TNF- α ou anti-IFN- γ causa aumento nos níveis de parasitos na corrente sanguínea e da mortalidade. Adicionalmente, foi constatado que os níveis séricos de NO nos animais tratados com anti-TNF- α ou anti-IFN- γ foi abaixo do controle não tratado. Estudos *in vitro* mostraram que os esplenócitos de animais infectados e não tratados quando colocados em cultura com anti-TNF- α ou anti-IFN- γ por 48 horas, apresentaram um declínio na produção de NO, sugerindo que estas citocinas estão envolvidas na modulação da produção de NO tanto *in vitro* como *in vivo* (SILVA *et al.*, 1995).

Em outros modelos experimentais, o tratamento com anti-TNF- α resultou na diminuição da atividade microbicida dos macrófagos em animais infectados por *L. major* (GREEN *et al.*, 1990) e *T. gondii* (LANGERMANS *et al.*, 1992). Entretanto, a administração de TNF- α recombinante aos camundongos infectados com *T. cruzi*

resultou em um aumento nas taxas de mortalidade. O aumento da mortalidade ocorre, provavelmente, devido ao aumento da resposta pró-inflamatória nos tecidos (BLACK *et al.*, 1989). Esses dados sugerem que o TNF- α é uma citocina importante na determinação do infiltrado inflamatório e estaria agindo sobre as células mononucleares do infiltrado, no sentido de amplificar a migração celular para o local e a ativação celular.

Dessa forma, infere-se que após os macrófagos serem infectados e ativados por IFN- γ , produzem TNF- α que age de modo autócrino e sinérgico ao IFN- γ no sentido de amplificar a produção de NO para eliminar o patógeno (SILVA *et al.*, 1995).

1.5 A Importância de linfócitos T efetores durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Experimentos *in vivo* (ROBERSON *et al.*, 1973; KIERSZEMBAUM *et al.*, 1974) e *in vitro* (HOFF, 1975; NOGUEIRA *et al.*, 1977; NOGUEIRA E COHN, 1978) têm indicado o envolvimento de mecanismos efetores mediados por células na resistência à infecção (NOGUEIRA *et al.*, 1981). O tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-L3T4+ (CD4+) e sua concomitante imunização com antígenos de *T. cruzi* revelaram redução nos níveis de anticorpos contra os antígenos de *T. cruzi* e na resposta imune mediada por células, quando comparados aos controles não tratados, mostrando que os linfócitos T CD4+ são essenciais para o desenvolvimento da resistência ao parasito (ARAUJO *et al.*, 1989; RUSSO *et al.*, 1988; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 1992).

Em determinadas condições experimentais, a depleção de células T CD8+ dos camundongos C57BL/6 (resistentes) e C3H/HeSnJ (suscetíveis), e sua posterior infecção com a cepa Brazil de *T. cruzi*, mostrou que camundongos resistentes e suscetíveis para esta cepa, desenvolveram altos níveis de parasitemia e mortalidade precoce na fase aguda da infecção, quando comparados aos animais não depletados de CD8+. Desse modo, foi sugerida a hipótese de que as células T CD8+ também seriam fundamentais, durante a imunidade ao *T. cruzi*, na fase aguda de infecção (TARLETON, 1990).

Em outro trabalho, TARLETON e colaboradores (1992), demonstraram que a infecção por *T. cruzi* de camundongos $\beta_2m^{-/-}$, ou seja, deficientes para CD8+, resulta em alta parasitemia e morte precoce. Adicionalmente, esses animais $\beta_2m^{-/-}$ apresentaram baixo infiltrado inflamatório quando comparado ao β_2m^{+} . Sugere-se assim que as células T CD8+ também estariam relacionadas ao recrutamento de células inflamatórias e de produção de citocinas.

Quanto à função citolítica das células T CD8+, a utilização de camundongos geneticamente modificados para não produzirem granzima/perforina, sugere que o controle da infecção por esta população celular não é dependente da via citolítica granzima/perforina. A infecção de camundongos deficientes em células T CD8+ causa aumento da suscetibilidade, enquanto que a infecção de camundongos deficientes em perforina ou granzima B resulta em pouca alteração na suscetibilidade destes animais quando comparados aos controles (TARLETON *et al.*, 1998).

Desse modo, as células T CD8+, mais do que eliminar células infectadas com patógenos intracelulares via perforina/granzima B, utilizam outros mecanismos citolíticos, como a via Fas/FasL, via citocinas que agem sobre macrófagos e outras células (BERKE, 1995; KAGI *et al.*, 1996; SAD *et al.*, 1996). A função das células CD8+ na resistência a infecção tem sido amplamente estudada, de modo, sabe-se que estas células estão presentes nos infiltrados inflamatórios de tecidos parasitados (SATO *et al.*, 1992) bem como células T CD4+ (RUSSO *et al.*, 1988; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 1992). Outro dado importante, é que a depleção de células T CD4+ e CD8+ de camundongos infectados causou aumento quantitativo de células mononucleares no infiltrado inflamatório em associação com o aumento no número de parasitas no tecido (TARLETON *et al.*, 1994).

A maior suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* na ausência de células T também foi observada em modelos experimentais utilizando camundongos nu/nu (KIERSZEMBAUM *et al.*, 1979), timentomia neonatal (SCHUMUNIS *et al.*, 1971) ou tratados com ciclosporina A (McCABE *et al.*, 1985). A ausência de células T com moléculas de superfície CD4+ e/ou CD8+ causa alterações quantitativas e

qualitativas na resposta imune contra o *T. cruzi*, envolvendo o padrão de citocinas, isotipo e especificidade de imunoglobulinas, e que resultam no aumento da susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi* (ROTTENBERG *et al.*, 1993). Outros fatores como a carga genética do hospedeiro e do parasito, o tamanho do inóculo e a qualidade do sistema imune do hospedeiro também influenciam o curso da infecção (ROTTENBERG *et al.*, 1995).

Camundongos geneticamente modificados para não expressar linfócitos CD4+ ou CD8+, quando infectados mostraram-se mais suscetíveis. Nesse mesmo estudo, foi verificado que as células do baço e linfonodo de camundongos deficientes em CD8+ apresentaram altos níveis de mRNA de IL-4. Portanto, o aumento da suscetibilidade ao *T. cruzi*, devido a ausência de células T CD8+, foi associado ao aumento da interleucina 4 (ROTTENBERG *et al.*, 1993) que poderia regular de modo negativo os mecanismos microbicidas do macrófago (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Adicionalmente, o tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-IL-4, durante a infecção com *T. cruzi*, revelou baixa parasitemia (PETRAY *et al.*, 1993), mostrando desse modo, que a IL-4 poderia regular direta ou indiretamente a resposta imune durante a fase aguda da infecção..

As células T "naive" uma vez ativadas irão produzir citocinas como a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ (MOSMANN *et al.*, 1986). A capacidade em secretar citocinas do padrão Th2 em relação ao padrão Th1 está intimamente ligada à presença de níveis suficientes de IL-4 no início da resposta imune, tanto *in vivo* como *in vitro* (LÊ GROS *et al.*, 1990; SWAIM *et al.*, 1990). Então, provavelmente, uma resposta imune gerada na ausência de IL-4, irá se desenvolver com o padrão de citocinas do tipo Th1. Mais tarde demonstrado que as células T NK podem ser as principais células produtoras de IL-4, auxiliando a diferenciação em Th2 (BENDELAC *et al.*, 1997).

1.6 As células T NK e a molécula de CD1

As células T NK são uma subpopulação de células distintas dos linfócitos T convencionais. As células T NK expressam receptores de dois tipos de células, o receptor de células T (TCR) e o receptor NK (GODFREY *et al.*, 2000). Foi identificado o marcador CD161+, um marcador de superfície normalmente observado em células NK e corresponde ao marcador NK1.1.+ (JOYCE *et al.*, 1996).

Além disso, apresentam o TCR com uma cadeia α invariável, em camundongos ($V\alpha 14-J\alpha 281$) e em humanos ($V\alpha 24-J\alpha 18$), pareados com número limitado de cadeia β de TCR, em camundongos ($V\beta 8.2$) e em humanos ($V\beta 11$), principalmente (GODFREY *et al.*, 2000).

Em contraste com as células T convencionais, as células T NK são estimuladas por glicolipídios apresentados principalmente por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal tipo I-não clássico, chamado CD1d. Essa molécula é composta pela $\beta 2$ -microglobulina e cadeia CD1d não polimórfica (GODFREY *et al.*, 2000). Por outro lado, as células T convencionais para serem ativadas necessitam do reconhecimento do peptídeo, apresentado no contexto do complexo de histocompatibilidade principal pelo receptor de célula T, concomitantemente à ligação de moléculas coestimulatórias.

As moléculas CD1 compõem uma família de proteínas de superfície celular que tem sido associada com a apresentação de antígenos para células T auxiliares, cujo isotipo CD1d, dentre os 5 isotipos existentes, foi conservado em roedores e humanos (PORCELLI, 1995). A molécula CD1d está presente principalmente na superfície de células B, dendríticas e macrófagos. Uma população celular que expressa altos níveis de CD1 são as células B esplênicas da zona marginal, uma subpopulação de células B distinta que expressa CD21 (receptor para C3d) e pode estar envolvida na resposta natural a antígenos bacterianos (ROARK *et al.*, 1998).

Estudos recentes têm sugerido o envolvimento das células T NK $CD161^+V\alpha 14-J\alpha 18$ na regulação de inúmeras condições autoimunes, infecciosas e câncer (PARK *et al.*, 2000). A descoberta de que as células T NK respondem ao agente antitumoral derivado de esponja marinha, a α -galactosilceramida (α -GalCer), tem levado muitos grupos de pesquisa a investigar as propriedades imunomodulatórias deste componente em várias condições patológicas, incluindo modelos experimentais de autoimunidade (LUC VAN KAER, *et al.*, 2005). Utilizando camundongos NOD, foi verificado que as fêmeas apresentaram exacerbação da diabetes e baixos números de células T NK restritas a CD1d, enquanto que os camundongos machos, que apresentaram baixa incidência da doença, tinham altos níveis de células T NK

(NAUMOV *et al.*, 2001). No entanto, o tratamento das fêmeas com α -GalCer, causou melhora das condições do animal, consequência do acúmulo de células T NK restritas a CD1d e células dendríticas mielóides. Estes dados sugerem que a função imunorregulatória de células T NK restritas a CD1d está intrinsicamente ligada ao recrutamento de células dendríticas de origem mielóide para o linfonodo do pâncreas e consequentemente reduzir a inflamação (NAUMOV *et al.*, 2001).

Adicionalmente, estudos de infecção de animais C57BL/6 eutímicos ou timectomizados e depletados ou não de células NK1.1+ sugerem uma importante função regulatória das células NK1.1+ nos animais eutímicos, e diferente nos timectomizados. Esta função regulatória inclui a atividade auxiliar na geração de células T com marcadores de memória/ativação (CARDILLO *et al.*, 2002). Outro dado importante publicado por CARDILLO e colaboradores, em 2002, é que camundongos selvagens submetidos à timectomia, tratados ou não com anticorpo monoclonal anti-NK1.1+, apresentaram elevados níveis de infiltrado inflamatório. Já animais eutímicos a depleção de NK1.1+ causou diminuição significativa do infiltrado inflamatório quando comparado ao controle, durante a infecção aguda. Além disso, animais eutímicos com depleção de NK1.1+ apresentaram maior parasitemia e mortalidade quando comparado ao camundongo timectomizado tratado ou não com anti-NK1.1. Neste trabalho, foi ainda demonstrado que animais depletados de células NK1.1+ produzem quantidades equivalentes de anticorpos totais anti *T. cruzi*. Porém, na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, houve uma diminuição dos níveis de IgG e acúmulo de IgM, indicando uma possível relação modulatória entre essas células. Esses dados sugerem que as células T NK1.1+ poderiam de alguma forma estar regulando a atividade inflamatória nos tecidos de animais eutímicos, e de uma maneira diferente em timectomizados, infectados por *T. cruzi* (CARDILLO *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos sugerem que a disfunção e/ou diminuição da quantidade de células T NK restritas a CD1d está claramente relacionada com o desenvolvimento da autoimunidade nos roedores e humanos (BAXTER *et al.*, 1997; IWAKOSHI *et al.*, 1999). Devido a potencial ligação entre linfócitos T NK e a autoimunidade, foi revelado que, várias linhagens de camundongos, incluindo NOD (GOMBERT *et al.*, 1996; BAXTER *et al.*, 1997), MRL-*lpr/lpr* (MIEZA *et al.*, 1996) e SJL/J (YOSHIMOTO

et al., 1995), que são geneticamente suscetíveis a autoimunidade tem reduzido número de células T NK, comparado com linhagens de camundongos que não desenvolvem autoimunidade. Deste modo, a deficiência de células T NK está associada com o aumento da suscetibilidade a autoimunidade (CARNAUD *et al.*, 2001). Adicionalmente, em alguns modelos experimentais de autoimunidade, a geração de camundongos NOD deficientes na molécula CD1d resultou na exacerbação da doença (SHI *et al.*, 2001). De outro modo, a restauração do número de células T NK por transferência adotiva (BAXTER *et al.*, 1997) ou por geração de animais transgênicos para células T NK (LEHUEN *et al.*, 1998; MARS *et al.*, 2002), resulta em melhora da doença.

As células T NK restritas a CD1d podem ser estimuladas por IL-12, produzida principalmente pelas células dendríticas. As células apresentadoras de antígenos em geral expressam CD1d e apresentam moléculas como a α -galactosilceramida e glicofosfoinositol (GPI) para as células T NK restritas a CD1d (KAWANO *et al.*, 1997; MOLANO *et al.*, 2000). Especificamente, durante a infecção aguda poderia ocorrer a ativação das células T NK V α 14-J α 281. No entanto, durante a fase crônica da infecção essas células parecem desenvolver um aumento da atividade pró-inflamatória que contribui para uma intensa inflamação crônica (DUTHIE *et al.*, 2002).

Segundo BENDELAC (1992), as células T NK1.1+ poderiam ser a principal fonte de IL-4 durante uma resposta imune. Essa citocina tem mostrado sua importância na fase crônica da infecção experimental, uma vez que em animais geneticamente modificados para não produzirem a IL-4, infectados com *T. cruzi*, há acentuado aumento na inflamação tecidual, com aumento do infiltrado inflamatório (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2001). As células T efectoras duplo negativas, CD4 e CD8, participam ativamente do processo inflamatório, infiltrando o tecido muscular esquelético na fase aguda da infecção (SUN & TARLETON, 1993; TARLETON *et al.*, 1994).

1.7 A Resposta Humoral e a importância de Linfócitos B durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Segundo MASON (1996), devido à alta expressão de moléculas CD1d em células B, sugere-se que elas possivelmente seriam as principais células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T NK1.1+. CARDILLO e colaboradores (2002) demonstraram que animais depletados de células NK1.1+ produzem quantidades equivalentes de anticorpos totais anti *T. cruzi*. Porém, na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, houve uma diminuição dos níveis de IgG e acúmulo de IgM, indicando que a ausência de células T NK acarreta diminuição da produção de anticorpos e da mudança de isotipo de imunoglobulinas.

Utilizando modelo experimental de inflamação crônica intestinal, foi constatado que as células B com alta expressão da molécula CD1d, possivelmente as células B da zona marginal dos folículos linfóides do baço, poderiam atuar como regulatórias durante a inflamação. Esse processo regulatório poderia ser atribuído à secreção de interleucina 10 por células B, pois foi verificado que a transferência de células B de animais geneticamente modificados para não produzirem a citocina IL-10 não foi capaz de controlar esse tipo de inflamação em animais duplo KO para os genes μ e TCR- α . Dessa forma, foi demonstrada a importância das células B como importante componente regulatório de processos inflamatórios (MIZOGUCHI *et al.* 2002).

Na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, a capacidade da resposta imune mediada por células não é totalmente suficiente para controlar a replicação do parasito (TRISCHMANN *et al.*, 1983). A produção de anticorpos parece ser necessária para eventual controle da replicação do parasito na corrente sanguínea (TRISCHMANN *et al.*, 1984).

Diversos estudos foram feitos quanto às diversas funções dos anticorpos anti-*T. cruzi*: lise (LAGES SILVA, 1987), opsonização (SCOTT & MOYES 1982), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (LIMA MARTINS, 1985), ativação de complemento (MOTA & UMEKITA, 1989, BRODSKYN, 1989; SPINELLA, 1992) e neutralização. Outros estudos sugerem que os anticorpos poderiam não participar no

controle inicial da proliferação dos parasitas, mas seriam eficazes na destruição dos mesmos, após a fase aguda de infecção. Esses anticorpos provavelmente seriam produzidos a partir de uma resposta imune específica de células T e seriam denominados anticorpos protetores, possuindo isotipo IgG (TAKEHARA *et al.*, 1981)

Uma das principais funções das células T CD4⁺ é ativar as células B por contato célula-célula, bem como por fatores solúveis (citocinas) fazendo com que estas se diferenciem em plasmócitos secretores de imunoglobulinas. Neste sentido, ROTTENBERG e colaboradores (1995) mostraram que, cerca de 20 dias após a infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, camundongos geneticamente deficientes para a molécula CD4⁺ apresentaram baixos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* quando comparados aos animais controles que continham células T CD4⁺.

Estudos de infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos deficientes em células B (C57BL/6 μ MT), mostraram que as parasitemias desses animais são semelhantes aos C57BL/6 selvagens. Assim, na ausência de uma resposta humoral, camundongos infectados com *T. cruzi* apresentam evidências de um controle inicial da infecção. Entretanto, os animais deficientes em células B falham em conter a replicação do parasito e morrem no início da fase crônica. A capacidade de camundongos deficientes em células B em sobreviver por um período de tempo significativo sob a infecção com uma cepa virulenta sugere que uma resposta imune mediada por anticorpos não é tão relevante em comparação à resposta mediada por células T CD4⁺ ou CD8⁺, no controle da fase aguda (TARLETON *et al.*, 1998). Entretanto, a infecção de camundongos C57BL/6 selvagens ou deficientes em células B com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, induziu aos altos níveis de parasitemia comparado aos controles selvagens. Estes dados sugerem que na fase aguda da infecção as células B possuem importância relativa na resposta imune (POSTOL *et al.*, 2001a).

Quanto ao processo inflamatório, os animais deficientes para células B apresentaram infiltrado inflamatório menos intenso quando comparados com o grupo controle selvagem, na fase aguda da infecção (20 dias de infecção). No entanto, o infiltrado inflamatório, nos animais deficientes em células B, aumenta na fase crônica da infecção (60 dias de infecção), no músculo esquelético. Adicionalmente, o

número de células T CD45RB^{baixo/neg} e T NK1.1.+ diminuem em animais deficientes em células B, comparado aos selvagens, durante a infecção crônica. Esses dados sugerem que as células B poderiam regular a migração de células T NK1.1.+ ao músculo esquelético e que as imunoglobulinas poderiam ser importantes regulando a migração destas células para os tecidos, na fase crônica da infecção (POSTOL *et al.*, 2001b). Como mencionado anteriormente, possivelmente as células B da zona marginal do folículo linfóide do baço é que poderiam atuar como regulatórias durante o processo inflamatório (MIZOGUCHI *et al.*, 2002) e regular a migração de células T NK1.1.+ (POSTOL *et al.*, 2001b).

1.8 *Estudo de mecanismos envolvidos na memória imunológica.*

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorrem alterações nos compartimentos de células T, principalmente nos órgãos linfóides, como ativação policlonal e redução da celularidade no timo, principalmente devido à depleção de tímócitos duplo-positivo CD4+ CD8+ por apoptose (TALIAFERRO *et al.*, 1955; SAVINO *et al.*, 1989; LEITE-DE-MORAES *et al.*, 1991) bem como alterações das populações de células T CD4+ e CD8+ (LEITE-DE-MORAES *et al.*, 1992).

Durante a infecção ocorrem alterações quantitativas e qualitativas das diferentes subpopulações de células T CD4+ ou CD8+ quanto à expressão de marcadores de superfície. Após a exportação das células para o tecido linfóide periférico, as células T maduras localizam-se dentro de regiões de recirculação de linfócitos e expressam marcadores celulares que o caracterizam fenotipicamente como células “virgens”, “naive” ou não primadas. Em camundongos, as células T “naive” expressam altos níveis de CD45RB e CD62L e níveis baixos ou intermediários de CD44 (SPRENT, 1993). A sobrevivência das células T “naive” requer contínuo contato com peptídeos próprios através do complexo principal de histocompatibilidade combinado com a exposição a citocinas como a IL-7. Hipoteticamente, esses estímulos presumivelmente induzem uma forma de baixo nível de sinalização que é suficiente para a manutenção da homeostasia celular, mas não induzi-lo a entrar no ciclo celular (SPRENT, 2001).

O estímulo dos linfócitos T “naive” para se diferenciarem em células efetoras ocorre após dois sinais: (1) Primeiro é necessário à ligação do TCR com o complexo peptídeo/complexo principal de histocompatibilidade e (2) através de interações das moléculas acessórias sobre a superfície de células T com seus ligantes sobre as células apresentadoras de antígenos. Quando há a ausência do segundo sinal, os linfócitos entram em estado de anergia. Este importante mecanismo regulatório protege contra a estimulação periférica de células T auto-reativas, mas pode também levar a tolerância imunológica a antígenos externos e tumorais que não são eficientemente apresentados por células apresentadoras de antígenos profissionais (JENKINS *et al.*, 1987; HARDING *et al.*, 1992).

Após estimulação, as células T apresentam baixa e/ou negativa expressão de CD45RB e CD62L e alta expressão de CD44. Ocorre desta forma, a modulação na expressão dessas moléculas sobre a superfície celular. Evidências sugerem que a actina do citoesqueleto celular estaria regulando a redistribuição de receptores sobre a superfície celular após a estimulação das células T (KUPFER *et al.*, 1987).

Ao alcançar a finalização da resposta imune com a eliminação do patógeno, grande número de células efetoras geradas durante a resposta imune são eliminadas. A sobrevivência em massa dessas células levaria a um congestionamento nos tecidos linfóides e, portanto, comprometendo subsequente resposta imune. Para solucionar este problema, cerca de 90% das células efetoras são eliminadas após o término da resposta primária, sendo assim, somente poucas células sobrevivem para se tornar células de memória de longa sobrevivência (SPRENT, 2001).

Para que o sistema imune do animal elimine o patógeno de modo eficaz é preciso que haja um compartimento de células T diversificado e numeroso, para haver qualidade e quantidade de células durante a resposta imune. O reconhecimento do antígeno por células T depende da diversidade do repertório de receptor de célula T. A diversidade de células T tem sido estimada em torno de 10^8 células T diferentes em humanos e 10^6 em camundongos (ARSTILLA *et al.*, 1999; CASROUGE *et al.*, 2000). Durante a seleção do repertório de células T são requeridos uma variedade de peptídeos apresentados nos processos de seleção positiva e negativa. Portanto, camundongos que expressam MHC associado com pouca variedade de peptídeos

apresentam significativa contração no repertório de células T (SURH *et al.*, 1997; SANT'ANGELO *et al.*, 1997; BARTON *et al.*, 1999).

Quanto às células B, são constituintes normais do timo e principalmente do baço (INABA *et al.*, 1988) e podem apresentar peptídeos derivados da região variável da imunoglobulina (WEISS *et al.*, 1989) ou peptídeos derivados de antígenos expressos endogenamente (LANZAVECHIA, 1985). Desse modo, sugere-se que as células B poderiam potencialmente servir como fonte de diversidade de peptídeos no timo. Adicionalmente, as células B constituem uma das principais populações de células expressando MHC classe II e são capazes de apresentar antígenos para células T (CONSTANT, 1999).

No baço foi descoberto que em modelos experimentais livres de infecção em camundongos deficientes em células B, ocorre falha no desenvolvimento da zona de células T da polpa branca. Esse dado sugere que as células B influenciam no desenvolvimento da zona das células T no baço (NGO *et al.*, 2001). Desse modo, a deficiência de células B pode causar ineficácia da resposta imune relacionada à ausência de produção de anticorpos e a sua influência sobre as células T. Assim, as conseqüências da ausência de células B, incluem redução da resposta de células T nos modelos de infecção com *Salmonella typhimurium* (MASTROENI *et al.*, 2000), *Bordetella pertussis* (LEEF *et al.*, 2000), *Chlamydia trachomatis* (YANG *et al.*, 1998), *Francisella tulaensis* (ELKINS *et al.*, 1999), *Plasmodium chabaudi* (LANGHOME *et al.*, 1998) e *Leishmania major* (HOERAUF *et al.*, 1996). As células B também são requeridas no desenvolvimento de células T autoreativas que destroem as células β pancreáticas nos camundongos NOD (SERREZE *et al.*, 1996).

Estudos utilizando uma linhagem de camundongos deficientes em célula B, $J_H^{-/}$, obtidos através da deleção do segmento gênico J_H (CHEN *et al.*, 1993), apresentaram quantidade menor de timócitos comparado aos animais controles. Desse modo, a ausência de células B e seu produto, a imunoglobulina poderia influenciar o desenvolvimento de timócitos (JOÃO *et al.*, 2004). Esses dados mostram os efeitos na quantidade de células T no timo e conseqüentemente na periferia decorrente da ausência de células B. Outra linhagem de camundongos, μ MT, obtido através da quebra do exon da cadeia μ (KITAMURA *et al.*, 1991),

mostra que o defeito gênico acarreta ausência de células B funcionais, ocasionando na falta de produção de imunoglobulinas importantes na resposta imune como a IgG e a IgM. No entanto, nestes animais ocorre uma pequena produção de imunoglobulinas, principalmente da classe IgA (cerca de 4,5%), comparados aos animais controles (MACPHERSON *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2002).

Portanto, para o estudo de parâmetros que possam estar ligados à resistência e à manutenção da memória imunológica durante a infecção, selecionamos um modelo experimental que possa auxiliar na compreensão dos mecanismos efetores envolvidos neste sistema.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

- Recentemente, como descrito em projeto de pesquisa prévio desenvolvido em nosso laboratório (coordenado por CARDILLO em 1999; FAPESP) animais desprovidos de linfócitos B funcionais (μ MT) apresentam uma severa inflamação no músculo estriado na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* (POSTOL *et al*, 2001a, 2001b e 2001c). A inflamação no músculo esquelético observada nestes animais foi muito mais intensa do que de C57Bl/6 infectados. No presente estudo pretende-se avaliar a função regulatória de células T NK1.1+ durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Será comparada a resposta inflamatória dos diferentes grupos de animais infectados, bem como a memória imunológica em animais desprovidos de linfócitos B ou reconstituídos com estas células durante a infecção.

2.2 *Objetivos específicos*

- Verificar a sobrevivência de animais μ MT C57Bl/6 e controles C57Bl/6 infectados, após transferência de células B provenientes de animais C57Bl/6 ou C57Bl/6 IL-10 KO. Neste item, será de grande interesse também o estudo da influência da transferência de células B de animais normais ou de animais IL-10 KO sobre as células mononucleares que infiltram tecidos musculares dos animais μ MT C57Bl/6 na fase crônica inicial, durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.
- Verificar a influência da transferência de células B na migração de células T NK1.1+ na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*, em animais μ MT C57Bl/6 previamente reconstituídos com linfócitos B de animais C57Bl/6 ou C57Bl/6 IL-10 KO. Pretende-se quantificar as células T NK1.1+ que infiltram os tecidos do músculo estriado em animais deficientes em linfócitos B reconstituídos ou não com células B provenientes de animais C57Bl/6 ou C57Bl/6 IL-10 KO. Adicionalmente os mesmos grupos serão

tratados com imunoglobulinas provenientes de animais C57Bl/6 normais, e seus baços serão igualmente avaliados. Estes procedimentos serão utilizados no sentido de avaliar em qual extensão as células B normais ou células B que não são capazes de produzir IL-10 ou até mesmo o produto de uma célula B, como por exemplo a imunoglobulina, pode influenciar a migração de células T NK1.1+ para os tecidos musculares e o perfil de ativação e memória de outras populações celulares que participam no controle da infecção.

- Analisar a influência da depleção de células NK1.1+ de animais μ MT e C57Bl/6 durante a fase crônica inicial quanto ao perfil de ativação e memória das células T no baço e no músculo esquelético. Nesta fase da infecção, os animais tratados com anti-NK1.1 (ou não tratados), serão quantificados quanto as células mononucleares dos infiltrados inflamatórios de fragmentos de tecido muscular em μ MT C57Bl/6 comparados aos controles C57Bl/6 infectados, 15 dias após a depleção de células NK1.1+.
- Analisar as populações linfocitárias periféricas por citometria de fluxo, com ênfase especial em células T $\alpha\beta^+$ NK1.1+ e para expressão de CD1+ sobre linfócitos B. Serão analisados células mononucleares do músculo esquelético e os esplenócitos dos diferentes grupos experimentais para a frequência de células T CD4+ ou CD8+ com o marcador CD45RB^{neg} indicando células T de memória.
- Verificar os níveis de TNF α no tecido e no sobrenadante de esplenócitos *in vitro* e a expressão desta citocina no músculo esquelético dos animais infectados, no modelo experimental descrito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Animais*

Foram utilizados camundongos fêmeas, das linhagens BALB/c (nu/+), C57Bl/6 (B6), C57Bl/6 μ MT com gene deficiente para cadeia pesada (μ) da imunoglobulina (μ MT) e C57Bl/6 com gene deficiente para a produção de interleucina 10 (IL-10 KO) com 4 a 6 semanas de idade, criados e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia. As matrizes dos animais μ MT foram gentilmente cedidas pelos Drs. Luís Guilherme Stark Aroeira (IPEN-Instituto de Pesquisas Nucleares, SP) e Carlos Martinez-Alonso (Universidade Autónoma de Madri-Centro de Biologia Molecular). Os protocolos experimentais aqui utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.2 *Parasitos*

O parasito *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen foi mantido por passagens seriadas semanais em camundongos C57Bl/6 e BALB/c (nu/+), através da administração, por via intraperitoneal, de 10^3 formas tripomastigotas/animal. Para infecção dos grupos experimentais, o sangue dos camundongos na fase aguda de infecção foi coletado e acondicionado em microtubos contendo heparina. Após determinação do número total de parasitos por mL de sangue do animal, uma alíquota do sangue foi então diluída em solução salina tamponado com fosfato (PBS) estéril. A partir da solução diluída contendo o número de formas tripomastigotas definido, 0,2 mL foi injetado via intraperitoneal em camundongos.

3.3 *Determinação do número de parasitas no sangue circulante (parasitemia).*

O número de parasitas circulantes foi obtido em diferentes dias após a infecção, segundo método previamente descrito por MELO & BRENER em 1978. Inicialmente, 5 μ L de sangue da cauda do animal foram colhidos e depositados sobre uma lâmina e em seguida, o sangue foi recoberto com uma lamínula 22 x 22 mm de modo a se

obter uma camada delgada ocupando homoganeamente toda a superfície da lamínula. Através de observação pelo microscópio, o número de formas tripomastigotas foi determinado a partir da contagem de 20 campos microscópicos (objetiva de 40x), multiplicação por 5. Conhecendo-se a área dos campos microscópicos, foi possível determinar o número de parasitas por mm^3 . Posteriormente, os dados foram desenhados graficamente para visualização da cinética da parasitemia no animal. Foi também determinada a taxa de mortalidade do animal.

3.4 *Infecção aguda e crônica.*

Para a obtenção de animais na fase aguda de infecção, primeiro foi verificado o comportamento da cepa Tulahuen de *T. cruzi* nos animais C57BL/6 selvagens e μ MT C57BL/6. Foram assim obtidos animais na fase aguda de infecção e utilizados com aproximadamente 30 dias após infecção com inóculo de 100 formas tripomastigotas. Quanto à obtenção de animais suficientes para a remoção de baços na fase crônica inicial de infecção, os animais foram infectados com 50 ou 100 formas tripomastigotas e monitorados. Quando necessário, e utilizando inóculos de 100 formas, foram tratados (no caso de inóculo de 100 formas) com a droga benzonidazol (Rochagan-Roche), na concentração de 100mg/kg de peso corporal, durante 3 dias seguidos, por via oral. Neste sentido, obteve-se número suficiente de animais para serem utilizados com cerca de 60 dias de infecção por *T. cruzi*, aqui denominada fase crônica inicial.

3.5 *Transferência adotiva de células B.*

As células B foram obtidas através da seleção negativa dos esplenócitos, utilizando-se esferas magnéticas recobertas com anticorpo monoclonal contra IgM de camundongo (Miltenyi, conforme instruções do fabricante). Em seguida, as mesmas foram coletadas em meio HBSS (GIBCO). Após duas centrifugações, as células foram ressuspensas em HBSS e em seguida injetadas, por via endovenosa, em camundongos μ MT. A eficiência da purificação de células B foi testada por citometria de fluxo, indicando uma população de linfócitos B purificada em 98%.

3.6 Tratamento com Imunoglobulina

Para a realização deste tratamento, inicialmente foi obtida uma grande quantidade de soro de animais C57Bl/6. Para tal, foi coletada grande quantidade de sangue dos camundongos C57Bl/6 selvagens e após a retração do coágulo, o soro foi obtido por centrifugação a 1000 rpm, 15 minutos e 4° C. Posteriormente, para inativação das proteínas do sistema complemento, o soro foi tratado a 56° C por 1h, posteriormente aliquotado e congelado a -20° C. Os animais μ MT C57Bl/6 geneticamente modificados para não transcreverem o gene μ (KO) de 4 a 6 semanas de idade, foram tratados com 500 μ L de soro contendo imunoglobulinas (Ig) de animais C57Bl/6 selvagens em um período total de 30 dias, em dias intercalados, através da via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado no mesmo dia de infecção e o último dia de tratamento foi seguido pelo sacrifício do animal, quando da realização do procedimento experimental. Segundo referencia bibliográfica, a concentração de imunoglobulinas no soro de camundongos normais está entre os intervalos de concentração apresentada na Tabela 1, de acordo com a subclasse de Ig e também da linhagem de camundongo. Assim, cada 1 mL de soro de C57Bl/6 normal pode conter entre 7,76 a 14,3 mg de Ig e portanto, foi administrado por via intraperitoneal entre 3,88 e 7,15 mg de Ig presente em cerca de 500 μ L de soro, por camundongo.

Subclasses de imunoglobulinas	Concentração no Soro (mg/mL)
IgM	0.6 – 1.0
IgG	6.9 – 12.9
IgA	0.26 – 0.4
IgD	NDA
IgE	0.1 . 10 ⁻³

Tabela 1. Variação na concentração de diferentes subclasses de imunoglobulina no soro de camundongos normais. Obtido de MALE e colaboradores, 1987.

3.7 *Depleção de células NK1.1+ in vivo.*

Para a depleção de células NK1.1+ in vivo, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-NK1.1 obtido do fluido ascítico e usado após precipitação com sulfato de amônio. A depleção in vivo de células com marcador NK1.1 foi obtida por injeções intraperitoneais com 1 mg/camundongo/dia de anticorpo monoclonal anti-NK1.1 (PK136, American Type Culture Collection, Rockville, MD), em três doses em dias intercalados, aproximadamente 55 dias após a infecção. Os experimentos foram realizados no 70º dia após a infecção. A eficiência da depleção de células NK1.1+ foi testada após os tratamentos com anticorpos monoclonais, alcançando aproximadamente 98% de depleção celular. O anticorpo utilizado foi o mesmo que aquele descrito em trabalho recentemente publicado (NOMIZO, *et al.*, 2005 *in press*). Enfatizamos que o protocolo de tratamento com anti-NK1.1 aqui utilizado difere daquele realizado na fase aguda (CARDILLO, *et al.*, 1996) ou mesmo quando os animais são tratados antes e durante a infecção (CARDILLO *et al.*, 2004; CARDILLO *et al.*, 2002; CARDILLO *et al.*, 2000).

3.8 *Cultura de células do baço para obtenção de sobrenadante*

Células totais de baço provenientes de animais C57Bl/6 e μ MT normais ou infectados, após obtenção, lavagem, contagem e ressuspensão em concentração de 10×10^6 por mL, foram cultivadas na presença ou não de LPS em placas de 24 poços (Corning, NY, USA). As células foram cultivadas em suspensão em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, USA), 5×10^{-5} mM de 2-mercaptoethanol (Sigma), 20 μ g/mL de sulfato de gentamicina (Shering-Plough Ltda). Elas foram incubadas em estufa umidificada, a 37º C, 5% CO₂ por 48 horas e após esse período colhido o sobrenadante para dosagem de TNF- α pelo método de ELISA.

3.9 *Dosagem de citocinas.*

A primeira fase do ensaio imunoenzimático (ELISA) é a preparação da superfície dos poços de placas de 96 poços (Nunc), através da adição de anticorpos monoclonais

anti-TNF- α (G281-2626) adquiridos da Pharmingen, que aderem na superfície dos poços. São adicionados então cerca de 50 μ L da solução de anticorpo monoclonal, diluídos em PBS na proporção de 200 vezes, em cada poço e incubado a 10° C por no mínimo 12 horas. Na segunda fase do experimento, a placa primeiramente foi lavada 4 vezes através da adição de PBS, acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20 (Sigma) e posteriormente adicionado 150 μ L de PBS contendo 5% (p/v) de proteínas (caseína) do leite desnatado (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 μ L por poço. A curva da citocina TNF- α recombinante (Pharmingen) 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 10° C. Na fase final do experimento, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20. Adicionou-se em seguida 50 μ L de anticorpo anti-TNF- α biotilado (MP6-XT3) provenientes da Pharmingen, diluído em PBS-0,05% Tween 20, seguindo-se de incubação por 1 hora a temperatura ambiente, sob proteção da luz. Após as lavagens, foi adicionado 50 μ L/poço de Streptoavidina conjugada a peroxidase na diluição de 1:4000, diluída em PBS e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. No final do processo, a reação foi revelada com 50 μ L/poço de solução reveladora contendo 10mL de tampão citrato 0,1M (pH 5.0), 3 μ L de H₂O₂ (0,3% v/v) e 5 mg de OPD, no volume de 50 μ L por poço. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de 50 μ L/poço de ácido Sulfúrico (H₂SO₄) na concentração de 4N. Em seguida, a placa foi submetida à metria através do leitor de ELISA, com o comprimento de onda de 490 nm. Da mesma maneira, as células mononucleares do sangue periférico de animais IL-10 KO foram obtidas através de sangria pela cauda (gradiente de Ficoll – Pharmacia Biothec) e estimuladas com anti-CD3 por 48 horas. Em seguida o sobrenadante foi dosado e triado para a presença de IL-10 por ELISA, como descrito em CARDILLO, 1996.

3.10 Isolamento de células mononucleares do músculo estriado esquelético.

Os tecidos musculares, retirados dos animais dos diferentes grupos, foram previamente separados do tecido ósseo, cortados em pequenos pedaços e tratados com 1,0 mg/mL de colagenase (Sigma), diluída em PBS, por 30 minutos a 37° C. Em seguida, as células mononucleares provenientes do músculo esquelético foram separadas através de gradiente descontínuo de Percoll (Pharmacia Biothec). As células mononucleares foram então obtidas, com o auxílio de pipetas Pasteur, na interface entre as soluções de Percoll 40 e 80% (v/v). Estas células foram então lavadas uma vez por centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos a 4° C, com PBS. Em seguida, lavada novamente com PBS com 1000rpm, 15 minutos e 4° C. Terminadas as lavagens, foi determinada a concentração de células através da contagem em câmara de Neubauer, e os mesmos submetidos á marcação de moléculas de superfície celular e análise por citometria de fluxo. É importante ressaltar que o número de células mononucleares obtidas do músculo esquelético de animais cronicamente infectados apresenta grande variação numérica.

3.11 Preparação das células do baço total para coloração por Citometria de fluxo. (FACS).

Inicialmente o baço foi extraído cirurgicamente, em condições de esterelidade, dos camundongos provenientes dos diferentes grupos experimentais e submetidos ao processo de maceração do órgão para obtenção das células. Estas células foram lavadas por 2 vezes, por centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos a 4° C. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi ressuspenso em PBS e após os primeiros artefatos ou “debris” se depositarem sobre o fundo do tubo, retira-se a solução em outro tubo a fim de que seja excluído os artefatos depositados. Terminado o processo, realizou-se outra centrifugação e por fim a ressuspensão em cerca de 3 ml de PBS. Para preservação das células viáveis, as mesmas foram mantidas sob baixas temperaturas (4–10° C), onde os tubos contendo as células foram acondicionados em isopores contendo gelo. Após as lavagens, o número de células foi então determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Ao obter o número de células por mililitros, foram preparadas diluições contendo 2×10^6 células em cada 100 μ L. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (“Falcon”),

adicionando-se 2×10^6 células/poço, e posteriormente centrifugadas a 2000 rpm por 3 segundos. Em seguida foram ressuspensas, cuidadosamente, por “agitação” no Vortex, de imediato foi adicionado em cada poço cerca de 100 μ L de tampão de FACS, constituído de PBS, 5% (v/v) Soro Fetal Bovino e 0,1% (p/v) Azida. Terminado o processo, as células estão prontas para serem utilizadas no processo de marcação de moléculas de superfície e de moléculas intracelulares para análise posterior em citômetro de fluxo.

3.12 *Análise das populações celulares por citometria de fluxo.*

As células provenientes do baço e as mononucleares do músculo esquelético foram ressuspensas, na concentração de 2×10^7 células/mL, em tampão de FACS. Alíquotas de 100 μ L das suspensões celulares foram incubadas, por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidos da luz, com os seguintes anticorpos monoclonais (mAbs): anti-TCR $\alpha\beta$, anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com isotiocianato de fluoresceína; anti-NK1.1, anti-CD45RB, anti-CD62 e anti-CD1, conjugados com ficoeritrina; anti-NK1.1 e anti-IgM conjugados a biotina (os quais sofreram posterior incubação com fluorocromos), além de reagentes controles para bloqueio do receptor de Fc (reagentes obtidos da Pharmingen). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes por centrifugação e ressuspensas em 0,5 mL de PBS/Azida. As suspensões de células foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

3.13 *Protocolo experimental para análise de populações linfocitárias após coleta de células no FACS.*

Após a marcação dos linfócitos T do baço ou de células mononucleares do músculo esquelético, as mesmas foram analisadas no citômetro de fluxo, para a presença de marcadores de superfície. Como exemplo, aqui são apresentadas as marcações das moléculas CD4+ CD62L (Fig. 1) A baixa expressão ou ausência desse marcador indica o fenótipo de uma célula T efetora/memória. Primeiramente, observa-se análise em Citômetro de Fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) das células sobre parâmetros de granulosidade (SSC) e o tamanho das células (FSC) (Figura 1A). Assim, na figura 1A podemos determinar que na região R, há um

enriquecimento de linfócitos T. O gráfico 1B ilustra as células T da região definida em R1 quanto à presença do marcador CD4 (FL1-H – em Fluoresceína) e CD62L (FL2-H – em Ficoeritrina). Após a definição das barreiras para determinar se as células são positivas ou negativas quanto à presença do marcador, foi realizada a análise estatística pelo programa Cell Quest do mesmo aparelho. Para obtenção da frequência de células T CD4+ CD62L negativa, primeiro foi definida a porcentagem total de células T com marcador CD4+ (Região R2 da figura 1C). Posteriormente, sobre a porcentagem total de células T CD4+ foi obtida a porcentagem de células T CD4+ que não expressa o marcador CD62L (Fig. 1D), a partir da qual foi traçado o histograma 1E. Assim, foi a frequência de células CD62L negativas (M1) sobre o total de células CD4+ positivas. Finalmente, a barreira M1 da figura 1E indica a área de células T CD4+ CD62L negativa (33%).

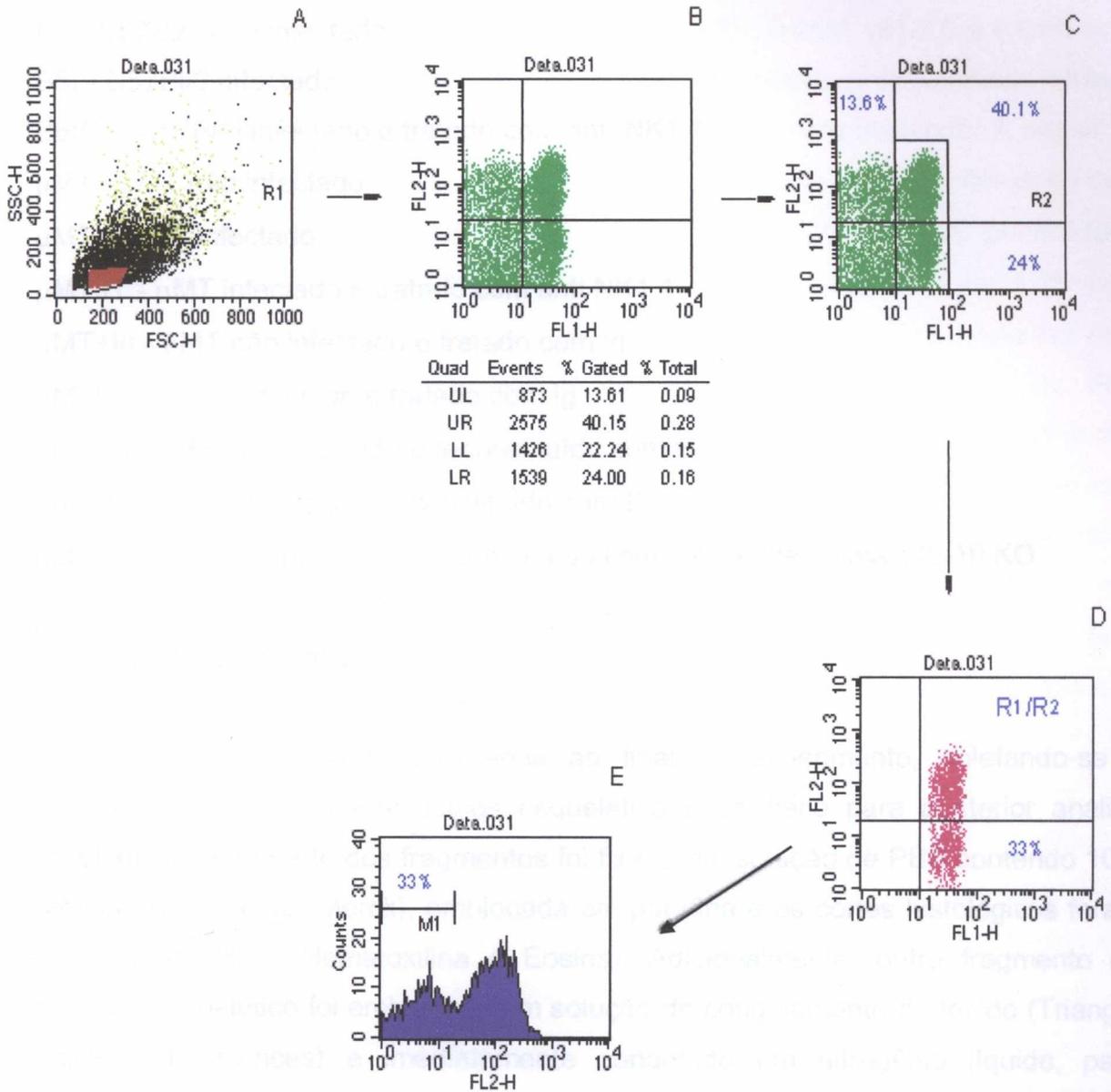


Figura 1. Esquema do protocolo experimental para análise dos dados obtidos do Citômetro de fluxo: De modo ilustrativo, o gráfico A ilustra os esplenócitos diferenciados por granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). A região R1 no gráfico A representa uma área com alta densidade de linfócitos. O gráfico B irá determinar a presença de marcadores FL1 (CD4+ ou CD8+) e FL2 (CD62L) a partir da população celular da região R1 do gráfico A. Após delimitar as barreiras para definir a presença ou ausência do marcador (gráfico B). 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 explicita de outra maneira o gráfico D, de modo a visualizarmos a presença do marcador FL2 somente na população FL1 positiva.

Grupos Experimentais apresentados nos gráficos a seguir:

B6 - C57Bl/6 não infectado

B6I - C57Bl/6 infectado

B6I/T – C57Bl/6 infectado e tratado com anti-NK1.1

μ MT - μ MT não infectado

μ MTI - μ MT infectado

μ MTI/T - μ MT infectado e tratado com anti NK1.1

μ MT+Ig - μ MT não infectado e tratado com Ig

μ MTI+Ig - μ MT infectado e tratado com Ig

μ MT+B - μ MT não infectado e reconstituído com B

μ MTI+B - μ MT infectado e reconstituído com B

μ MTI+BKO - μ MT infectado e reconstituído com células de animais IL-10 KO

3.14 Avaliação histológica

Os camundongos foram sacrificados ao final do experimento, coletando-se a amostras de tecidos de músculos esquelético e cardíaco para posterior análise histológica. Uma parte dos fragmentos foi fixada 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). Adicionalmente, outro fragmento do músculo esquelético foi emblocado em solução de congelamento de tecido (Triangle Biomedical Sciences) e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para posterior estudo por Imunohistoquímica. As secções histopatológicas de tecido muscular esquelético e cardíaco foram analisados segundo Método de graduação de infiltrado inflamatório e necrose: (-/+) sem alterações; (+) pouco ; (++) moderado ; (+++) intenso.

3.15 Imunohistoquímica

Os tecidos obtidos e congelados foram cortados em aparelho de Criostato (Leica/2800 Frigocut) na espessura de aproximadamente 5 μ m e fixados em lâminas. Em seguida foram fixadas em acetona (Synth) gelada por 5 minutos e congeladas a temperatura de -70° C. Esses cortes, no momento do procedimento

experimental, foram descongelados a temperatura ambiente e submetidos aos processos de hidratação com PBS contendo Tris HCL 0,05M, pH 7,5 e 0,01% (v/v) Tween 20 (TBS-Tween). O bloqueio de ligações inespecíficas foi efetuado através da solução TBS-Tween contendo 5% (v/v) de soro de cabra inativado. A seguir foi feita incubação a 20 minutos seguido de lavagem com TBS-Tween e marcação com anticorpo primário de rato anti-TNF- α de camundongo (G281-2626 purificado e adquirido da Pharmingen), diluído em TBS-Tween na proporção de 1:25 com incubação de um dia para outro. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-Tween e bloqueadas para biotina endógena através da adição de PBS contendo 0,1% (p/v) de BSA e NaN_3 por 20 minutos. Outras lavagens foram realizadas e as lâminas foram incubadas com TBS-Tween com 5% (p/v) de leite desnatado (Leite Molico – Nestlé) por 15 minutos, contendo caseína. Após novas lavagens foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-rato (produzido em coelho adquirido da Zymed, San Francisco-California, USA) que identifica o anti-TNF- α produzido em rato (Pharmingen) na proporção de 1:4000, por 45 minutos. Lavando-se novamente com TBS-Tween foi realizado novo bloqueio desta vez para inativar a peroxidase endógena, através da incubação com PBS com 0,3% (v/v) de H_2O_2 (por 30 minutos). Após lavagens com TBS-Tween, foi adicionado streptoavidina peroxidase e incubado por 20 minutos (diluição de 1:300 em TBS-Tween), seguida novamente de lavagem com TBS-Tween. No último passo são adicionados a solução reveladora com 10 mL de PBS contendo 0,01 mg de diaminobenzidina (0,0001%) (DAB) onde são adicionados 120 μL de H_2O_2 . Foi observada a coloração dos controles negativos e positivos, após 5 minutos e então a reação foi bloqueada pela adição de água destilada gelada e lavou-se após com TBS-Tween. Após a revelação e bloqueio, os cortes foram ainda corados com Verde α 2% (p/v) (Vetec) (coloração do núcleo celular) e fixados e seqüencialmente na lavagem com Álcool etílico (Pring) 90%, 80% e 70% e finalmente Xilol (Nuclear). Após esses processos são montadas as lâminas em Bálsamo do Canadá (Biotec). Desse modo, observando-se parâmetros do controle positivo (Linhagem de Macrófagos - J774) estimulado com LPS (Lipopolissacarídeo) e do controle negativo com a mesma linhagem celular, porém, sem o estímulo, foram observados os tecidos que apresentaram expressão de TNF- α com coloração específica.

3.16 *Forma de análise dos resultados*

A comparação entre os grupos experimentais foi analisada utilizando-se o teste U Mann-Whitney, este para a comparação entre os diversos grupos. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes e são identificados com *.

4. RESULTADOS

4.1. *Avaliação dos padrões de resistência à infecção por Trypanosoma cruzi utilizando-se a cepa Tulahuen em camundongos C57Bl/6.*

4.1.1 *Números de formas tripomastigotas circulantes em animais μ MT e C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen de T. cruzi.*

Nessa primeira fase experimental nosso objetivo foi infectar animais C57Bl/6 e μ MT para obter grupos de animais em fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*. Os grupos experimentais estudados foram: C57Bl/6 infectados (B6I), μ MT C57Bl/6 infectados (μ MTI), μ MT infectados e tratados com imunoglobulinas (μ MTI+Ig), μ MT infectados e reconstituídos com células B de C57Bl/6 (μ MTI+B). Assim, foram obtidos os gráficos de parasitemia dos diferentes grupos ao longo da infecção até aproximadamente 60 dias de infecção (Fig. 2). Comparativamente, podemos observar na figura 2 que os animais B6I apresentaram níveis parasitêmicos abaixo dos animais μ MTI. O grupo μ MTI+Ig apresenta o maior pico parasitêmico no 20º dia de infecção, comparado ao controle μ MTI.. Após esse dia, neste grupo, a parasitemia decresce e no 29º dia de infecção, em animais μ MTI+Ig. Já o grupo μ MTI aumenta a parasitemia intensamente no 24º dia, em seguida no 29º dia apresenta um pico menor e progressivamente diminui até zero aos 49 dias da infecção. O grupo experimental μ MTI+B controlou melhor a parasitemia, após a transferência de células B (comparado aos animais do grupo μ MTI). Em detalhe na figura menor inserida em 2A observa-se a parasitemia dos grupos previamente citados, quando inoculados com 50 formas tripomastigotas. Novamente, animais μ MT apresentam parasitemia maior do que animais C57Bl/6 infectados (pico no 24º dia de infecção). A mortalidade acompanha a taxa de parasitemia dos diferentes grupos descrita acima, sendo que a referida taxa é descrita a seguir.

4.1.2 Taxa de mortalidade/sobrevida.

Através da comparação da taxa de mortalidade dos diferentes grupos experimentais, todos os animais mostraram relativa susceptibilidade à cepa Tulahuen. Notadamente, os animais μ MTI foram os primeiros a apresentar taxa de mortalidade aparente (20 dias, dados não mostrados). Comparativamente, os animais μ MTI apresentaram taxas maiores do que B6I. A mortalidade no grupo μ MTI alcançou 100% aos 60 dias e, portanto maior do que B6I. Já nos grupos reconstituídos ou tratados (μ MTI+B e μ MTI+Ig, respectivamente) as taxas de mortalidade foram semelhantes até o 32º dia de infecção (60% e 50% respectivamente). Porém, a mortalidade do grupo μ MT+Ig aumenta progressivamente a 100%, até no 38º dia de infecção. A taxa de mortalidade do grupo μ MT+B permaneceu constante (50%) até o 38º dia, sendo que no 41º dia aumentou para 68% (Fig. 3) e permaneceu nessa porcentagem até 60 dias e também até cerca de 90 dias de infecção (dados não mostrados). Interessantemente, um dos grupos μ MT apresentou uma sobrevida mais longa, o grupo μ MTI+B. Na figura menor inserida (detalhe da Fig. 3B) está representada a mortalidade dos grupos previamente citados, quando inoculados com menores números de formas tripomastigotas de *T.cruzi* (50 formas tripomastigotas). A mortalidade de μ MT infectado e reconstituído com linfócitos B de C57Bl/6 IL-10 KO foi similar (não mostrados) ao aqui apresentado para o grupo de camundongos μ MT reconstituídos com células B de C57Bl/6 selvagem. Portanto, observa-se claramente que o grupo μ MT é altamente susceptível quando comparado a seu controle C57Bl/6 infectado. A reconstituição com linfócitos B resulta em maior resistência à infecção.

PARASITEMIA CAMUNDONGOS C57BL/6 B minus INFECTADOS COM A
CEPA TULAHUEN DO *Trypanosoma cruzi*

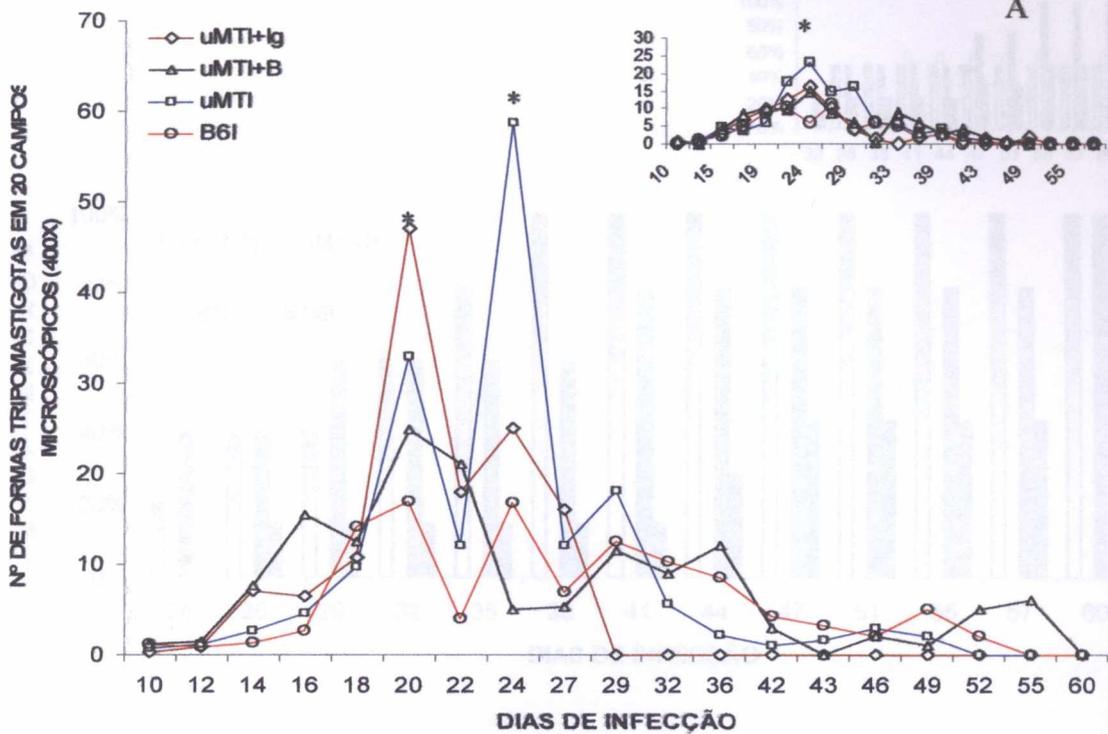


Figura 2. Números de parasitos circulantes. Camundongos C57Bl/6 (B6) e μ MT C57Bl/6 (μ MT) foram infectados por via intraperitoneal com 100 formas tripomastigotas da cepa Tulahuén e a parasitemia foi determinada nos dias indicados. Grupos experimentais: μ MT C57Bl/6 infectados (μ MTI), μ MT C57Bl/6 infectados tratados com Imunoglobulina (μ MTI+Ig), μ MT C57Bl/6 que sofreram transferência adotiva de células B (μ MTI+B); C57Bl/6 infectados (B6I). Em detalhe (A), gráfico inserido: inóculo de 50 formas tripomastigotas, como descrito em métodos. Número de animais por grupo experimental: n=10. Estatística* ($p < 0,05$) comparando μ MTI+Ig* com μ MTI e B6I; μ MTI* com B6I.

Os resultados da figura 4 mostram que na ausência de células B funcionais (μ MT C57Bl/6) há uma tendência dos animais C57Bl/6 apresentarem maiores números de células tripomastigotas circulantes. Em camundongos não infectados (aqueles denominados normais), do grupo B6I há um número de células semelhante aos controles μ MT. A administração de Ig em animais μ MT (μ MT+Ig) resultou em um aumento de esplenócitos quando comparado aos μ MT e aos C57Bl/6 controles (Fig. 4A).

Após a infecção, os animais C57Bl/6 e μ MT apresentaram em torno de 100 milhões de células. Comparativamente, os grupos experimentais infectados (B)

MORTALIDADE CUMULATIVA

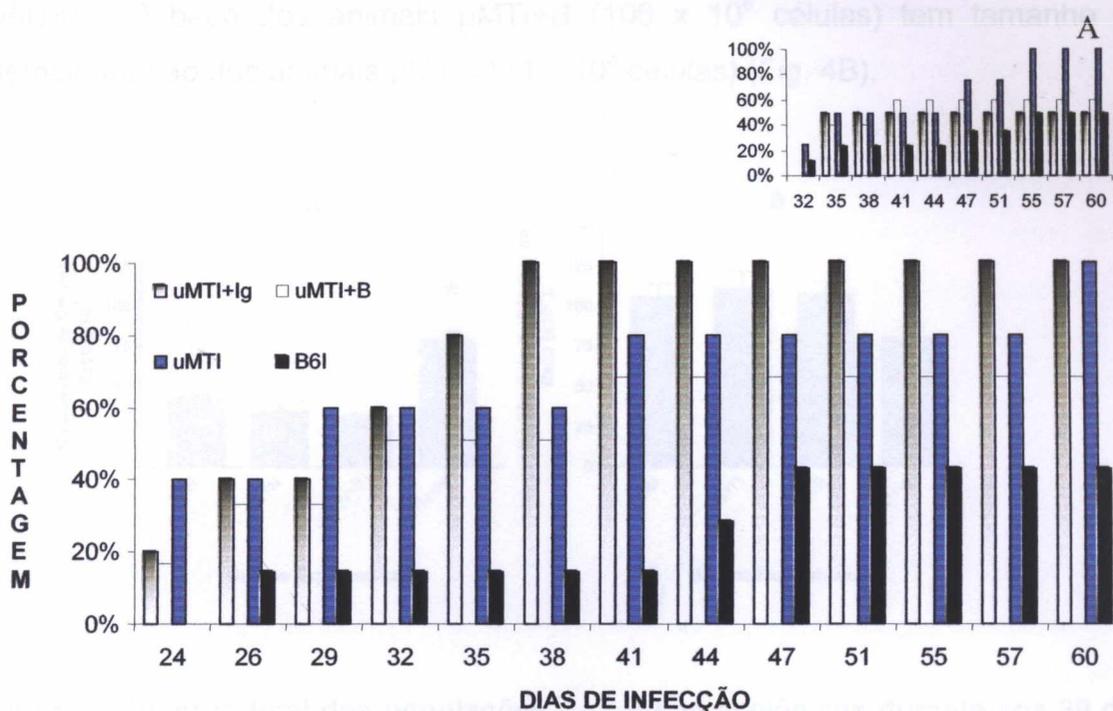


Figura 3. Taxa de mortalidade cumulativa. Camundongos C57Bl/6 (B6) e μ MT C57Bl/6 (μ MT) foram infectados por via intraperitoneal com 100 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen e a mortalidade foi determinada nos dias indicados. Grupos experimentais: μ MTI, μ MTI+Ig, μ MTI+B, B6I. Inserção no detalhe em 3A indica inóculo de 50 formas tripomastigotas. Número de animais utilizados por grupo experimental: 10.

4.2 Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase aguda (30 dias) da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Os resultados da figura 4 mostram que na ausência de células B funcionais (μ MT C57Bl/6) há uma tendência dos animais C57Bl/6 apresentarem maiores números de células no baço. Em camundongos não infectados (aqui denominados normais), do grupo μ MT+B há número de células semelhante aos controles μ MT. A administração de Ig em animais μ MT (μ MT+Ig) levou a um aumento de esplenócitos quando comparados aos μ MT e aos C57Bl/6 controles (Fig. 4A).

Após a infecção, os animais C57Bl/6 e μ MT apresentaram em torno de 100 milhões de células. Comparativamente, os grupos experimentais infectados (B)

apresentaram um baço maior do que os não infectados (A), com exceção do grupo μ MT+Ig. O baço dos animais μ MTI+B (106×10^6 células) tem tamanho médio semelhante ao dos animais μ MTI (111×10^6 células) (Fig. 4B).

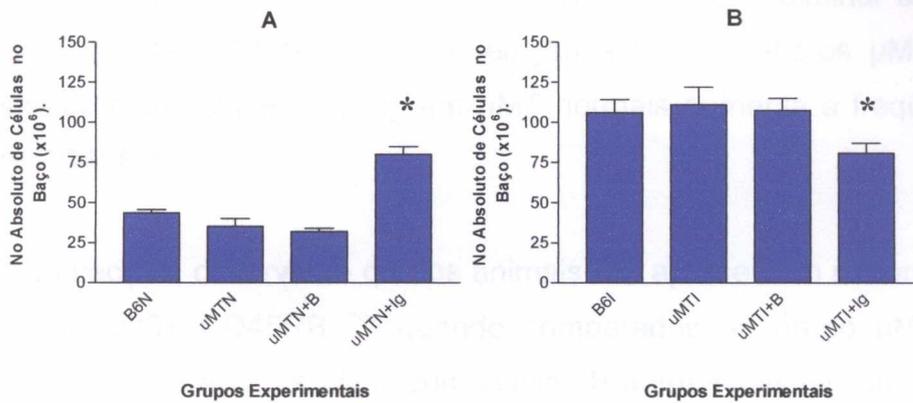


Figura 4. Número total das populações de células esplênicas durante aos 30 dias de infecção. Na figura A (não infectados-N) e B (infectados-I) está representado o número total de células do baço, dos diferentes grupos experimentais: B6N (C57Bl/6 não infectados), μ MTN (μ MT C57Bl/6 não infectados), μ MTN+B (normais e reconstituídos com células B), μ MTN+Ig (normais e tratados com Ig), B6I (infectados), μ MTI (infectado), μ MTI+B (infectado e reconstituído com células B de camundongos C57Bl/6), e μ MTI+Ig, (infectado e tratado com imunoglobulina). Animais por grupo experimental: 3. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). μ MTN+Ig * : estatisticamente significativa em relação ao grupo de animais μ MTN ; μ MTI+Ig * : em relação ao grupo μ MTI e μ MTI+B. A barra no gráfico se refere ao desvio padrão dos dados obtidos.

4.3 Marcadores de superfície celular sobre linfócitos T do baço evidenciados por citometria de fluxo (FACS) durante a fase aguda da infecção (30 dias).

4.3.1 Alterações quantitativas das populações de células T de baço que não apresentam o marcador CD45RB.

Neste tópico são analisadas as quantidades totais de linfócitos T presentes no baço dos diferentes grupos experimentais negativos para a expressão do marcador de superfície celular CD45RB ($CD45RB^{neg}$) (Fig. 5). Quanto à frequência de células T $CD4^+ CD45RB^{neg}$ e $CD8^+ CD45RB^{neg}$ (respectivamente, Figs. 5A e B), notamos

que o grupo de animais C57Bl/6 normais apresenta freqüência similar do marcador de células CD45RB^{neg} (sobre células T CD4+ e CD8+ totais), quando comparado ao grupo μ MT normal. A administração de Ig a animais μ MT normais aumenta CD4+ CD45RB^{neg} quando comparados aos μ MT normais sem tratamento. A transferência adotiva de células B em animais μ MT não infectados diminui as proporções de células T CD4+ CD45RB^{neg} em relação a seus controles μ MT normais. Já o tratamento com células B ou Ig em μ MT normais aumenta a freqüência de células CD8+ CD45RB^{neg}.

Após a infecção, observa-se que os animais B6I apresentam maiores proporções de células T CD8+ CD45RB^{neg} quando comparados ao grupo μ MTI (Figs. 5B). A reconstituição de animais μ MTI com células B aumenta significativamente o número de células T CD4+ CD45RB^{neg} e CD8+ CD45RB^{neg}. Portanto, a reconstituição com células B ou o tratamento com Ig em grupos μ MT infectado resulta em alta freqüência de células CD45RB^{neg}, tanto em CD4+ como em CD8+ quando comparado ao μ MTI.

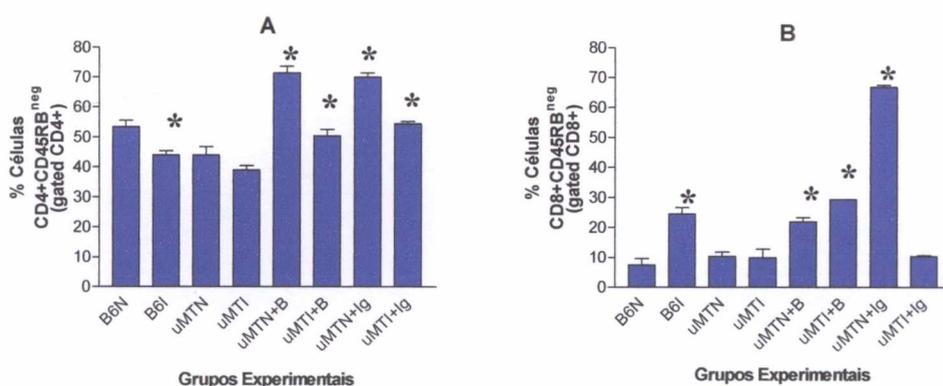


Figura 5. Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) esplênicas, que apresentam expressão negativa do marcador CD45RB, na fase aguda: Nesta figura esta representada a porcentagem de células T CD4+ CD45RB^{neg} (A) e CD8+ CD45RB^{neg} (B), dos diferentes grupos experimentais: B6N, B6I, μ MTN, μ MTI, μ MTN+B, μ MTI+B, μ MTN+Ig, μ MTI+Ig, descritos em métodos. A barra refere-se ao desvio padrão dos dados. Animais por grupo: 3. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Para o gráfico 5A - B6I*: estatisticamente significativo em relação ao grupo não infectado ; μ MTN+B* e μ MTN+Ig* : em relação a μ MTN ; μ MTI+Ig* e μ MTI+B* : em relação ao grupo

μ MTI. Para o gráfico 5B - B6I* : em relação ao B6N ; μ MTN+Ig* e μ MTN+B* : em relação ao μ MTN ; μ MTI+B* : em relação à μ MTI.

4.3.1.1 *Gráficos representativos das populações de células T de baço que apresentam marcadores de memória imunológica: a expressão de CD45RB^{neg} na fase aguda.*

Como representação dos gráficos de ativação/memória previamente citados, observamos nas planilhas da figura 5.1 e 5.2 a expressão de CD45RB^{neg} sobre as populações T CD4+ e CD8+, respectivamente. Os gráficos obtidos expressam o padrão e a intensidade de coloração do marcador CD45RB^{neg} sobre as células CD4+ e CD8+, quando foi selecionada uma única região contendo linfócitos do baço.

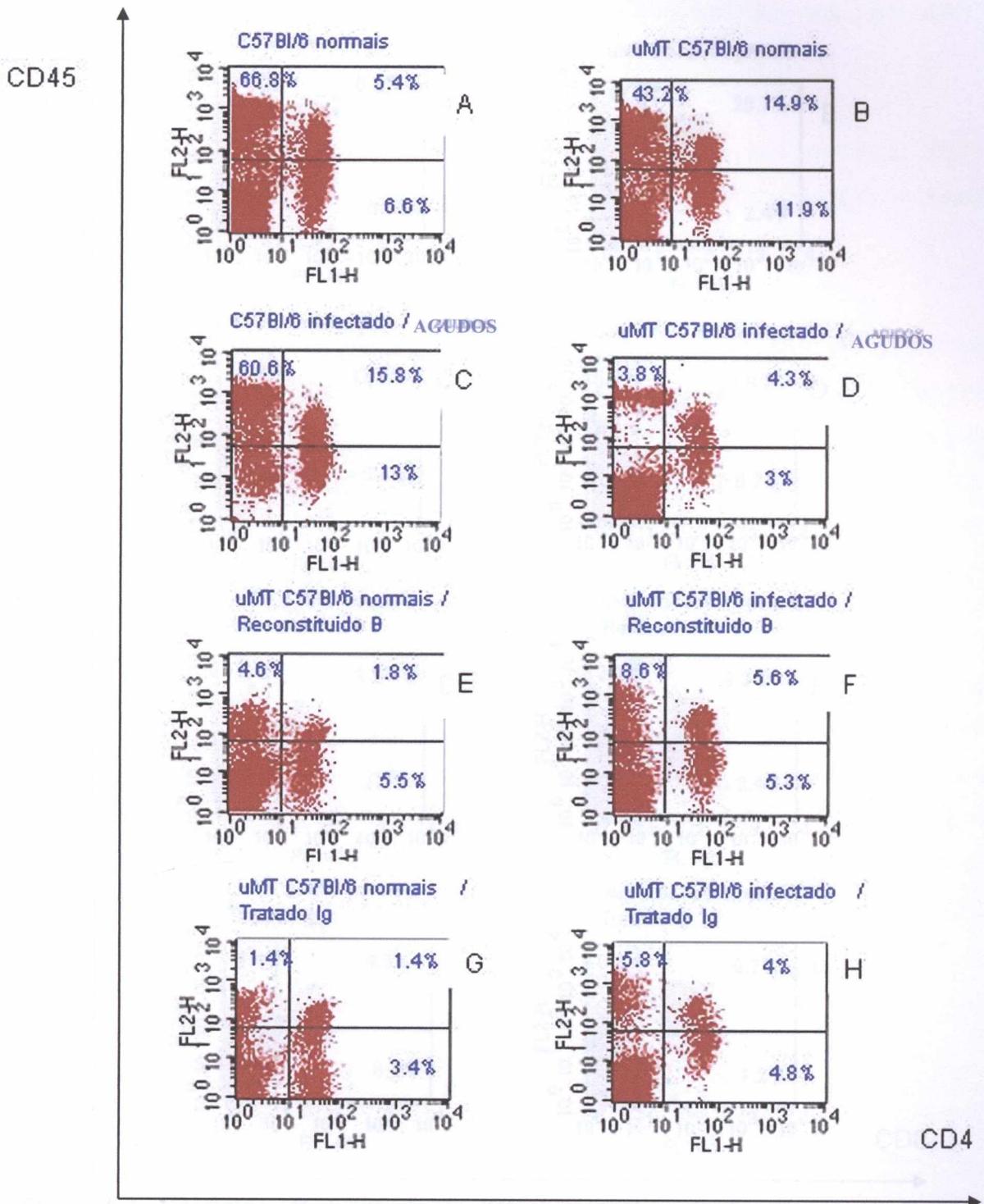


Figura 5.1. Citometria de fluxo de linfócitos do baço de diferentes grupos experimentais, indicando células marcadas por anti-CD4⁺ e anti-CD45RB na infecção aguda: C57Bl/6 normais (A), μ MT normais (B), C57Bl/6 infectados (C), μ MT infectados (D), μ MT normais e reconstituídos com células B (E) ou tratados com Ig (G), μ MT infectados e reconstituídos (F) ou tratados (H). Expressão de marcadores de superfície celular CD4⁺ fluorocromo FITC (eixo X) e CD45RB fluorocromo PE (eixo Y). (Descrito no tópico 13 em A até E de métodos).

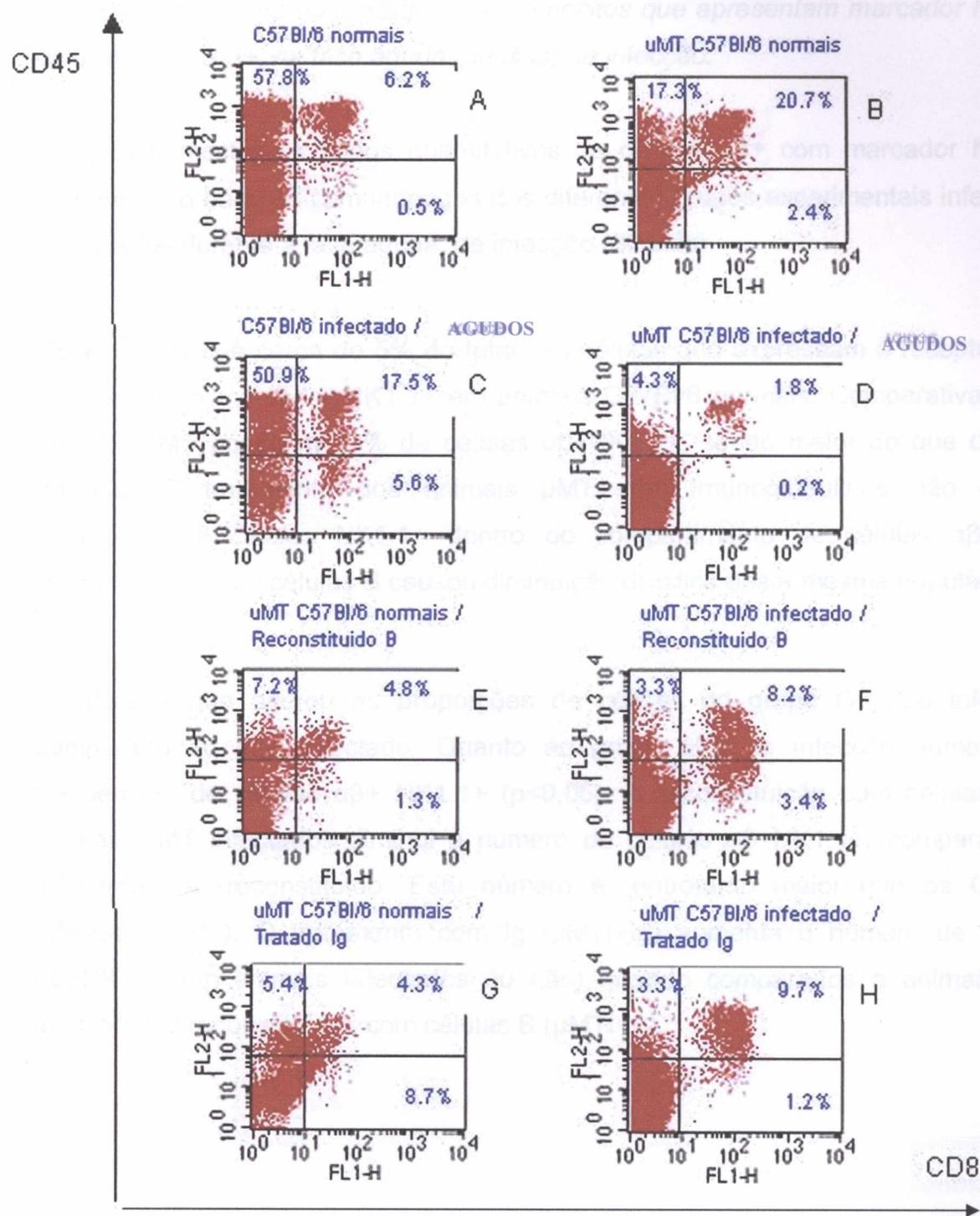


Figura 5.2. Citometria de Fluxo sobre linfócitos esplênicos de grupos experimentais, mostrando o marcador CD45RB sobre células T CD8+, na fase aguda: C57Bl/6 normais (A), μ MT normais (B), C57Bl/6 infectados (C), μ MT infectados (D), μ MT normais e reconstituídos com células B (E) ou tratados com Ig (G), μ MT infectados e reconstituídos (F) ou tratados (H). Marcadores de superfície celular CD8+ fluorocromo FITC (eixo X) e CD45RB fluorocromo PE (eixo Y). (Ilustrado na seção 13 de A até E em métodos).

4.3.2 Alterações na quantidade de esplenócitos que apresentam marcador NK1.1+ com receptor $\alpha\beta$ +, na fase aguda (30 dias) da infecção.

A figura 6 mostra os dados quantitativos de células $\alpha\beta$ + com marcador NK1.1+ presentes no baço de camundongos dos diferentes grupos experimentais infectados e avaliados durante a fase aguda de infecção (30 dias).

Observamos que cerca de 5% do total das células que expressam o receptor $\alpha\beta$ +, apresentam o marcador NK1.1+ em animais C57Bl/6 normais. Comparativamente, animais μ MT possuem 18% de células $\alpha\beta$ +NK1.1+, sendo maior do que o grupo descrito. O tratamento dos animais μ MT com imunoglobulinas não causou alterações de células NK1.1+ dentro do compartimento de células $\alpha\beta$ + e a reconstituição com células B causou diminuição drástica desta mesma população.

A infecção não alterou as proporções de células do grupo C57Bl/6 infectado, comparado ao não infectado. Quanto ao grupo μ MT, a infecção aumentou a frequência de células $\alpha\beta$ + NK1.1+ ($p < 0,05$). A reconstituição com células B de animais μ MT infectados diminui o número de células $\alpha\beta$ +NK1.1+, comparado ao infectado não reconstituído. Este número é, entretanto maior que os C57Bl/6 infectados (B6I). O tratamento com Ig (μ MTI+Ig) aumenta o número de células $\alpha\beta$ +NK1.1 (em animais infectados ou não) quando comparados a animais μ MT infectados e reconstituídos com células B (μ MTI+B).

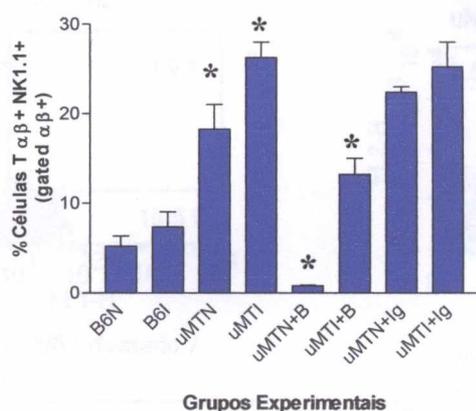


Figura 6. Efeito do tratamento *in vivo* de animais μ MT infectados, com imunoglobulina ou transferência adotiva de células B, durante a fase aguda: Na figura estão expressas os números relativos de células T $\alpha\beta^+$ com marcador NK1.1+, nos diferentes grupos experimentais: B6N, B6I, μ MTN, μ MTI, μ MTN+B, μ MTI+B, μ MTN+Ig, μ MTI+Ig. A barra no gráfico indica o desvio padrão. Foram utilizados 3 animais de cada grupo. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). μ MTN* : estatisticamente significativo em relação a B6N ; μ MTI* : em relação ao B6I ; μ MTN+B* : em relação ao μ MTN ; μ MTI+B* : em relação a μ MTI.

A exemplo do que ocorre na figura 6, observa-se na ilustração da figura 6.1 os padrões e intensidade de coloração dos marcadores $\alpha\beta^+$ e NK1.1+ sobre os esplenócitos. Verifica-se através dos gráficos obtidos por citometria de fluxo que o grupo experimental de camundongos μ MT normais apresenta quantidade elevada de NK1.1+ dentro da população total de células $\alpha\beta^+$, quando comparado ao grupo de animais C57Bl/6 normais (Figs. 6.1A e B). Sugere-se que após a infecção de animais C57Bl/6 e μ MT, ambos os grupos tendem a aumentar o número destas células comparado aos controles não infectados (Figs. 6.1C e D). O grupo de camundongos μ MT infectados e tratados com imunoglobulinas apresentou número semelhante ao seu controle infectado (Fig. 6.1E). Já a reconstituição com células B em animais μ MT infectados causou diminuição na freqüência de células $\alpha\beta^+$ NK1.1+, quando comparados aos controles μ MT infectados ($p < 0,05$) (Fig. 6.1F).

NK1.1

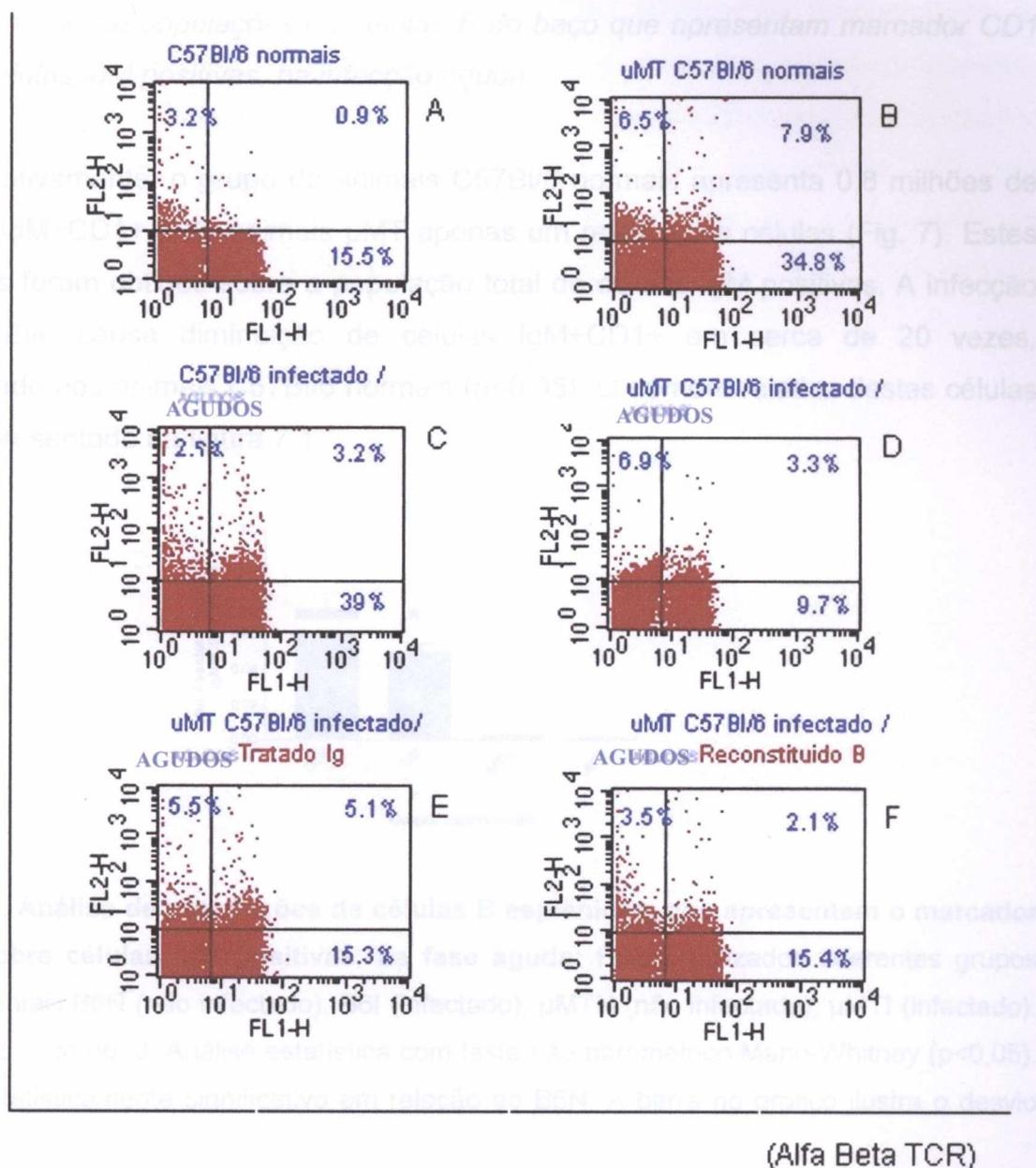


Figura 6.1. Análise dos esplenócitos por citometria de fluxo, evidenciando o marcador NK1.1+ e receptor $\alpha\beta$ + de linfócitos T, durante a infecção aguda: C57Bl/6 normais (A), μ MT normais (B), C57Bl/6 infectados (C), μ MT infectados (D), μ MT infectados e tratados com imunoglobulina (E) e μ MT infectados e reconstituídos com células B (F). Os marcadores de superfície utilizados foram $\alpha\beta$ + associado ao fluorocromo FITC (eixo X) e NK1.1+ ao fluorocromo PE (eixo Y). (Descrito em no tópico 13 de A até E em métodos).

5% (quadrante inferior/acima) são células NK1.1+ CD1+ nos animais C57Bl/6 normais (2x10⁶ células secundárias) no 13 de métodos, Fig. 1A). Da maneira similar, observa-se em B, C e D esta população celular nos diferentes grupos utilizados.

4.3.3 Análise de populações de células B do baço que apresentam marcador CD1 sobre células IgM positivas, na infecção aguda.

Comparativamente, o grupo de animais C57Bl/6 normais apresenta 0,8 milhões de células IgM+CD1+ e os animais μ MT apenas um residual de células (Fig. 7). Estes números foram obtidos sobre a população total de células IgM positivas. A infecção de C57Bl/6 causa diminuição de células IgM+CD1+ em cerca de 20 vezes, comparado aos animais C57Bl/6 normais ($p < 0,05$). O número relativo destas células está representado na figura 7.1.

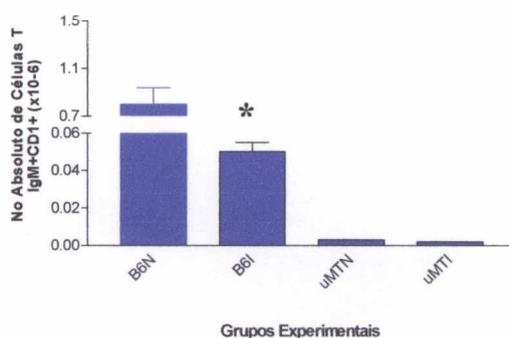


Figura 7. Análise de populações de células B esplênicas, que apresentam o marcador CD1+ sobre células IgM positivas, na fase aguda: Foram utilizados diferentes grupos experimentais: B6N (não infectado), B6I (infectado), μ MTN (não infectado), μ MTI (infectado). Animais por grupo: 3. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). B6I* : estatisticamente significativo em relação ao B6N. A barra no gráfico ilustra o desvio padrão.

4.3.3.1 Ilustração gráfica referente a marcadores CD1+ e IgM+ na fase aguda.

De modo a exemplificar os resultados da figura 7, a planilha de dados apresentada na figura 7.1 mostra o comportamento das células quanto ao padrão e intensidade de expressão dos marcadores de superfície celular CD1+ em células IgM positivas (A até D). De modo ilustrativo, os dados da figura 7.1, mostram que 29,5% (quadrante direito/acima) são células IgM+ CD1+ nos animais C57Bl/6 normais (“gate” em linfócitos segundo item 13 de métodos, Fig. 1A). De maneira similar, observa-se em B, C e D esta população celular nos diferentes grupos utilizados.

Os histogramas apresentados na figura 7.1 (E-H) ilustram as porcentagens de CD1+ sobre o total de linfócitos (como na Fig. 1A). De modo comparativo, observamos que os animais C57Bl/6 apresentam maior quantidade destas células do que os μ MT, mas que após a infecção este número é reduzido de 9,7% para 2,1% nos animais C57Bl/6 (Figs. 7.1E e F). Já os animais μ MT apresentam um residual de 1,9% e após a infecção este número é reduzido para 0,15% (figuras 7.1G e H).

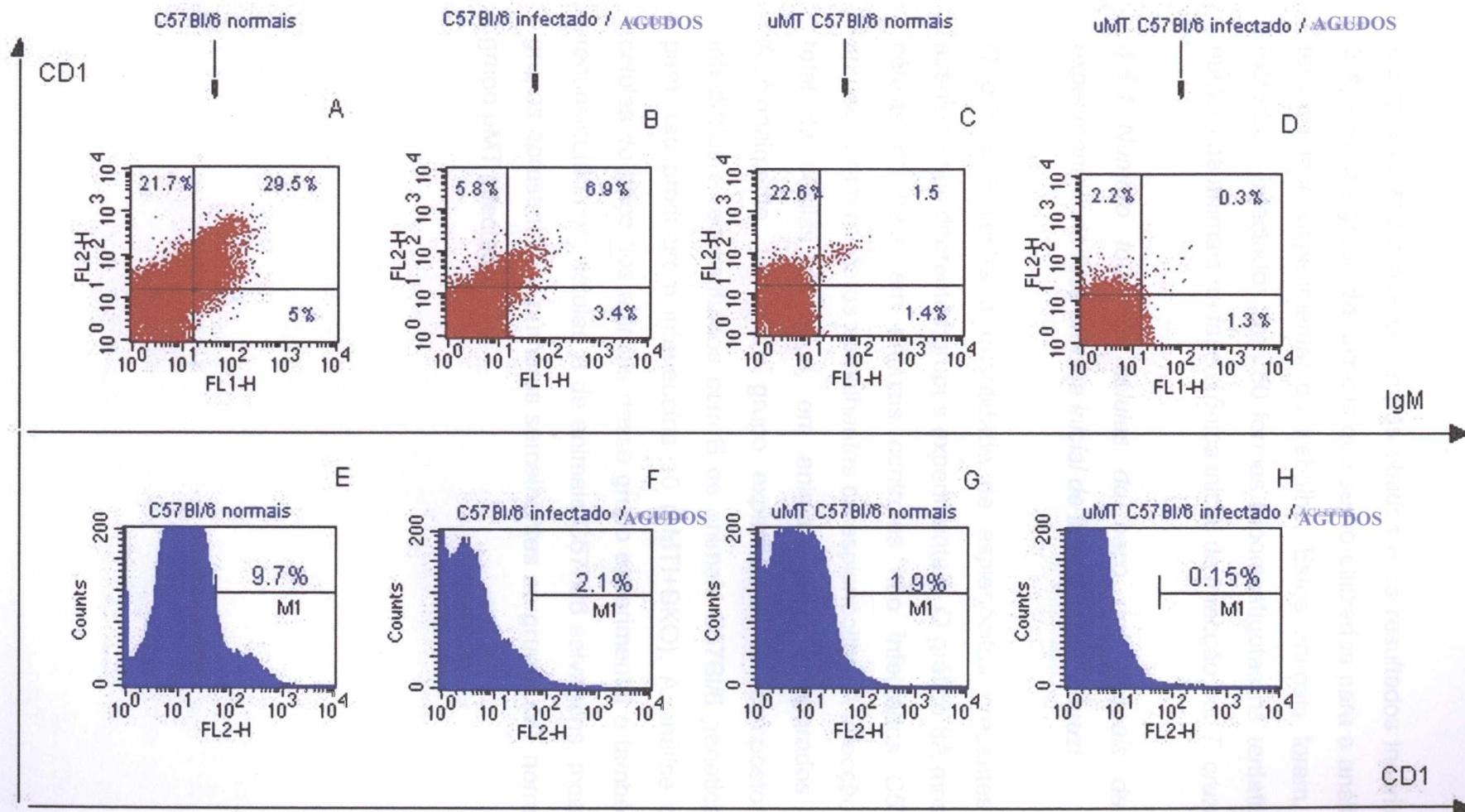


Figura 7.1. Análise dos marcadores CD1+ e IgM+ sobre esplenócitos por citometria de fluxo, em infecção aguda: C57Bl/6 normais (A), C57Bl/6 infectados (B), μ MT normais (C), μ MT infectados (D). Os marcadores de superfície utilizados foram IgM+ marcados com "cychrome" (eixo X) e CD1+ conjugado à ficoeritrina (eixo Y). Os histogramas são 6.1E, F, G e H (Como descrito em métodos, tópico 13 de A até E).

4.4 Celularidade do baço na fase crônica inicial de animais μ MTI reconstituídos com células B.

Cumprido ressaltar que os grupos obtidos e os resultados inseridos na figura 2(A) e 3(A) são dos grupos de animais que serão utilizados para a análise desta segunda e terceira fase experimental do trabalho. Estes animais foram, como descrito em métodos, infectados com 50 formas tripomastigotas na tentativa de obter o maior número de animais na fase crônica inicial de infecção por *T. cruzi*.

*4.4.1 Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase crônica inicial de infecção por *T. cruzi*.*

O gráfico 8 ilustra a quantidade de esplenócitos presentes no baço (número absoluto) nos diferentes grupos experimentais. O gráfico 8A mostra a quantidade de células do baço em animais controles não infectados C57Bl/6 e μ MT, que apresentaram números semelhantes de esplenócitos. A infecção aumenta o número total de células do baço, em animais μ MTI comparados a μ MT (Fig. 8B). Adicionalmente, um outro grupo experimental foi composto por animais μ MT infectados e reconstituídos com B de animais C57Bl/6 geneticamente modificados para não produzirem interleucina 10 (μ MTI+BKO). A análise do número total de células do baço dos animais desse grupo experimental e também do grupo que foi reconstituído com células B de animais C57Bl/6 selvagens, mostrou que estes dois grupos apresentaram números semelhantes ao grupo μ MT normal, e menor que do grupo μ MT infectado.

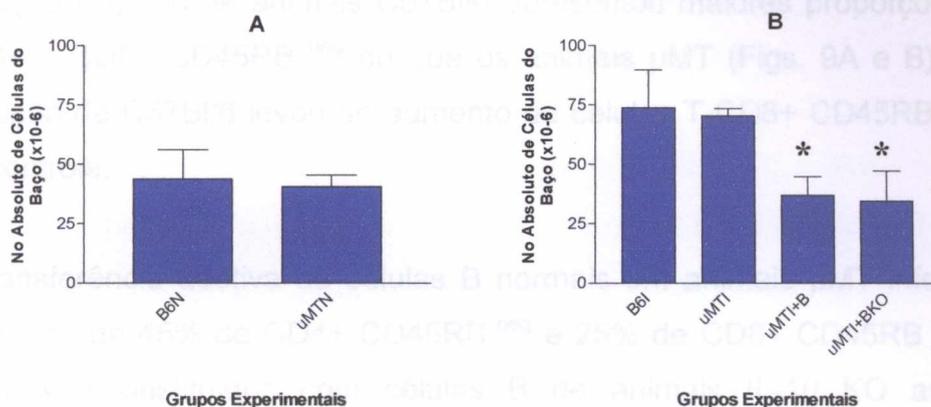


Figura 8. Número total das populações de células esplênicas, na fase crônica inicial. Nesta figura está representado o número total de células do baço de animais normais (A) e de infectados (B), dos diferentes grupos experimentais: B6N (não infectados), μMTN (não infectado), B6I (infectados), μMTI (infectado), μMTI+B e μMTI+BKO (infectado e recebeu transferência adotiva de células B de camundongos C57Bl/6 selvagens e de IL-10 KO, respectivamente, no mesmo dia da infecção). n=3 por grupo. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). μMTI+B* e μMTI+BKO* : estatisticamente significante em relação ao μMTI.

4.5 Análise dos marcadores de superfície celular dos linfócitos do baço de animais na fase crônica inicial (60 dias) da infecção.

4.5.1 Alterações quantitativas das populações de células T de baço em fase crônica inicial, e que não apresentam o marcador CD45RB.

Na figura 9, observamos as porcentagens de células T CD4⁺ e CD8⁺ com expressão negativa do marcador CD45RB obtidas dentro do total de cada população celular. (Obtenção descrita como obtido para figura 1 de A até E, em métodos). O grupo de animais C57Bl/6 não infectados apresenta cerca de 45% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 3% de CD8⁺ CD45RB^{neg} comparativamente o grupo μMT não infectado com cerca de 17% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 5% de CD8⁺ CD45RB^{neg}. Verificamos que os animais C57Bl/6 não infectados apresentam maiores proporções de células T CD4⁺ CD45RB^{neg} quando comparado ao animal μMT não infectados. Após a infecção os animais C57Bl/6 apresentaram 42% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 39% de CD8⁺ CD45RB^{neg}. Os animais μMT infectados apresentaram cerca de 15% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 21% de CD8⁺ CD45RB^{neg}. É importante ressaltar que após a

infecção o grupo de animais C57Bl/6 apresentou maiores proporções de células T CD4⁺ e CD8⁺ CD45RB^{neg} do que os animais μ MT (Figs. 9A e B). Além disso, a infecção de C57Bl/6 levou ao aumento de células T CD8⁺ CD45RB^{neg} comparado ao controle.

A transferência adotiva de células B normais em animais μ MT infectados resultou em cerca de 45% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 25% de CD8⁺ CD45RB^{neg}. Quanto aos animais reconstituídos com células B de animais IL-10 KO as porcentagens observadas foram de 40% de CD4⁺ CD45RB^{neg} e 23% de CD8⁺ CD45RB^{neg}. Observamos que as proporções de células T CD4⁺ CD45RB^{neg} aumentam após a reconstituição de animais μ MT infectados (Fig. 9A), até os níveis de animais C57Bl/6, mas não aumentam para a população de células T CD8⁺ CD45RB^{neg} (Fig. 9B). Do mesmo modo, a transferência de células B de animais IL-10 KO em animais μ MT causou aumento de células T CD4⁺ CD45RB^{neg}.

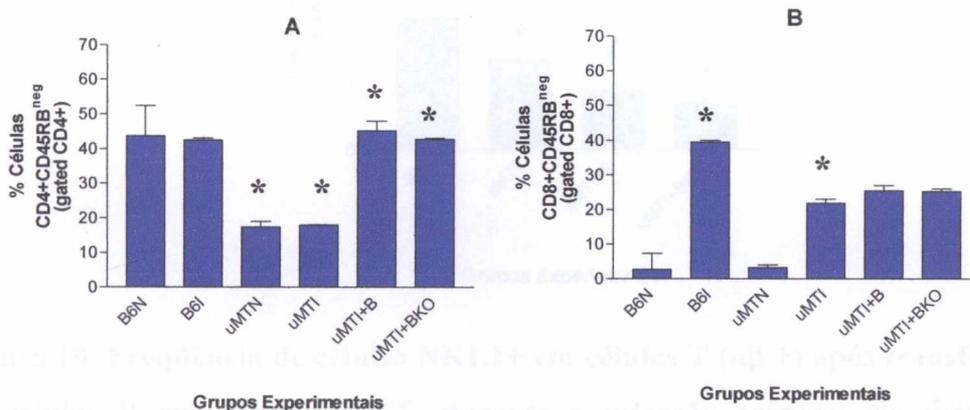


Figura 9. Análise de populações de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) esplênicas, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, na fase crônica: Nesta figura está representada os números relativos de células do baço de células T CD4⁺ CD45RB^{neg} (A) e CD8⁺ CD45RB^{neg} (B), dos diferentes grupos experimentais: B6N, B6I, μ MTN, μ MTI, μ MTI+B e μ MTI+BKO. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). $n = 3$ por grupo. Representativo de 2 experimentos. Para o gráfico 9A - μ MTN* : estatisticamente significativo em relação ao B6N ; μ MTI* : em relação ao B6I ; μ MTI+B* e μ MTI+BKO* : em relação ao μ MTI. Para o gráfico 9B - B6I* : em relação ao B6N ; μ MTI* : em relação ao μ MTN.

4.5.2 Alteração das proporções de células NK1.1+ $\alpha\beta$ positivas: diminuição de NK1.1+ no baço de animais μ MT, na fase crônica inicial.

O gráfico mostra a população total de células NK1.1 positivas sobre o total de células T $\alpha\beta$ +, na qual há 19% (C57Bl/6 infectados), 1,2% (μ MT infectados), 0,85% (μ MTI+B) e 0,62% (μ MTI+BKO) de células $\alpha\beta$ + com marcador NK1.1. As células $\alpha\beta$ + NK1.1+ estão portanto em proporções aumentada nos animais C57Bl/6 em relação aos μ MT infectados, nesta fase da infecção. Vale salientar que após a reconstituição dos grupos de animais μ MTI com células B, o número absoluto de células $\alpha\beta$ +NK1.1 aumenta em μ MTI de maneira significativa e chegam a se equiparar ao de C57Bl/6 (dados não mostrados).

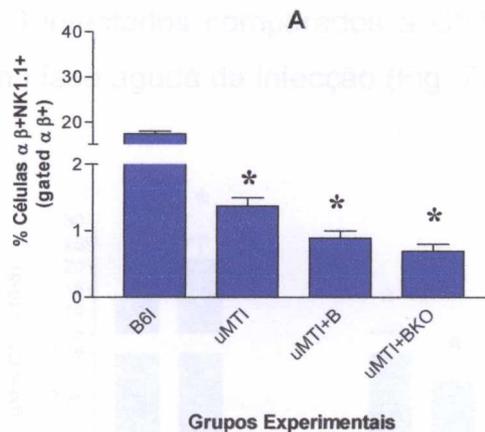


Figura 10. Frequência de células NK1.1+ em células T ($\alpha\beta$ +) após transferência adotiva de células B em animais μ MT, durante a infecção crônica: Na figura acima estão expressos os números relativos de células T $\alpha\beta$ + com marcador NK1.1+(A) dos diferentes grupos experimentais: B6I, μ MTI, μ MTI+B e μ MTI+BKO (transferidos com células B de C57Bl/6 IL-10KO). A barra indica o desvio padrão. Animais: n=3 por grupo. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Representativo de 2 experimentos. μ MTI* : estatisticamente significativo em relação ao B6I ; μ MTI+B* e μ MTI+BKO* : em relação ao μ MTI.

4.5.3 Quantificação das populações de células B do baço que apresentam marcador IgM+ e CD1+, aos 60 dias da infecção.

Sugere-se que o número absoluto de células CD1+IgM+ tende a aumentar nos animais C57Bl/6, após 60 dias de infecção (Fig. 11). Adicionalmente, como era esperado, os animais μ MT não apresentaram números consideráveis de CD1+ sobre células B, pois não apresentam esta última população. No entanto, quando esses animais são submetidos à transferência de células B de animais C57Bl/6 selvagens ou C57Bl/6 IL-10 KO, podemos constatar o aumento desta população celular (Fig. 11). Ainda assim, o nível numérico de células expressando esse marcador nos animais reconstituídos se apresenta menor quando comparado aos C57Bl/6 não infectados e infectados (Fig. 11). Nesta fase da infecção não há redução de células IgM+CD1+ em C57Bl/6 infectados comparados a C57Bl/6 normais. Este resultado difere daquele obtido na fase aguda da infecção (Fig. 7).

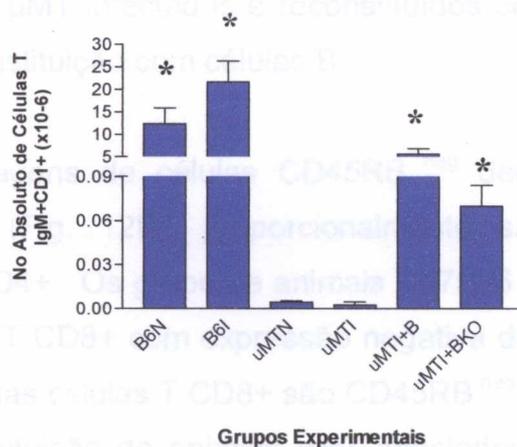


Figura 11. Análise de populações de células B esplênicas, que apresentam o marcador CD1+ sobre células IgM+, na fase crônica. Foram utilizados diferentes grupos experimentais: B6N, B6I, μ MTN, μ MTI, μ MTI+B e μ MTI+BKO. A barra ilustra o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). $n = 3$ por grupo. B6N* : estatisticamente significativo em relação ao grupo μ MTN ; B6I* : em relação ao grupo μ MTI ; μ MTI+B* e μ MTI+BKO* : em relação ao grupo μ MTI.

A partir dos resultados aqui descritos para as populações linfocitárias periféricas, procederemos à análise dos infiltrados inflamatórios do ponto de vista qualitativo e

quantitativo, e das células que migram para os tecidos (como por exemplo, músculo esquelético) no modelo experimental aqui descrito.

4.6 Análise de marcadores de superfície presentes nas células mononucleares do músculo esquelético de animais na fase crônica inicial da infecção.

4.6.1 Alterações quantitativas das populações de células T encontradas no músculo esquelético que não apresentam o marcador de memória imunológica CD45RB.

Nos gráficos que se seguem, são apresentadas as porcentagens do marcador CD45RB^{neg} dentro da população total de células T CD4+ ou CD8+ (Fig. 12). Quanto às células T CD4+ CD45RB^{neg} (Fig. 12A), podemos observar que os animais C57Bl/6 infectados apresentaram cerca de 92% de células ativadas no músculo esquelético. Nos animais μ MT infectados os números chegam a 81%. Os números de células T CD4+ CD45RB^{neg} tendem a aumentar, quando são observadas as células nos animais μ MT infectados e reconstituídos com células BKO e tendem a diminuir com a reconstituição com células B.

Quanto às porcentagens de células CD45RB^{neg} dentro da população total de linfócitos T CD8+ (Fig. 12B), proporcionalmente são a metade dos valores encontrados para CD4+ . Os grupo de animais C57Bl/6 infectados apresentou cerca de 50% das células T CD8+ com expressão negativa do marcador CD45RB^{neg}. Em contrapartida, 24% das células T CD8+ são CD45RB^{neg} nos animais μ MT infectados ($p < 0,05$). A reconstituição de animais μ MT infectados com células B de animais C57Bl/6 IL-10 KO resultou em aumento de linfócitos T CD8+ CD45RB^{neg} (o que os aproxima dos números descritos para o grupo C57Bl/6 infectados), comparado ao grupo μ MTI ($p < 0,05$).

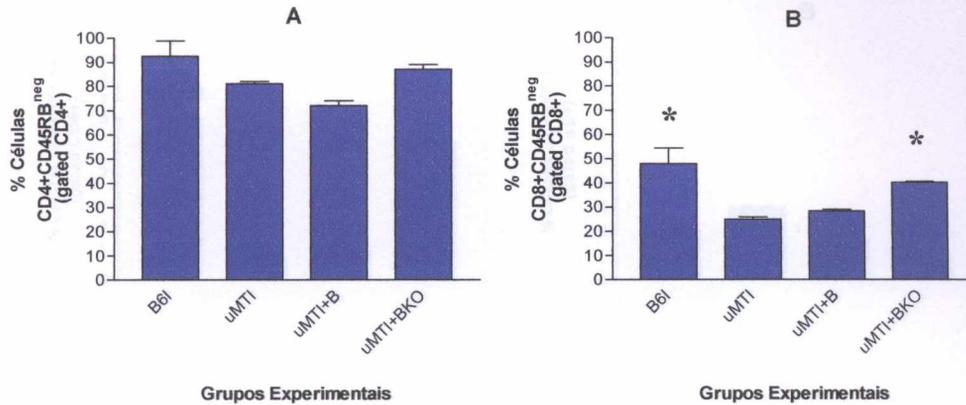


Figura 12. Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) no músculo esquelético, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, na fase crônica: Nesta figura estão representadas as porcentagens de células T CD4+ CD45RB^{neg} e CD8+ CD45RB^{neg}, obtidas segundo descrição na metodologia: B6I (infectados), μMTI (infectados), μMTI+B e μMTI+BKO (infectados e que receberam transferência adotiva de células B de camundongos C57Bl/6 selvagens e de IL-10 KO, respectivamente, no mesmo dia da infecção). n=3 por grupo. A barra indica o desvio padrão dos dados obtidos. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney (p<0,05). B6I* : estatisticamente significativo em relação ao grupo μMTI ; μMTI+BKO* : em relação ao grupo μMTI.

4.6.1 Gráfico de NK1.1+ sobre as células T CD4+ e αβ+

4.6.2 Análise das populações de células NK1.1 positivas presentes no músculo esquelético, durante a fase crônica inicial da infecção por *T. cruzi*.

estão exemplificados nos gráficos que identificam os marcadores de superfície citados. O gráfico 13 representa o número de células CD4+NK1.1+ e αβ+NK1.1+ do infiltrado inflamatório do músculo esquelético em diferentes grupos experimentais na fase crônica inicial da infecção. No gráfico 13A observamos que os animais C57Bl/6 apresentam porcentagens próximas a 7,6% de células CD4+NK1.1, enquanto que os animais μMTI 0,4%. A reconstituição com células B de animais C57Bl/6 normais e IL-10 KO, resultou porcentagens próximas a 0,5% e 2,5% respectivamente. No gráfico 13B observa-se que os animais C57Bl/6 apresentam 2% de células αβ+NK1.1, enquanto que os animais μMTI apresentam 3%, e os reconstituídos com células B de animais normais e IL-10 KO, 1,5% e 1% respectivamente.

o μMTI (Figs. 13.1E e F). A reconstituição desses animais com células B de IL-10 KO aumenta a NK1.1+ comparado ao não reconstituído (Figs. 13.1E e F).

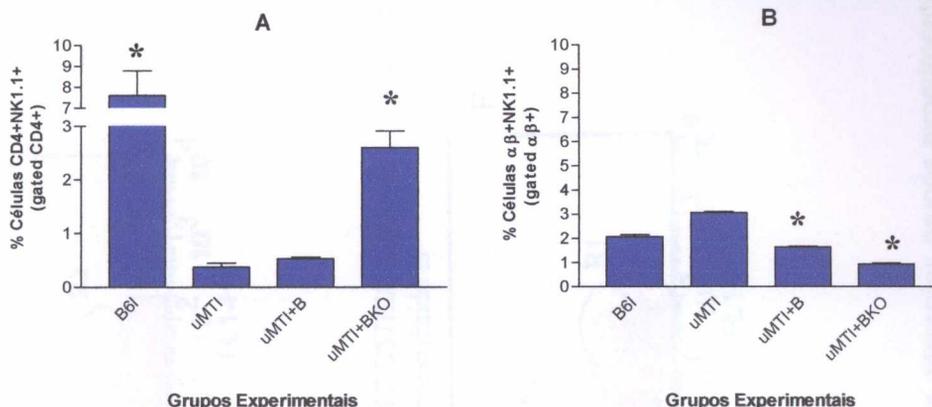
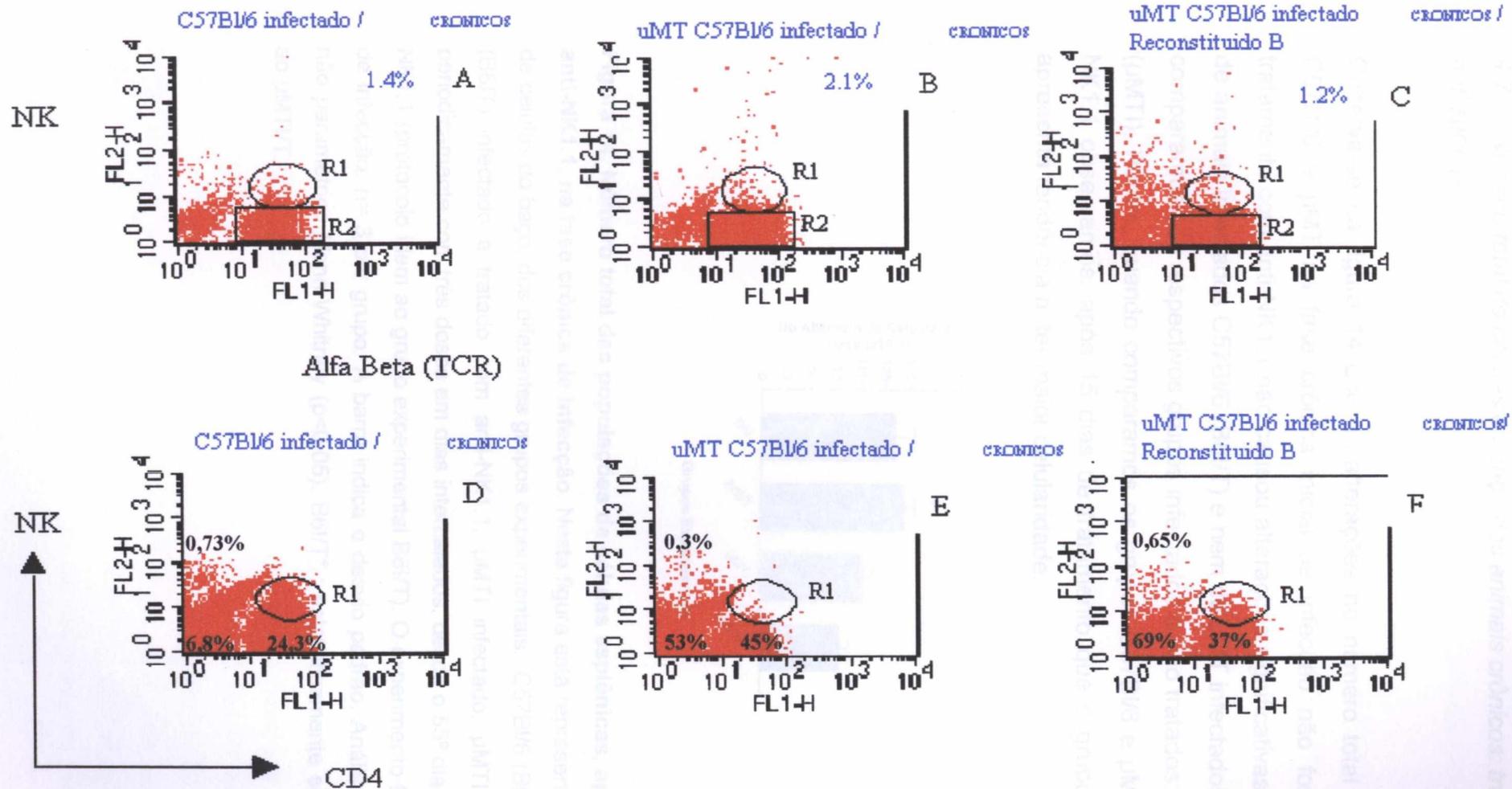


Figura 13. Análise de populações de células T CD4+ (A) e $\alpha\beta$ + (B), que apresentam o marcador NK1.1+, no músculo esquelético (60 dias): Nesta figura está representada a percentagem de células NK1.1+ dentro das populações totais de células CD4+ e $\alpha\beta$ +, dos diferentes grupos experimentais: B6I, μ MTI, μ MTI+B e μ MTI+BKO. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico $n=3$ por grupo. Mann-Whitney ($p<0,05$). Representativo de 2 experimentos. Para o gráfico 13A - B6I* : estatisticamente significativo em relação ao grupo μ MTI ; μ MTI+BKO* : em relação ao grupo μ MTI. Para o gráfico 13B - μ MTI+B* e μ MTI+BKO* : em relação a μ MTI.

4.6.2.1 Gráfico de NK1.1+ sobre as células T CD4+ e $\alpha\beta$ +

Corroborando os dados observados nos gráficos das figuras 13A e B, na figura 13.1 estão evidenciados os gráficos que identificam os marcadores de superfície citados na figura 13 (anterior). Nesses gráficos estão expressos os padrões de intensidade de coloração do marcador NK1.1 sobre células $\alpha\beta$ +. Inicialmente podemos verificar nas figuras 13.1A e B que os animais C57Bl/6 e μ MT na fase crônica de infecção apresentam quantidade semelhante de células $\alpha\beta$ + com marcador NK1.1+. A reconstituição do grupo de animais μ MTI mostra tendência a diminuição destas células no músculo esquelético desses animais (Figs. 13.1C comparado a 13.1D).

Em relação às células T CD4+ NK1.1+, verifica-se maior número dessas células no músculo esquelético de animais C57Bl/6 (Fig. 13.1D), comparado ao μ MT (Figs. 13.1E). A reconstituição desses animais com células B de IL-10 KO aumenta a NK1.1+ comparado ao não reconstituído (Figs. 13.1E e F).



Nesta figura estão representadas as células NK1.1+ sobre a população total de células CD4+ e $\alpha\beta$ +, dos diferentes grupos experimentais: C57Bl/6 infectado (A e D), μ MT C57Bl/6 infectado (B e E), μ MT C57Bl/6 infectado e reconstituído com células B (C e F). (Descrito em métodos, seção 13 de A até E). Nos gráficos de D a F está representada a região de células CD4+ NK1.1+, demarcada no gráfico através de R1.

4.7 Número total de células do baço dos animais crônicos: tratados (ou não) com anti NK1.1+.

Observa-se na figura 14 que as alterações no número total do baço de animais C57Bl/6 e μ MT na fase crônica inicial de infecção não foram significativas. O tratamento com anti-NK1.1 não causou alterações significativas no tamanho do baço de animais infectados C57Bl/6 (B6I/T) e nem de μ MT infectados (μ MTI/T) quando os comparamos aos respectivos grupos infectados e não tratados: C57Bl/6 (B6I) e μ MT (μ MTI). Porém, quando comparamos os grupos C57Bl/6 e μ MT tratados com anti-NK1.1 observamos, após 15 dias de tratamento que o grupo de C57Bl/6 tratado apresenta tendência a ter maior celularidade.

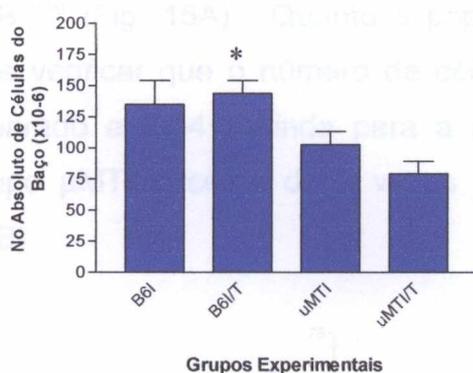


Figura 14. Número total das populações de células esplênicas, após o tratamento com anti-NK1.1, na fase crônica de infecção. Nesta figura está representada os números totais de células do baço, dos diferentes grupos experimentais: C57Bl/6 (B6I) infectado e C57Bl/6 (B6I/T) infectado e tratado com anti-NK1.1, μ MTI infectado, μ MTIT infectado e tratado periodicamente com três doses em dias intercalados, desde o 55º dia de infecção, com anti-NK1.1 (protocolo idem ao grupo experimental B6I/T). O experimento foi realizado no 70º dia de infecção. n= 3 por grupo. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). B6I/T* : estatisticamente significativo em relação ao μ MTI/T.

dos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Início do tratamento no 55º dia de infecção, em três doses (400 μ g/dia/animal) em dias intercalados e finalizando o procedimento experimental no 70º dia de infecção. As barras indicam o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Animais n=3 por grupo. μ MTI/T* : estatisticamente significativo em relação ao grupo μ MTI. μ MTI+ em relação aos demais grupos do mesmo gráfico.

4.8 Efeito da depleção de células NK1.1+ quanto aos marcadores de superfície celular nos linfócitos do baço, durante a fase crônica inicial (70 dias).

4.8.1 Alterações quantitativas das populações de esplenócitos que apresenta baixa ou ausência da expressão de CD45RB, na fase crônica inicial.

Podemos observar na figura 15, porcentagens de células T CD4+ (Fig. 15A) e CD8+ (Fig. 15B) indicando células esplênicas CD45RB^{neg} dos diferentes grupos experimentais, em fase de infecção crônica inicial. Nesta terceira fase experimental do trabalho pode-se considerar que o tratamento com anti NK1.1+ em μ MT infectados causou diminuição de células T CD8+ CD45RB^{neg} (Fig. 15B). O tratamento de C57Bl/6 com anti NK1.1, parece não revelar diferenças no número de células CD4+ CD45RB^{neg} (Fig. 15A). Quanto à população de linfócitos T CD8+ CD45RB^{neg}, podemos verificar que o número de células é menor, para todos os grupos, quando comparado a CD4+. Ainda para a população de células CD8+, observa-se que o grupo μ MTI é cerca de 2 vezes maior que os outros grupos experimentais (Fig. 15B).

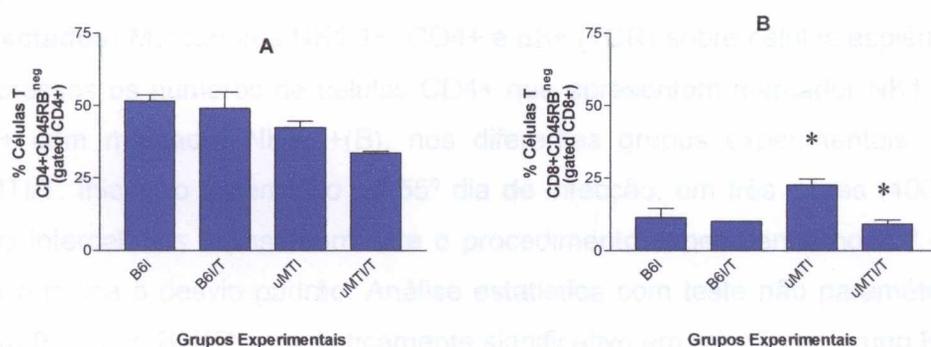


Figura 15. Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) esplênicas, que apresentam o marcador CD45RB^{neg}, após o tratamento com anti-NK1.1+, na infecção crônica inicial: Nesta figura esta representada a percentagem de células T CD4+ CD45RB^{neg} e CD8+ CD45RB^{neg}, dos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Início do tratamento no 55º dia de infecção, em três doses (400 μ g/dia/animal) em dias intercalados e posteriormente o procedimento experimental no 70º dia de infecção. As barras indicam o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Animais: $n = 3$ por grupo. μ MTI/T* : estatisticamente significativo em relação ao grupo μ MTI ; μ MTI+ : em relação aos demais grupos do mesmo gráfico.

4.8.2 Alterações na quantidade de esplenócitos que apresentam marcadores CD4+ NK1.1+ e/ou receptor $\alpha\beta$ + NK1.1+ após tratamento com anti NK1.1.

Na figura 16 observamos as porcentagens de células NK1.1+ sobre as populações totais de CD4+ e $\alpha\beta$ +. Verificamos que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, quanto as porcentagens de células T CD4+NK1.1. Porém, no gráfico 16B, podemos observar que quando os animais C57BI/6 infectados foram tratados com anti-NK1.1+, ocorreu uma diminuição de linfócitos T $\alpha\beta$ + NK1.1+ (observado 15 dias após a depleção).

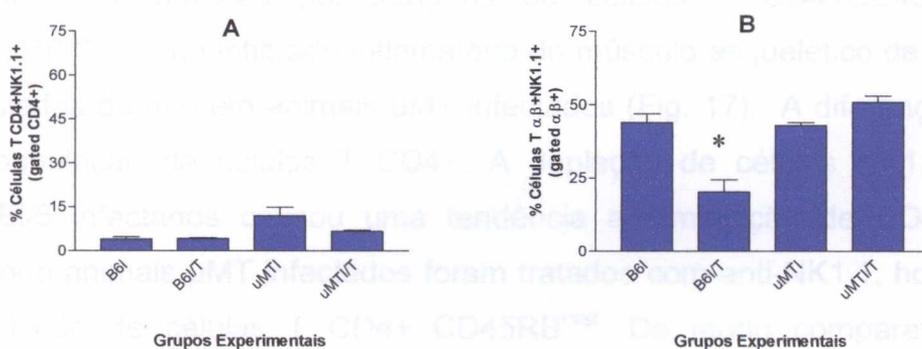


Figura 16. Efeito do tratamento *in vivo* com anti NK1.1+ em animais μ MT e C57BI/6 infectados: Marcadores NK1.1+, CD4+ e $\alpha\beta$ + (TCR) sobre células esplênicas. Acima estão expressos os números de células CD4+ que apresentam marcador NK1.1+ (A) e células T $\alpha\beta$ + com marcador NK1.1+(B), nos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Início do tratamento no 55º dia de infecção, em três doses (400 μ g/dia/animal) em dias intercalados e posteriormente o procedimento experimental no 70º dia de infecção. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). $n = 3$. B6I/T* : estatisticamente significativo em relação ao grupo B6I.

Figura 17. Análise da população de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) presentes no infiltrado inflamatório do músculo esquelético e que apresentam o marcador CD45RB^{int}, durante a fase crônica inicial. Nesta figura está representada as porcentagens de células que apresentam marcador CD45RB^{int} dentro da população total de células T CD4+ (A) ou CD8+ (B) dos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Os animais foram tratados com 3 doses intercaladas de anticorpo monoclonal

4.9 *Análise dos marcadores de superfície celular de linfócitos T do infiltrado inflamatório do músculo esquelético de animais tratados ou não com anti NK1.1, durante a fase crônica inicial.*

4.9.1 *Alterações quantitativas das populações de células T CD4+ e CD8+ encontradas no músculo esquelético e que apresentam baixa ou ausência da expressão do marcador CD45RB.*

Obtivemos, semelhantemente aos dados adquiridos na segunda fase experimental do trabalho, maiores porcentagens de células T CD4+CD45RB^{neg} e CD8+CD45RB^{baixo/neg} no infiltrado inflamatório do músculo esquelético de animais C57Bl/6 infectados do que em animais μ MT infectados (Fig. 17). A diferença citada é maior na população de células T CD4+. A depleção de células NK1.1+ nos animais C57Bl/6 infectados causou uma tendência a diminuição de CD4+ CD45RB^{neg}. Quando animais μ MT infectados foram tratados com anti-NK1.1, houve aumento da população de células T CD4+ CD45RB^{neg}. De modo comparativo, os animais C57Bl/6 infectados e tratados com anti-NK1.1, não apresentaram alteração na população de células T CD8+ CD45RB^{baixo/neg} no infiltrado inflamatório, enquanto que houve aumento das proporções dessas células quando animais μ MT infectados foram submetidos a depleção de NK1.1+.

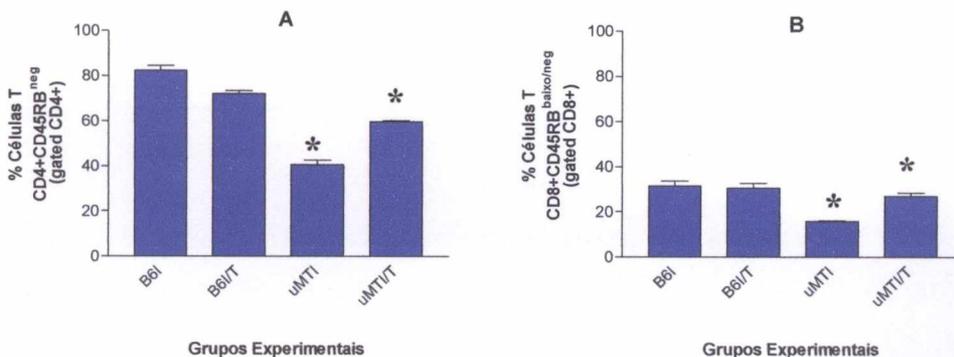


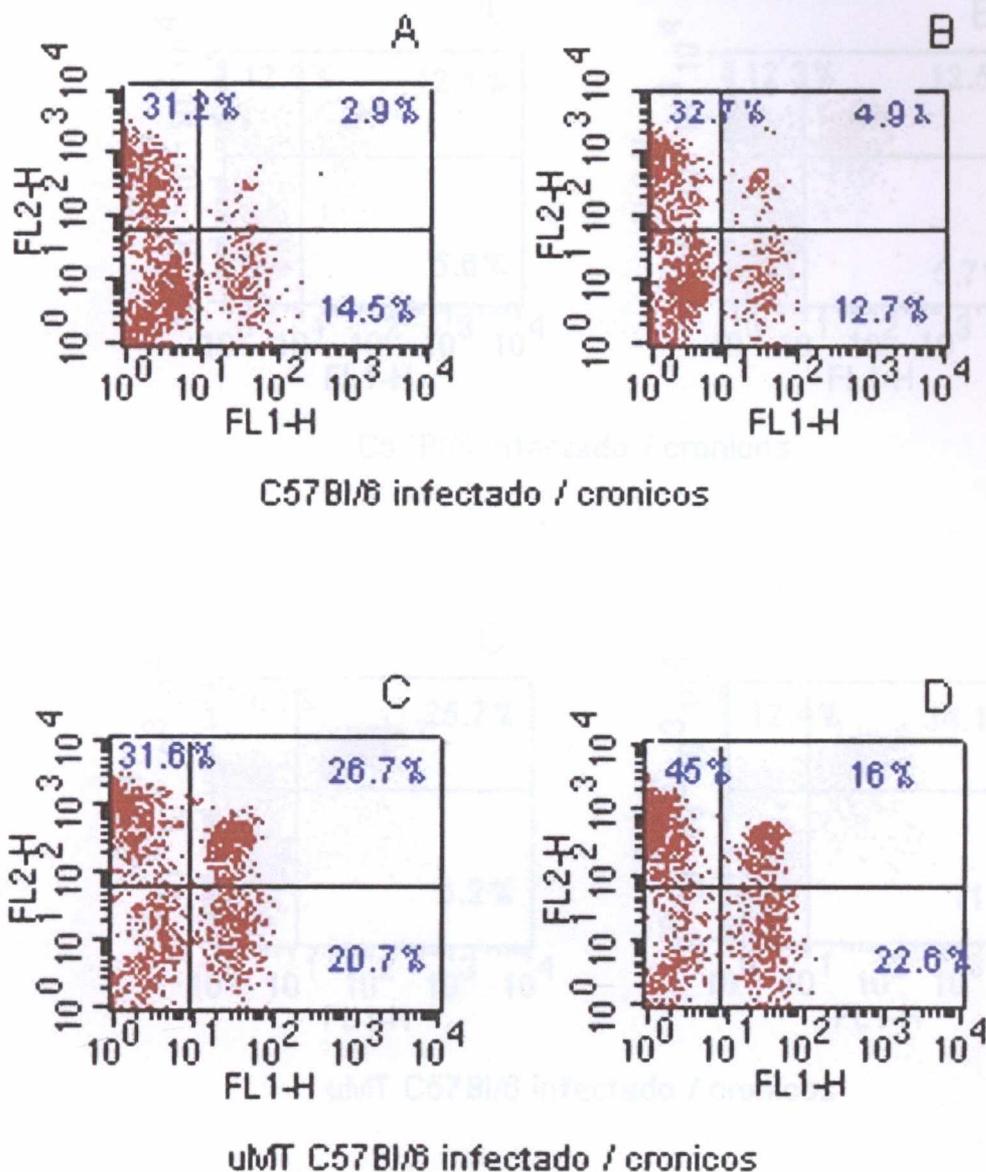
Figura 17. Análise de populações de células T CD4+ (A) e CD8+ (B) presentes no infiltrado inflamatório do músculo esquelético e que apresentam o marcador CD45RB^{baixo/neg}, durante a fase crônica inicial. Nesta figura esta representada as porcentagens de células que apresentam marcador CD45RB^{baixo/neg} dentro da população total de células T CD4+(A) ou CD8+ (B) dos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Os animais foram tratados com 3 doses intercalados de anticorpo monoclonal

anti-NK1.1 (400 μ g) a partir do 55^o dia de infecção e analisados no 70^o dia. A barra indica o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). $n=4$ por grupo. Para o gráfico 17A e B - μ MTI* : estatisticamente significativo em relação ao grupo B6I ; μ MTI/T* : em relação ao μ MTI.

4.9.1.1 *Representações gráficas de linfócitos T do músculo esquelético com CD45RB^{baixo/neg} na fase crônica inicial.*

De maneira a exemplificar os resultados obtidos e expressos no gráfico 17, estão ilustrados nas figuras 17.1 e 17.2 a intensidade de coloração de CD45RB^{baixo/neg} em células T CD4+ e CD8+, respectivamente. Na figura 17.1A e B observamos maior frequência de células CD45RB^{neg} sobre a população total de linfócitos T CD4+ em animais C57Bl/6, quando comparado aos animais μ MT. Os números expressos exemplificam os encontrados na figura 17.

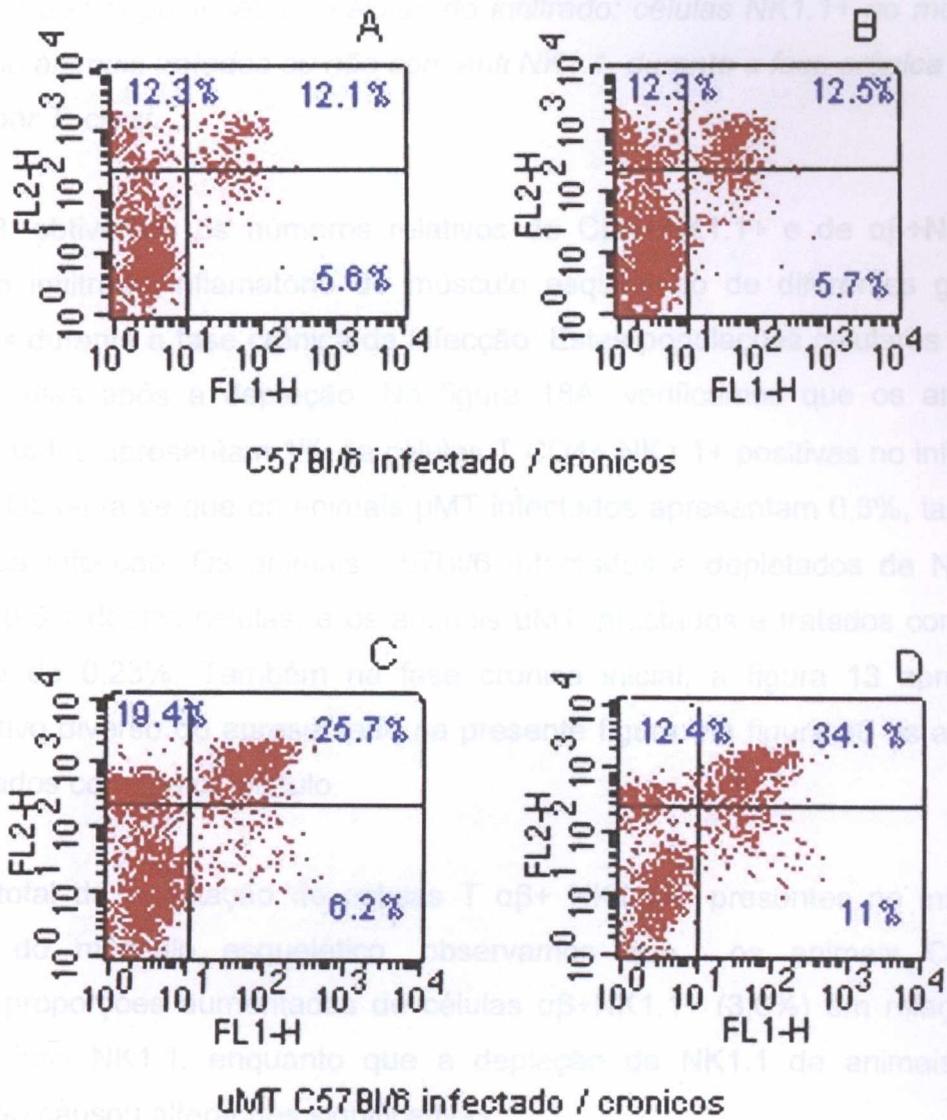
CD45RB



CD4

Figura 17.1. Análise por Citometria de fluxo de células do infiltrado inflamatório presente no músculo esquelético de animais na fase crônica de infecção: A figura A representa células mononucleares de animais C57Bl/6 infectados. Os outros grupos são: C57Bl/6 infectados e tratados com anti-NK1.1(B) (tratado com 3 doses de 500 μ g em dias intercalados), μ MT infectados (C), e μ MT infectado e tratado com anti-NK1.1(D) (protocolo idem ao de C57Bl/6 tratados). Os grupos animais foram constituídos por 4 animais. (Descrito no item 13 de A até E em métodos).

CD45RB



CD4

Figura 17.2. Citometria de fluxo das células do infiltrado inflamatório do músculo esquelético de camundongos C57Bl/6 e μ MT infectados tratados ou não com anti-NK1.1+. Na figura A esta representada células CD8+CD45RB^{baixo/neg} de animais C57Bl/6 infectados. Os outros grupos são: C57Bl/6 infectados e tratados com anti-NK1.1(B) (tratado com 3 doses de 500 μ g em dias intercalados), μ MT infectados (C), e μ MT infectado e tratado com anti-NK1.1(D) (protocolo idem ao de C57Bl/6 tratados). Os grupos animais foram constituídos por 4 animais. (Descrito no item 13 de A até E em métodos). Nesta figura

4.9.2 Análise das populações de células do infiltrado: células NK1.1+ no músculo esquelético de animais tratados ou não com anti NK1.1, durante a fase crônica inicial da infecção por *T. cruzi*.

Na figura 18, obtivemos os números relativos de CD4+NK1.1+ e de $\alpha\beta$ +NK1.1+ presentes no infiltrado inflamatório do músculo esquelético de diferentes grupos experimentais durante a fase crônica da infecção. Estas populações celulares foram avaliadas 15 dias após a depleção. Na figura 18A, verificamos que os animais C57Bl/6 infectados apresentam 1% de células T CD4+ NK1.1+ positivas no infiltrado inflamatório. Observa-se que os animais μ MT infectados apresentam 0,3%, também nesta fase da infecção. Os animais C57Bl/6 infectados e depletados de NK1.1+ apresentam 0,5% destas células, e os animais μ MT infectados e tratados com anti-NK1.1 cerca de 0,23%. Também na fase crônica inicial, a figura 13 apresenta número relativo diverso do apresentado na presente figura: na figura 13 os animais foram infectados com maior inóculo.

Quanto ao total da população de células T $\alpha\beta$ + NK1.1+ presentes no infiltrado inflamatório do músculo esquelético, observamos que os animais C57Bl/6 apresentam proporções aumentadas de células $\alpha\beta$ +NK1.1+ (3,6%) em relação ao tratado com anti NK1.1, enquanto que a depleção de NK1.1 de animais μ MT infectados não causou alterações significativas.

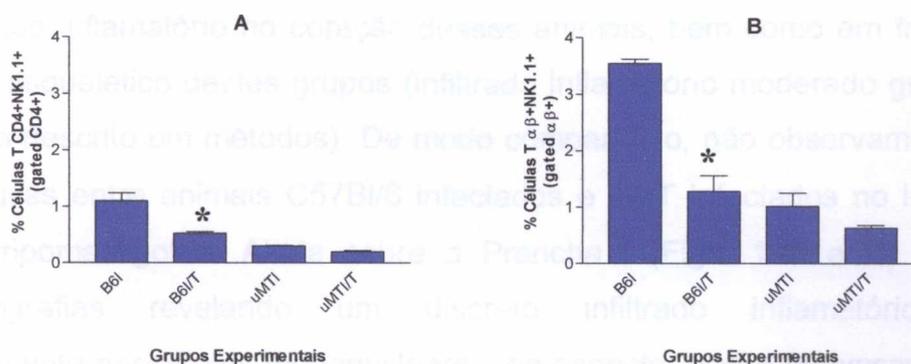


Figura 18. Populações de células T CD4+ (A) e $\alpha\beta$ + (B), que apresentam o marcador NK1.1+, presentes no músculo esquelético na fase crônica de infecção. Nesta figura estão representadas as porcentagens de células que apresentam marcador NK1.1+ dentro da população total de células T CD4+ ou $\alpha\beta$ + (figura 17A e B), dos diferentes grupos experimentais: B6I, B6I/T, μ MTI, μ MTI/T. Início do tratamento no 55º dia de infecção, em três

doses (400µg/dia/animal) em dias intercalados. O procedimento experimental foi realizado no 70º dia pós-infecção. A barra representa o desvio padrão. Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Animais: $n=4$ por grupo. Para o gráfico 18A - B6I/T* : estatisticamente significativo em relação ao grupo B6I.

4.10 Avaliação da resposta inflamatória no músculo em animais tratados com anti-NK1.1+ durante a fase crônica inicial: histopatologia

4.10.1 Alterações de aspectos microscópicos do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular de animais µMT infectados e tratados ou não com anti-NK1.1+.

Neste tópico (Prancha I - figura 19) são mostradas fotomicrografias de cortes do músculo cardíaco (Figs. 19A) e estriado (Figs. 19B até D) aos 60 dias de infecção. Durante a fase crônica inicial, foi observada baixa intensidade de infiltrado inflamatório no coração de animais µMT infectados e nos controles C57Bl/6 infectados (ilustração 19A exemplifica os infiltrados avaliados. Vale salientar que os animais foram infectados com baixo inóculo de *T. cruzi* (50 formas). Ainda em fragmentos do coração, foram observados raros e pequenos focos de infiltrados de células mononucleares evidentes em todos os grupos experimentais infectados. Para exemplificar o tipo de infiltrado encontrado nos animais infectados, indicamos o corte do coração de µMT (Fig. 19A). Nestas condições, quando os animais µMT foram comparados com os C57Bl/6 não foram evidenciadas diferenças quantitativas de infiltrado inflamatório no coração desses animais, bem como em fragmentos do músculo esquelético destes grupos (infiltrado inflamatório moderado graduado em -/+ : como descrito em métodos). De modo comparativo, não observamos diferenças significativas entre animais C57Bl/6 infectados e µMT infectados no inóculo de 50 formas tripomastigotas. Ainda sobre a Prancha I (Figs. 19B a D) observam-se fotomicrografias revelando um discreto infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares, de aspecto focal e perivascular. Em vista disso, a figura 19B comparada à figura 19D mostra claramente que no caso destes últimos (µMT tratados com anti-NK1.1) houve maior infiltrado inflamatório de células mononucleares, de modo difuso e perivascular (graduação definida em métodos, respectivamente -/+ e +). Pode-se assim inferir que o tratamento com anti-NK1.1 dos camundongos µMTI infectados intensificou a resposta inflamatória. Outro aspecto

histopatológico relevante é a presença de processo de regeneração do tecido muscular esquelético no grupo μ MTI tratado com anti NK1.1. (Fig. 19C). Na figura 19C, a seta indica os núcleos dos miócitos em processo de divisão (seta indicativa).

PRANCHA I

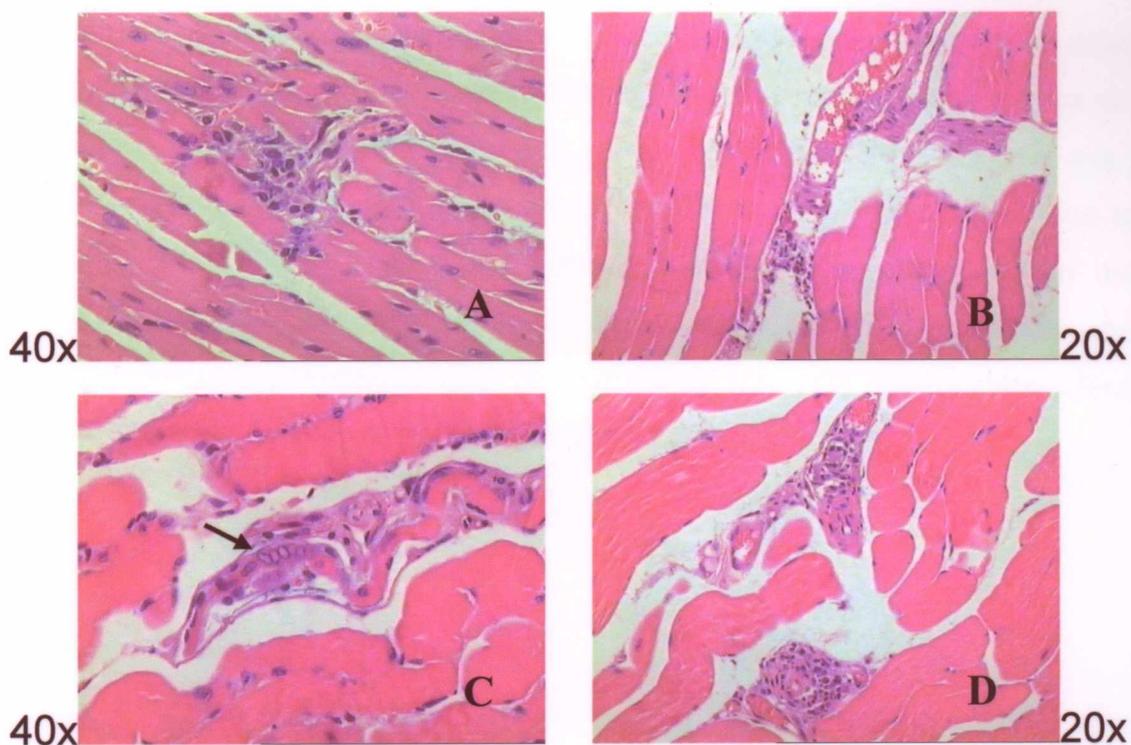


Figura 19. Fotomicrografia de cortes histopatológicos do tecido cardíaco (A) e muscular esquelético (B a D) de camundongos C57Bl/6 e μ MT durante a fase crônica inicial de infecção por *T. cruzi*, corados com H.E.: A secção histopatológica da foto A é do coração de animal μ MT (μ MTI) infectado. A fotomicrografia B é de camundongos μ MTI em aumento de 20x. As secções C (40x) e D (20x) são de animais μ MTI tratados com anti-NK1.1. Os grupos experimentais tinham um número de 4 camundongos cada. Seta indicativa na Secção C: divisão de núcleos dos miócitos de fibra muscular destruída.

4.11 Dosagem da produção de TNF- α no baço (ELISA) e detecção da expressão desta citocina no tecido muscular esquelético (Imunohistoquímica).

4.11.1 Secreção de TNF- α *in vitro* em células de baço de animais μ MT infectados.

Na figura 20, observam-se as dosagens *in vitro* de TNF- α secretado pelas células do baço dos diferentes grupos experimentais. Verificamos que os esplenócitos de camundongos μ MT não infectados secretaram níveis de TNF- α maiores que os de C57Bl/6 não infectados, expressos em pg/ml. Da mesma maneira, 30 dias após a infecção, as células do baço de animais μ MT também apresentaram maiores proporções de TNF- α , quando comparados aos C57Bl/6. No entanto, quando comparamos μ MT infectados com os não infectados, não observamos diferenças. Fato semelhante foi visto entre os animais C57Bl/6 (B6I e B6N).

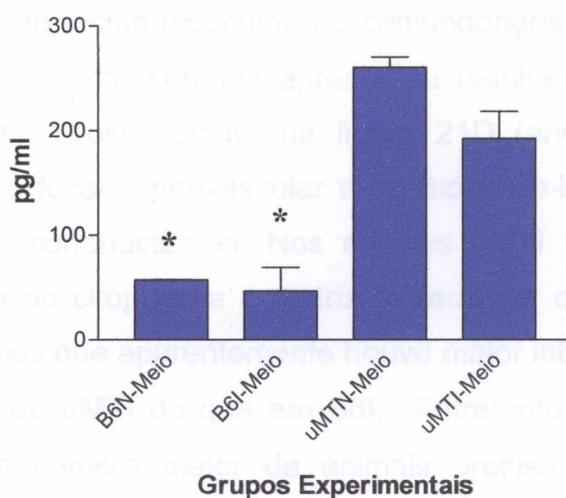


Figura 20. Secreção de TNF- α por esplenócitos de animais infectados ou não. Células do baço foram obtidas de camundongos C57Bl/6 e μ MT infectados ou não, como descrito em Material e Métodos, utilizando-se três animais por grupo experimental. As células foram cultivadas (10×10^6 células por poço) em duplicatas, na ausência de estímulo (Meio = M). A barra representa o desvio padrão. O sobrenadante foi coletado após 48 horas e a produção de TNF- α foi determinada por método imunoenzimático (ELISA). Análise estatística com teste não paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$). Animais: $n=2$ por grupo. B6N-Meio* e B6I-Meio* : estatisticamente significativo em relação aos grupos μ MT.

4.11.2 *Análise imunohistoquímica para TNF- α nos cortes histológicos do músculo esquelético dos diferentes grupos experimentais.*

Na figura 21 observamos as secções de músculo esquelético criopreservado de camundongos B6I e μ MTI com marcação específica para TNF- α , através do método de imunohistoquímica (descrito em material e métodos).

Comparativamente, na figura 21A e B observamos a coloração das células de linhagem macrófaga J774 estimuladas em cultura com LPS (B) ou não estimuladas (A). Em 20A (lâminas-controle que se apresentaram sem coloração de peroxidase evidente), verifica-se somente a coloração verde que evidencia o núcleo celular que apresenta sua forma típica e regular (aumento 40X). Na figura 21B observamos a coloração das células que além da coloração verde do núcleo, apresenta também uma coloração castanha no citoplasma e na matriz extracelular (aumento 40X). Quanto às secções do tecido muscular, de camundongos B6I e μ MTI, a reação de imunomarcção em lâminas-controle apresentou resultado negativo (Prancha II – Figs 21C e E 40X). Prosseguindo, na figura 21D (animais B6I) foi observado infiltrado inflamatório focal e perivascular e de modo co-localizado à marcação de TNF- α nas células mononucleares. Nos animais μ MTI também foi observado a presença de TNF- α no citoplasma e matriz extracelular de células mononucleares (Fig. 21F). Verificamos que aparentemente houve maior intensidade de marcação de TNF- α nos tecidos de μ MTI do que em B6I. Entretanto este resultado é apenas sugestivo, pois um número maior de animais precisa ser estudado quanto à expressão desta citocina no músculo estriado.

PRANCHA II

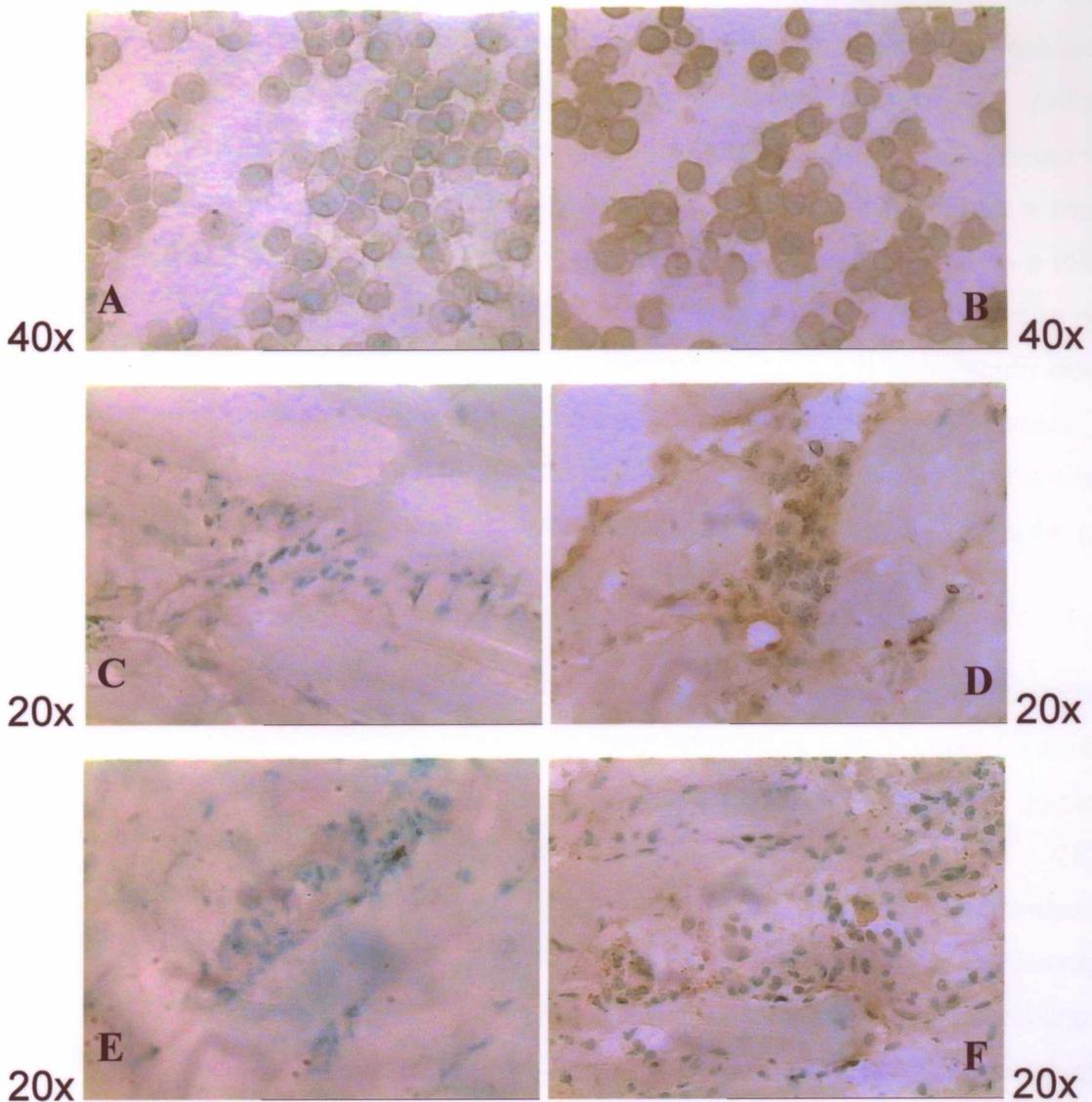


Figura 21. Fotomicrografia de imunomarcção em TNF- α em cortes histopatológicos do tecido muscular esquelético de camundongos C57Bl/6 e μ MT durante a fase crônica inicial de infecção por *T. cruzi*: As figuras A e B ilustram as células J774 com (B) e sem (A) o anticorpo primário anti-TNF- α . Estão representadas as secções histopatológicas de animais μ MT infectados no controle negativo (C) ou positivo (D). As fotomicrografias E e F são de camundongos C57Bl/6 infectados (respectivamente controle negativo e positivo). Aumento de 40x para secções A e B e de 20x para as demais.

5. DISCUSSÃO

Através dos diferentes modelos experimentais utilizados até hoje, foi possível estudar alguns dos mecanismos imunológicos que estão envolvidos na resistência à infecção. Atualmente, as perguntas estão voltadas sobre os processos imunorregulatórios que ocorrem, em diferentes modelos experimentais. Desse modo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar se as células B influenciam a memória imunológica e a migração de células T efetoras para os tecidos, durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Ademais, de importância fundamental é o estudo das células NK1.1+ presentes nos compartimentos periféricos como baço e músculo estriado, possivelmente contribuindo para a geração de linfócitos ativados e de memória. Para avaliar a geração de linfócitos T de memória e as células envolvidas na manutenção da memória imunológica, utilizamos um modelo experimental de infecção por *T. cruzi*, em camundongos desprovidos de células B funcionais.

No presente estudo foi investigada inicialmente a sobrevivência e o número de parasitos circulantes em animais μ MT e C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* (Figs. 2 e 3). A inoculação com 100 formas tripomastigotas (Fig. 2) ou com 50 formas (Fig 2A) nos permitiu observar diferenças entre os animais μ MT e C57Bl/6 quanto à parasitemia (Fig 2 e 2A) e a mortalidade (Figs. 3 e 3A). Os animais μ MT reconstituídos com células B controlaram melhor a parasitemia e apresentaram melhor sobrevivência quando comparados aos camundongos μ MT não reconstituídos. Esses dados sugerem que as células B estariam participando da resistência à infecção.

Diversos estudos indicam que as células B estão presentes no timo e no baço (INABA *et al.*, 1988). No timo elas podem participar no processo de apresentação de peptídeos durante o evento de seleção tímica das células T (WEISS *et al.*, 1989; LANZAVECCHIA, 1985). Neste sentido, as células B poderiam potencialmente servir como fonte de apresentação de peptídeos no timo, gerando diversidade do reconhecimento, inerente a células T (CONSTANT, 1999). Adicionalmente, foi descoberto que em camundongos desprovidos de células B, ocorre diminuição no desenvolvimento da zona de células T da polpa branca. Isto sugere que as células B influenciariam no desenvolvimento das células T no baço (NGO *et al.*, 2001),

demonstrando que possivelmente a ausência destas células causaria diminuição da população de linfócitos T no baço e, conseqüentemente, diminuição do mesmo.

Vários estudos demonstraram que na infecção de camundongos por *T. cruzi* ocorre ativação policlonal de linfócitos B (entre eles, CORSINI & COSTA, 1981; MINOPRIO *et al.*, 1986). Assim, podemos correlacionar o aumento da celularidade do baço dos grupos experimentais com a expansão policlonal de linfócitos. Durante a fase aguda de infecção, há aumento do número e do tamanho dos linfócitos no baço, indicando a presença de células ativadas (MINOPRIO *et al.*, 1988). Assim, ocorre também produção de anticorpos de múltiplas especificidades (MINOPRIO *et al.*, 1989). Neste tipo de ativação a maior parte dos linfócitos B ativados na infecção pelo *T. cruzi* não apresenta especificidade por antígenos parasitários. Na fase aguda de infecção, as diferenças de tamanho de baço foram mais evidentes em nossos estudos (Fig. 8). Observamos que na fase crônica, a depleção de células com marcador NK1.1 na fase crônica inicial, não causou alterações significativas no tamanho do baço em C57Bl/6 e μ MT (Fig. 14). Adicionalmente, na fase crônica os animais μ MT reconstituídos com células B apresentaram os baços diminuídos, comparados aos não reconstituídos (Fig. 8B). Possivelmente, uma hipótese poderia ser que, após a transferência adotiva de células B em animais μ MT, a célula B passe a regular negativamente a expansão de determinadas populações celulares através da produção de IL-10 ou até mesmo através da liberação de imunoglobulinas.

Após a análise da celularidade do baço dos animais, foram evidenciados os perfis de ativação e memória dos esplenócitos de camundongos em fase aguda de infecção. As células T virgens apresentam marcadores de superfície celular que as tornam fenotipicamente distintas de outras populações celulares. Assim, as células T virgens expressam em sua superfície celular altos níveis de CD45RB e CD62L e baixa ou intermediárias de CD44. Dependendo das condições após, uma resposta imune essa célula T passa a ser identificada como célula T efetora de memória. Essa célula expressa baixos níveis de CD45RB e CD62L e altos níveis de CD44. Sendo assim, a ativação das células T causa modulação negativa e/ou positiva de algumas de suas moléculas em sua superfície, conforme descrito acima (SPRENT, 1993).

Em nosso modelo experimental, foram analisados outros marcadores de ativação e memória: CD62L, CD44 e CD69 (aqui não incluídos, material em análise e avaliação). Em decorrência de estudarmos linfócitos T de memória, selecionamos o marcador CD45RB que exemplifica bem esta população quando esta presente em baixos níveis – ou mesmo ausente – da superfície celular. Por essa razão e pelos resultados obtidos referentes a células de memória, não incluímos outros marcadores nesta tese. Tomando por base que o marcador CD45RB indica com clareza o fenótipo de um linfócito T de memória/efetora, e que linfócitos B poderiam atuar no sentido de favorecer a manutenção desta memória e o aumento de linfócitos T, avaliamos a presença deste marcador sobre esplenócitos em função da presença ou ausência de linfócitos B. Muitos grupos de pesquisa demonstraram a importância das células B antígeno-específica em apresentar antígenos para as células T *in vivo* (revisto em ABBAS *et al.*, 1984; MALYNN *et al.*, 1985; KURT-JONES *et al.*, 1988). Em outro modelo experimental, a imunização de camundongos μ MT C57Bl/6 não infectados com a proteína KLH (Proveniente de Hemocianina) e posteriormente o estímulo em cultura do linfonodo com o mesmo antígeno, revelou reduzida capacidade em responder ao re-estímulo (RIVERA *et al.*, 2001). Ademais, foi demonstrado em modelo experimental semelhante (mas não na infecção por *T. cruzi*), que a transferência adotiva de células B maduras poderia restaurar a ativação normal de células T CD4⁺ (LIU *et al.*, 1995).

Na infecção aguda, observamos que a reconstituição dos animais μ MT com células B resultou em aumento no número de células T com marcador CD45RB^{neg} no baço (Fig. 5). Também nesta figura, de modo semelhante o tratamento com imunoglobulinas aumentou o número de células T CD4⁺ e CD8⁺ CD45RB^{neg} em animais μ MT infectados (μ MTI+Ig). Na fase crônica de infecção, os animais C57Bl/6 infectados apresentaram novamente maiores proporções de células T de memória comparadas ao grupo experimental μ MT infectado (Fig. 9). A reconstituição de animais μ MT com células B resulta em aumento da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ apresentando CD45RB^{neg}, no baço. Em nossos resultados utilizando também animais C57Bl/6 demonstramos que, tanto na fase aguda como na crônica os baços de animais μ MT infectados apresentaram menor número de células T CD45RB^{neg} (comparados aos C57Bl/6 e aos animais μ MT infectados e reconstituídos). Assim, estes resultados mostram que na ausência de células B, o desenvolvimento de

células T é modificado. Além disso, de acordo com os nossos resultados experimentais sugerimos que as células B são importantes no aumento de células T CD4⁺ CD45RB^{neg} até a fase crônica. Possivelmente, estas últimas seriam responsáveis para a manutenção da população de CD8⁺ CD45RB^{neg} até a fase crônica inicial.

Antes de procedermos a análise do marcador NK1.1 averiguamos a expressão de CD1 sobre as células IgM positivas. Os estudos demonstram que as células B IgM⁺ CD1⁺ são importantes na ativação de uma subpopulação em especial, a de células T NK1.1⁺ (BENDELAC *et al.*, 1997). Essa subpopulação celular é ativada pelas células B através da interação via molécula de CD1d (BRIGL & BRENNER, 2004). A infecção aguda por *T. cruzi* em animais C57Bl/6, causou diminuição de células CD1⁺ IgM⁺ de modo significativo (Fig. 7). Esse dado sugere que a ativação policlonal das células B pode levar a uma modulação negativa da molécula CD1⁺ sobre as células IgM positivas ou, alternativamente, células B podem estar sofrendo diferenciação terminal intensamente. A última afirmação é válida, pois em número absoluto a diminuição de células IgM⁺ CD1⁺ em animais C57Bl/6 infectados (fase aguda) é significativa (Fig. 7). Já em μ MT, o baço dos animais μ MT não apresentaram células B, que seriam evidenciadas como IgM positivas (como esperado). Mais tardiamente e na fase crônica, os animais C57Bl/6 indicaram um aparente aumento de IgM⁺ CD1⁺ no baço, após a infecção (Fig.11). A transferência adotiva de células B (selvagens) ou B (IL10-KO) para animais μ MT infectados ocorreu de modo eficiente reconstituindo os animais, como demonstrado pela análise dos esplenócitos por citometria de fluxo (Figs. 7 e 11).

Quanto aos esplenócitos $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺, observamos que na fase aguda de infecção os grupos μ MT infectados apresentaram as mesmas proporções de células $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺, comparados aos não infectados (Fig. 6). Já o tratamento de animais μ MT normais com Ig aumenta os números de células $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺ (Fig. 6). Uma das hipóteses sugeridas, é que as imunoglobulinas ou fatores do soro poderiam atuar no sentido de regular positivamente a expansão das células $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺. Desse modo, sugere-se através dos dados, que a imunoglobulina pode ser uma molécula

importante não só na resposta imune, mas também na regulação da expansão de algumas das subpopulações das células T.

Em outro trabalho, sugere-se que para a geração de diversidade de células T são requeridas células B e imunoglobulina (Ig) (JOÃO *et al.*, 2004). Em nossos resultados, aos 60 dias de infecção, os números de células esplênicas $\alpha\beta$ + NK1.1+ em animais C57Bl/6 são maiores do que em animais μ MT. Nesta fase da infecção, a reconstituição de animais μ MT, com células B, não altera as proporções de células $\alpha\beta$ + NK1.1+ (Fig. 10). De maneira relevante, a reconstituição de animais μ MT com células B (IL-10 KO) causou aumento no número de células T CD4+ NK1.1+ no músculo esquelético. Essa população celular é uma subpopulação de células $\alpha\beta$, com TCR restrito e dependente da classe I para sua maturação e diferenciação (BENDELAC, 1997). De alguma maneira, talvez por mediadores solúveis como, por exemplo, a IL-10, as células B poderiam estar regulando a expansão das células T CD4+ NK1.1+.

Segundo GODFREY e colaboradores (2000) as células T NK podem ativar as células B através da ligação via molécula de CD1d e isto poderia ser explicado em nossos estudos de maneira que estas células possam induzir à produção de anticorpos anti *T. cruzi*. Similarmente, a infecção por *T. cruzi* em camundongos depletados de células T NK resultou na diminuição dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, relacionada ao aumento de parasitas circulantes e alta suscetibilidade nestes animais (CARDILLO *et al.*, 2002). As células T NK1.1+ possuem ainda uma importante função regulatória em animais C57Bl/6 eutímicos, mas não em camundongos timectomizados infectados pelo *T. cruzi*. Esta função regulatória estaria relacionada à atividade auxiliar e na geração de células T efetoras ou de memória. No trabalho citado, a resistência à infecção foi correlacionada à presença de células T CD4+CD45RB^{neg} presentes no baço já antes da infecção.

Como descrito mais acima, utilizamos o marcador CD45RB^{neg} para identificar populações linfocitárias de memória/efetora. No entanto, foi descrito que CD44^{alto} pode caracterizar linfócitos T CD8+ de memória central e efetora, sugerindo ainda a possibilidade de interconversão entre estas duas populações (TOUGH, 2003). As células T de memória central são caracterizadas fenotipicamente por apresentarem

os marcadores CD44^{alt}, CD45RB^{neg} e receptores para a quimiocina CCR7^{pos} e CD62L^{pos}, permitindo a sua localização em órgãos linfóides. O autor discute ainda que possivelmente o fenótipo funcional de memória em estados de infecção (como pelo vírus influenza) tem sido associado somente à memória central, isto porque vários estudos mostram apenas estágios tardios da infecção considerando um único ponto. Neste sentido, estudamos diferentes fases da infecção e utilizamos o marcador único CD45RB. Especificamente em nossos estudos, propomos que a manutenção do estado de memória em células T CD4⁺ é verificada em μ MT infectados somente quando reconstituídos com células B. Este mesmo mecanismo de manutenção da memória imune aparentemente não acontece com administração de Imunoglobulinas.

A manutenção da memória em linfócitos T CD8⁺ é bem estabelecida no caso de μ MTI+B, quando os números absolutos desta população celular são avaliados no baço (resultados não mostrados). Claramente, na fase crônica estudada (resultados em avaliação, aqui não apresentados) estes números passam de aproximadamente 200.000 no μ MT infectados e não reconstituídos com linfócitos B, para 1.000.000 de células CD8⁺ CD45RB^{neg} nos reconstituídos (μ MTI comparados aos μ MTI+B). Nossos resultados indicam desse modo que a presença da célula B estaria ligada à formação de células T CD45RB^{neg} na fase aguda e manutenção/aumento de memória imune na fase crônica de infecção, possivelmente conferindo ao grupo de animais reconstituídos com células B, maior sobrevivência. Como mencionado, os animais μ MT infectados apresentaram menor frequência de células T CD45RB^{neg}, na fase aguda de infecção, comparados aos C57Bl/6. No entanto, a reconstituição de animais μ MT, com células B, resultou no aumento de CD45RB^{neg} no baço (Fig. 5), o que possivelmente estaria relacionado com a resistência do animal a infecção, resultando em diminuição da parasitemia e da mortalidade (Fig. 2 e 3). Adicionalmente, o tratamento com Ig também aumentou o número de células T CD4⁺ CD45RB^{neg}, na fase aguda da infecção. Podemos assim sugerir que as células T CD4⁺ CD45RB^{neg} estariam relacionadas, e alguma forma, à manutenção de células T CD8⁺ CD45RB^{neg}, durante a infecção, tanto após a reconstituição com células B ou a administração de Ig (Fig. 9).

Pode ser ainda proposto que para a geração e manutenção de células T CD8⁺ é preciso haver determinadas citocinas no microambiente linfocitário. Notadamente, SPRENT (2004) descreve em seu artigo de revisão que o linfócito T CD8⁺ de memória depende da síntese de interleucina 15 e ainda da presença de interleucina 2 para se manter viável a nível periférico. No mesmo artigo é comentado que estas citocinas, por sua vez, seriam capazes de induzir quantidades ótimas de secreção de IFN- γ que, juntamente com a própria IL-15, controlariam a expansão destas células. Logo, em nosso modelo experimental há uma possibilidade de que a reconstituição com linfócitos B em μ MT infectados (μ MTI+B) restabeleça o equilíbrio para a produção de algumas destas citocinas secretadas por linfócitos T, contribuindo para a manutenção da memória da população T CD8⁺.

BEVAN e colaboradores (2004) demonstraram que a formação de células T CD8⁺ de memória não é dependente de células T CD4⁺. Porém, a manutenção da subpopulação de células T CD8⁺ de memória é dependente de células T CD4⁺ no sistema de infecção de animais C57Bl/6 selvagens e MHC KO com *Listeria monocytogenes* e o vírus LCMV e aparentemente é o que pode acontecer em nosso sistema experimental.. Pode-se afirmar, portanto que mesmo que haja diferenças na predominância de células T CD8⁺ (SUN & TARLETON *et al.*, 1998) ou de células T CD4⁺ (RUSSO *et al.*, 1988; ARAUJO *et al.*, 1989; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2001) no infiltrado inflamatório do coração, é necessária a presença de ambas as populações celulares durante a infecção pelo *T. cruzi* para que haja uma resposta efetora apropriada, já que as células T em geral são importantes na resistência à infecção.

Quanto à análise dos fragmentos de tecido em nosso modelo experimental, em relação aos infiltrados inflamatórios, não foram observadas diferenças quantitativas quando o inóculo foi de 50 parasitas. Assim, nossos estudos histopatológicos aqui apresentados não indicaram diferenças de infiltrado mononuclear no tecido cardíaco e muscular esquelético entre animais μ MT e C57Bl/6 infectados. Na figura 19 foi apresentado o infiltrado inflamatório representativo dos grupos estudados (Fig 19A - coração; e 19B - músculo esquelético). Quando a infecção dos animais ocorre utilizando 500 e 1000 formas o infiltrado inflamatório é mais intenso em μ MT, quando comparados aos controles, na fase crônica inicial (como demonstrado por

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., ;NOMIZO, A. AND CARDILLO, F., 2001a; POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., CARDILLO, F., 2001b).

Sobre os níveis de TNF- α , quisemos relacionar os níveis desta citocina com a intensidade da resposta inflamatória e necrose nos tecidos de μ MT em fase crônica inicial. No que se refere à imunohistoquímica, o número de animais foi muito baixo para detectar diferenças, sendo que a figura 21 apenas ilustra a expressão de TNF no tecido de ambos os grupos experimentais (C57Bl/6 e μ MT infectados). Aparentemente, houve aumento da expressão de TNF- α nos tecidos de μ MT infectados comparados a seus controles C57Bl/6. Nos resultados referentes à dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais infectados, observa-se produção de TNF- α detectável em células esplênicas de μ MT. A expressão de TNF- α no tecido (Fig. 21) e a secreção desta citocina por esplenócitos (Fig. 20), sugere terem existido diferenças significativas entre animais μ MT e C57Bl/6. Esta poderia ser uma explicação para a extensa necrose encontrada em animais μ MT no início da fase crônica da infecção. Uma explicação para este fato é que naturalmente os animais μ MT apresentam produção aumentada de todas as citocinas. Fato este que poderia ser explicado pela compensação do sistema imunológico em manter o equilíbrio na ausência de células B que são células importantes na regulação.

Foi ainda demonstrado em nosso modelo que houve diminuição de células T CD45RB^{neg} no tecido muscular de animais μ MT comparado aos controles. Um dado importante revelado em nosso estudo foi que animais μ MT reconstituídos com células B apresentaram tendência a aumentar as proporções de células T CD45RB^{neg} neste local. Já a reconstituição com células B (IL-10KO) aumentou significativamente o número de células T NK1.1+ no tecido muscular. Desta maneira, possivelmente as células B poderiam atuar como regulatórias durante o processo inflamatório, como descrito em outro modelo experimental, livre de infecção (MIZOGUCHI *et al.*, 2002). Em relação ao infiltrado de células encontradas no músculo esquelético de animais μ MT ocorre aumento de células T CD8+ CD45RB^{neg} no infiltrado inflamatório, 15 dias após a depleção de NK1.1 (Fig. 17). Esses dados estão relacionados aos dados da análise histopatológica, onde foi observado que o tratamento de animais μ MT com anti-NK1.1, causou aumento de células no infiltrado

inflamatório. No baço de animais C57Bl/6 os números de células T CD4+ NK1.1+ já são baixos mesmo antes do tratamento. No músculo, o tratamento com anti-NK1.1 causou diminuição significativa de células T CD4+NK1.1+ e $\alpha\beta$ +NK1.1+ em animais C57Bl/6. Nos animais μ MT mesmo antes do tratamento os números já são baixos e menores que os de C57Bl/6 (Fig. 18). Esses dados indicam que após a depleção de células NK1.1+ dos animais C57Bl/6 infectados, ocorre baixa reposição de células T NK1.1+ (tanto $\alpha\beta$ total ou CD4+), 15 dias após o tratamento. Foi verificado também em nossos resultados que a reconstituição com células B (de animais IL-10 KO) em animais μ MT cronicamente infectados resultou em aumento das proporções de células T CD4+ NK1.1+, encontradas no músculo esquelético (Fig. 13).

As células T CD4+ NK1.1+ tem sido descritas como células T NK1.1+ que, em camundongos, expressam a cadeia invariante do TCR V α 14 e são dependentes de CD1d (BENDELAC, 1997). O fato de as células T CD4+ NK1.1+ já estarem aparentemente diminuídas em animais μ MT (tratados ou não com anti-NK1.1) poderia indicar que estas células tenham função regulatória e que podem depender de células B para sua expansão (Fig. 16). Esses dados sugerem que as células T CD4+ NK1.1+, em baixos números (e ainda mais aos 15 dias após a depleção de NK1.1), poderiam estar regulando negativamente a geração de células T de memória efetora no tecido muscular esquelético.

Finalmente, nossa hipótese é que na provável ausência/diminuição de células T CD4+ NK1.1+ (como no caso dos μ MT), poderia haver maior inflamação. Ao contrário, o total de células $\alpha\beta$ + NK1.1+ poderiam estar, em nossos estudos, induzindo à resposta aumentada, visto que esta população celular pode ser indutora de resposta (CARDILLO *et al.*, 2002; DUTHIE *et al.*, 2005). Interessante observar que a população CD4+ NK1.1+ está efetivamente maior em μ MT transferidos com linfócitos B de IL-10 KO, no tecido muscular de animais crônicos. Notadamente, uma citocina que poderia controlar o aumento desta população seria, portanto a IL-10 produzida por linfócitos B. Dessa maneira, a ausência de células B poderia influenciar a expansão das células T CD4+NK1.1+ no músculo, durante a infecção crônica. A elucidação deste mecanismo regulatório envolvendo linfócitos T CD4+ NK1.1+ poderia explicar a razão pela qual μ MT infectados possuem maior infiltrado inflamatório na fase crônica inicial (infecção com 500 e 1000 formas da mesma cepa) do que seus controles C57Bl/6 infectados da mesma maneira.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que:

- Animais μ MT C57Bl/6 apresentam maior parasitemia e mortalidade do que os controles C57Bl/6 infectados. Estes mesmos animais tornam-se mais resistentes pela reconstituição com linfócitos B. Portanto, os linfócitos B transferidos estão relacionados ao aumento de resistência em animais μ MT infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, a transferência de células B conferiu uma maior sobrevivência ao grupo de animais reconstituídos com células B.
- No modelo experimental utilizado, foi observado que imunoglobulinas administradas a animais μ MT infectados podem levar à manutenção de células T $\alpha\beta$ +NK1.1+ comparado ao efeito da reconstituição com linfócitos B, a nível periférico. Além disso, como estas células reconhecem a molécula CD1 sobre linfócitos B, é provável que a transferência de células B a animais μ MT infectados possa auxiliar no controle da população de células NK1.1+. Estas últimas, por sua vez, também podem estar envolvidas em mecanismos que levam μ MT reconstituídos a apresentarem maior sobrevivência.
- Animais C57Bl/6 infectados apresentam diminuição da frequência de células IgM+CD1+ durante a fase aguda da infecção e mantêm estas células na infecção crônica. Células B transferidas estão viáveis nos animais μ MT infectados e levam ao aumento de IgM+CD1+ no baço dos animais que receberam as células. A mesma transferência de células B a animais μ MT infectados (comparados aos não reconstituídos) leva ao aumento de células T de memória/efetora no baço, evidenciadas pelo marcador CD45RB^{neg} sobre linfócitos T CD4+ e CD8+.

- O tratamento com anti-NK1.1+ em animais crônicos: a – Induz aumento do infiltrado inflamatório no músculo. Este aumento de inflamação está relacionado ao aumento de células T efetoras/memória encontradas no músculo esquelético de animais μ MT infectados, 15 dias após o tratamento; b – As células T CD4+NK1.1+ estão diminuídas no músculo de μ MT infectados. Em nossos estudos, é possível que estas células apresentem atividade anti-inflamatória. Neste sentido, estas poderiam regular negativamente a resposta inflamatória neste microambiente. Além disso, esta população celular aumenta no músculo esquelético, em situações onde há reconstituição de linfócitos B provenientes de animais que não produzem IL-10 (células B de “C57Bl/6 IL-10KO”). Após a depleção de células NK1.1+ foi observado ainda que a população de células T CD4+NK1.1+ (em animais μ MT infectados) se mantêm baixas enquanto que as células $\alpha\beta$ +NK1.1+ totais são mais facilmente repostas e mantidas no sistema.
- Os níveis de TNF- α estiveram aumentados no sobrenadante de baço proveniente de animais μ MT C57Bl/6 quando comparados ao controles C57Bl/6. A identificação por imunohistoquímica desta citocina indicou *existir um provável aumento no tecido muscular esquelético de μ MT C57Bl/6 infectados comparados aos controles.*

Finalmente, células B e possivelmente linfócitos T NK1.1+ (alfa beta, em sua totalidade) induzem ao aumento de células T memória/efetora (CD45RB^{high}) na fase aguda e a sua manutenção/aumento de resposta na fase crônica de infecção. Ademais, a subpopulação T CD4+NK1.1+ está diminuída em μ MT C57Bl/6 comparada a seus controles C57Bl/6 infectados. Como hipótese, esta subpopulação de células T CD4+NK1.1+ poderia estar envolvida em atividade anti inflamatória, visto que a literatura científica descreve que esta mesma população celular pode produzir rapidamente interleucina-4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B. JR.; TAINTOR, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J. Immunol.**, **144**(7):2725-9, 1990.
- ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; 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):1961-7, 1996.
- ANDRADE, S.G. & MAGALHAES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30**:27-35, 1997.
- ANDRADE, V.; ANDRADE, S.G.; BARRAL-NETO, M.; PONTES, A.L.; CASTRO, L. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** **18**:143-154, 1985.
- ANDRADE ZA, ANDRADE SG, OLIVEIRA GB, ALONSO DR. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **Am. Heart. J.** **95**(3):316-24, 1978.
- APT W., NAQUIRA C., TEJADA A, STROZZI L. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*. II. In rats with acute and chronic infections. **Bol. Chil. Parasitol.** **23**(1):9-15, 1968.
- 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.

ARSTILA, T.P.; CASROUGE, A.; BARON, V.; EVEN, J.; KANELLOPOULOS, J.; KOURILSKY, P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. **Science**, **286**(5441):958-61, 1999.

AZUARA, V.; LEMBEZAT, M.P.; PEREIRA, P. The homogeneity of the TCRdelta repertoire expressed by the Thy-1dull gammadelta T cell population is due to cellular selection. **Eur. J. Immunol.**, **28**(11):3456-67, 1998.

AZUARA, V.; LEVRAUD, J.P.; LEMBEZAT, M.P.; PEREIRA, P. A novel subset of adult gamma delta thymocytes that secretes a distinct pattern of cytokines and expresses a very restricted T cell receptor repertoire. **Eur. J. Immunol.**, **27**(2):544-53, 1997.

BALLAS, Z.K.; TURNER, J.M.; TURNER, D.A.; GOETZMAN, E.A.; KEMP, J.D. A patient with simultaneous absence of "classical" natural killer cells (CD3-, CD16+, and NKH1+) and expansion of CD3+, CD4-, CD8-, NKH1+ subset. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **85**(2):453-9, 1990.

BARTON, G.M. and RUDENSKY, A.Y. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. **Science**, **283**(5398):67-70, 1999.

BAXTER, A.G.; KINDER, S.J.; HAMMOND, K.J.; SCOLLAY, R.; GODFREY, D.I. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. **Diabetes**, **46**(4):572-82, 1997.

BENDELAC, A. Intrathymic activation events and the generation of IL-4 producer CD4+8- thymocytes. **Semin. Immunol.**, **4**(3):187-93, 1992.

BENDELAC A, RIVERA MN, PARK SH, ROARK JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. **Annu. Rev. Immunol.** **15**:535-62, 1997.

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

BITTENCOURT, A.L. Congenital Chagas disease. **Am. J. Dis. Child.** **130(1):**97-103, 1976.

BLACK, C.M.; ISRAELSKI, D.M.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J.S. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. **Immunology**, **68(4):**570-4, 1989.

BLUMBERG, R.S., L.J. SAUBERMANN, AND W. STROBER. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Immunol.** **11(6):**648-56, 1999.

BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol. Today.** **15(1):**22-8, 1999.

BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. **Am. Trop. Med. Parasitol.**, **63:**215-220, 1961.

BRENER Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** **13(3):**171-8, 1971.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **J. Annu. Rev. Microbiol.**, **27:**347-382, 1973.

BRIGL M, BRENNER MB. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annu. Rev. Immunol.** **22:**817-90, 2004.

CAMANDAROBA EL, PINHEIRO LIMA CM, ANDRADE SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodevelopment in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** **44(2):**97-103, 2002.

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

CARDILLO, F., F.Q. CUNHA, W.M. TAMASHIRO, M. RUSSO, S.B. GARCIA, AND J. MENGEL. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.** **55**(1):96-104, 2002.

CARDILLO F, NOMIZO A, POSTOL E, MENGEL J. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Méd. Sci. Monit.**,**10**(8):BR259-67, 2004.

CARNAUD C, GOMBERT J, DONNARS O, GARCHON H, HERBELIN A. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. **J. Immunol.** **15**;166(4):2404-11, 2001.

CASROUGE, A.; BEAUDOING, E.; DALLE, S.; PANNETIER, C.; KANELLOPOULOS, J.; KOURILSKY, P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. **J. Immunol.**, **164**(11):5782-7, 2000.

CHAGAS, C. Nova espécie morbida do homem produzida por um trypanosome. (*Trypanosoma cruzi*). **Brasil medico.** **22**, 1909a.

CHAGAS, C. Nova Trypanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n.s, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, **1**:1-62, 1909b.

CHAGAS, C. Tripanosomiase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, **8**:37-60, 1916.

CHAGAS, C. Infection Experimentale de l'homme par lê *Schizotrypanum cruzi*. **CR. Soc. Biol.** **121**:769-771, 1936.

CHEN, J.; TROUNSTINE, M.; ALT, F.W.; YOUNG, F.; KURAHARA, C.; LORING, J.F.; HUSZAR, D. Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. **Int. Immunol.**, **5**(6):647-56, 1993.

CHEN, Y.H.; CHIU, N.M.; MANDAL, M.; WANG, N.; WANG, C.R. Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. **Immunity**, **6(4)**:459-67, 1997.

CONSTANT, S.L. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. **J. Immunol.**, **162(10)**:5695-703, 1999.

CORSINI AC, COSTA MG. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). I--Evidences of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extract prepared from circulating trypomastigotes. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. **23(3)**:114-21, 1981

CUMMINGS, K.L and TARLETON, R.L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, **72(7)**:4081-9, 2004.

DE TITTO, E.H; CATTERALL, J.R.; REMINGTON, J.S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, **137(4)**:1342-5, 1986.

D'IMPERIO LIMA; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICS, M.; COUTINHO, A .Persistence of polyclonal B activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. **J. Immunol.** **137**:335-6, 1986.

DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão Em: Brener Z., Andrade Z.A. (eds) *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed, pp 292-294, 1979.

DOS REIS G.A., LOPES M.F. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: BRENER Z., ANDRADE Z.A., BARRAL-NETO M., *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2ª Edição. Cap. 9:156-166, 2000.

DOS SANTOS RR, ROSSI MA, LAUS JL, SILVA JS, 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.

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 glycosphosphoinositol-modified surface protein. **Infect. Immun.**, **70**(1):36-48, 2002.

DUTHIE MS, KAHN M, WHITE M, KAPUR RP, KAHN SJ. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** **73**(1):181-92, 2005.

ELKINS, K.L.; BOSIO, C.M.; RHINEHART-JONES, T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. **Infect. Immun.**, **67**(11):6002-7, 1999.

EMOTO, M.; EMOTO, Y.; BUCHWALOW, I.B.; KAUFMANN, S.H. Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. **Eur. J. Immunol.**, **29**(2):650-9, 1999.

FALCONE, M. and SARVETNICK, N. Cytokines that regulate autoimmune responses. **Curr. Opin. Immunol.**, **11**(6):670-6, 1999.

FALCONE, M.; YEUNG, B.; TUCKER, L.; RODRIGUEZ, E.; SARVETNICK, N. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Exp. Med.**, **190**(7):963-72, 1999.

FLESCH, I.E. and KAUFMANN, S.H. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. **Infect. Immun.**, **59**(9):3213-8, 1991.

GALVAO-CASTRO B, SA FERREIRA JA, MARZOCHI KF, MARZOCHI MC, COUTINHO SG, LAMBERT PH. monoclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.** **56(1):58-66**, 1984.

GATELY, M.K.; WARRIER, R.R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D.M.; FAHERTY, D.A.; CONNAUGHTON, S.E.; ANDERSON, T.D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD, B.R.; MURPHY, M. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. **Int. Immunol.**, **6(1):157-67**, 1994.

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):1792-6**, 1992a

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.** **22(10):2501-6**, 1992b

GAZZINELLI, R.T.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **149(1):175-80**, 1992c

GHALIB HW, WHITTLE JA, KUBIN M, HASHIM FA, EL-HASSAN AM, GRABSTEIN KH, TRINCHIERI G, REED SG. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.** **154(9):4623-9**, 1995.

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):573-83**, 2000.

GOLDEN, J.M. and TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.**, **72**(4):391-402, 1991.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, **145**(12):4290-7, 1990.

HARDING, F.A.; MCARTHUR, J.G.; GROSS, J.A.; RAULET, D.H.; ALLISON, J.P. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. **Nature**, **356**(6370):607-9, 1992.

HASAN, M.; POLIC, B.; BRALIC, M.; JONJIC, S.; RAJEWSKY, K. Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background. **Eur. J. Immunol.**, **32**(12):3463-71, 2002.

HOERAUF, A.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. **Int. Immunol.**, **8**(10):1569-75, 1996.

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

HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, **260**(5107):547-9, 1993.

HUNTER, C.A.; ELLIS-NEYES, L.A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F.G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, **158**(7):3311-6, 1997.

HUNTER, C.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.**, **64**(7):2381-6, 1996.

HUNTER, C.A.; SUBAUSTE, C.S.; VAN CLEAVE, V.H.; REMINGTON, J.S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, **62**(7):2818-24, 1994.

IWAKOSHI, N.N.; GREINER, D.L.; ROSSINI, A.A.; MORDES, J.P. Diabetes prone BB rats are severely deficient in natural killer T cells. **Autoimmunity**, **31**(1):1-14, 1999.

JAMES SL, GLAVEN J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **J. Immunol.** **143**(12):4208-12, 1989.

JENKINS, M.K. and SCHWARTZ, R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.**, **165**(2):302-19, 1987.

JOAO, C.; OGLE, B.M.; GAY-RABINSTEIN, C.; PLATT, J.L.; CASCALHO, M. B cell-dependent TCR diversification. **J. Immunol.**, **172**(8):4709-16, 2004.

JOYCE, S.; NEGISHI, I.; BOESTEANU, A.; DESILVA, A.D.; SHARMA, P.; CHORNEY, M.J.; LOH, D.Y.; VAN KAER, L. Expansion of natural (NK1+) T cells that express alpha beta T cell receptors in transporters associated with antigen presentation-1 null and thymus leukemia antigen positive mice. **J. Exp. Med.**, **184**(4):1579-84, 1996.

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

KAPLAN, M. H.; SCHINDLER, U.; SMILEY, S. T.; GRUSBY, M. J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of T_H2 cells. **Immunity**, **4**:313, 1996.

KAWANO, T.; CUI, J.; KOEZUKA, Y.; TOURA, I.; KANEKO, Y.; MOTOKI, K.; UENO, H.; NAKAGAWA, R.; SATO, H.; KONDO, E.; KOSEKI, H.; TANIGUCHI, M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. **Science**, **278**(5343):1626-9, 1997.

KIERSZENBAUM F, KNECHT E, BUDZKO DB, PIZZIMENTI MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **112**(5):1839-44, 1974.

KIERSZENBAUM F, PIENKOWSKI MM. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** **24**(1):117-20, 1979.

KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. **J. Parasitol.**, **66**(4):673-5, 1980.

KITAMURA, D.; ROES, J.; KUHN, R.; RAJEWSKY, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. **Nature**, **350**(6317):423-6, 1991.

KOEBERLE, J. Control in the pharmaceutical industry. **Farmaco. (Prat)** **23** (3):103-29, 1968.

KOO GC, PEPPARD JR, MARK WH. Natural killer cells generated from bone marrow culture. **J. Immunol.** **132**(5):2300-4, 1984.

KUMAR, S. and 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.

KUPFER, A.; SWAIN, S.L.; SINGER, S.J. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. **J. Exp. Med.**, **165**(6):1565-80, 1987.

KURT-JONES EA, LIANO D, HAYGLASS KA, BENACERRAF B, SY MS, ABBAS AK. The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. Studies of B cell-deficient mice. **J. Immunol.** **140**(11):3773-8, 1988.

LANGERMANS, J.A.; VAN DER HULST, M.E.; NIBBERING, P.H.; VAN FURTH, R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. **Infect. Immun.**, **60**(12):5107-12, 1992.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Parasite Immunol.**, **9**(1):21-30, 1987.

LANGHORNE, J.; CROSS, C.; SEIXAS, E.; LI, C.; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **95**(4):1730-4, 1998.

LANZAVECCHIA, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature**, **11-314**(6011):537-9, 1985.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOREGA, G.; MIRANDA, A. Chaga's disease. A clinical epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, **15**:1035-1060, 1956.

LEEF, M.; ELKINS, K.L.; BARBIC, J.; SHAHIN, R.D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production. **J. Exp. Med.**, **191**(11):1841-52, 2000.

- LEHUEN A, LANTZ O, BEAUDOIN L, LALOUX V, CARNAUD C, BENDELAC A, BACH JF, MONTEIRO RC. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. **J. Exp. Med.** **16**;188(10):1831-9, 1998.
- 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.
- LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, **77**(1):95-8, 1992.
- LEITE DE MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; LÉBOULENGER, F.; SAVINO, W.; DARDENNE, M.; LÉPAULT, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. **Scand. J. Immunol.**, **33**(3):267-75, 1991.
- LENZ DC, KURZ SK, LEMMENS E, SCHOENBERGER SP, SPRENT J, OLDSTONE MB, HOMANN D. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **101**(25):9357-62, 2004.
- LEVITSKY, H.I.; GOLUMBEK, P.T.; PARDOLL, D.M. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. **J. Immunol.**, **146**(4):1113-7, 1991.
- LIMA-MARTINS, M.V.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol.** **7**(4):367-76, 1985.
- LIU Y, WU Y, RAMARATHINAM L, GUO Y, HUSZAR D, TROUNSTINE M, ZHAO M. Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response. **Int. Immunol.** **7**(8):1353-62, 1995.

SINGH AK, YANG JQ, PAREKH VV, WEI J, WANG CR, JOYCE S, SINGH RR, VAN KAER L. The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents or promotes pristane-induced lupus in mice. **Eur. J. Immunol.** **35(4):1143-54**, 2005.

MACPHERSON, A.J.; LAMARRE, A.; MCCOY, K.; HARRIMAN, G.R.; ODERMATT, B.; DOUGAN, G.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M. IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. **Nat. Immunol.**, **2(7):625-31**, 2001.

MALCHIODI EL, CARBONETTO CH, GRANA D, EIGUCHI DE PALMERO K, CHIARAMONTE MG, FALASCA CA, MARGNI RA. Immune response against *Trypanosoma cruzi* antigens in Cebus apella monkeys. **Trop. Med. Parasitol.** **44(2):86-90**, 1993.

MALE D., CHAMPION B., COOKE A. The Basis of Immunity. In. Advanced Immunology. J.B. Lippincott company Philadelphia. Gower Medical Publishing. Cap 1:1.1:1.13. 1987.

MALYNN BA, ROMEO DT, WORTIS HH. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. **J. Immunol.****135(2):980-8**, 1985.

MARS LT, LALOUX V, GOUDE K, DESBOIS S, SAOUDI A, VAN KAER L, LASSMANN H, HERBELIN A, LEHUEN A, LIBLAU RS. Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. **J. Immunol.** **15;168(12):6007-11**, 2002.

MARTIN DL, TARLETON RL. Antigen-Specific T Cells Maintain an Effector Memory Phenotype during Persistent *Trypanosoma cruzi* Infection. **J. Immunol.** **1;174(3):1594-601**, 2005.

MASON, D. The role of B cells in the programming of T cells for IL-4 synthesis. **J. Exp. Med.**, **183(3):717-9**, 1996.

MASTROENI, P.; SIMMONS, C.; FOWLER, R.; HORMAECHE, C.E.; DOUGAN G. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and show impaired Th1 T-cell responses to Salmonella antigens. *Infect. Immun.*, **68**(1):46-53, 2000.

MCCABE, R.E.; REMINGTON, J.S.; ARAUJO, F.G. In vivo and in vitro effects of cyclosporin A on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**(5):861-5, 1985.

MIEZA MA, ITOH T, CUI JQ, MAKINO Y, KAWANO T, TSUCHIDA K, KOIKE T, SHIRAI T, YAGITA H, MATSUZAWA A, KOSEKI H, TANIGUCHI M. Selective reduction of V alpha 14+ NK T cells associated with disease development in autoimmune-prone mice. *J. Immunol.* **15**;156(10) :4035-40, 1996.

MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*-milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology.* **65**(1):1-9, 1972.

MINOPRIO PM, EISEN H, FORNI L, D'IMPERIO LIMA MR, 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, 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, BANDEIRA A, PEREIRA P, MOTA SANTOS T, COUTINHO A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int. Immunol.* **1**(2):176-84, 1989.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J. Immunol.*, **151**(8):4200-8, 1993.

- MIYAMA-INABA, M.; KUMA, S.; INABA, K.; OGATA, H.; IWAI, H.; YASUMIZU, R.; MURAMATSU, S.; STEINMAN, R.M.; IKEHARA, S. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. **J. Exp. Med.**, **168**(2):811-6, 1988.
- MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; TAKEDATSU, H.; BLUMBERG, R.S.; BHAN, A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity**, **16**(2):219-30, 2002.
- MOLANO, A.; PARK, S.H.; CHIU, Y.H.; NOSSEIR, S.; BENDELAC, A.; TSUJI, M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. **J. Immunol.**, **164**(10):5005-9, 2000.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.**, **136**(7):2348-57, 1986.
- MOTA, I. and UMEKITA, L.F. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. **Immunol. Lett.**, **21**(3):223-5, 1989.
- MULLER, U, KOHLER, G, MOSSMANN, H, SCHAUB, GA, ALBER, G, DI SANTO, JP, BROMBACHER, F, HOLSCHER, C. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. **J. Immunol.**, **167**(6):3346-53, 2001.
- MURRAY HW, JUANGBHANICH CW, NATHAN CF, COHN ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. **J. Exp. Med.** **50**(4):950-64, 1979.
- NABORS, GS AND TARLETON, RL. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, **146**(10):3591-8, 1991.

- NATHAN, D.F.; NOGUEIRA, N.; JUANCHANICH, C.; ELLIS, C.J.; COHN, Z.^a
Activation of macrophage *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and the killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **149**:1056, 1979.
- NAUMOV, YN, BAHJAT, KS, GAUSLING, R, ABRAHAM, R, EXLEY, MA, KOEZUKA, Y, BALK, SB, STROMINGER, JL, CLARE-SALZER, M, WILSON, SB.
Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **98**(24):13838-43, 2001.
- NGO, VN, CORNALL, RJ, CYSTER, JG. Splenic T zone development is B cell dependent. **J. Exp. Med.**, **194**(11):1649-60, 2001.
- NOGUEIRA N, BIANCO C, COHN Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **142**(1):224-9, 1975.
- NOGUEIRA N, GORDON S, COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. **J. Exp. Med.** **146**(1):157-71, 1977.
- NOGUEIRA N, COHN ZA. *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. **J. Exp. Med.** **148**(1):288-300, 1978.
- NOGUEIRA N, ELLIS J, CHAPLAN S, COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** **51**(3):325-34, 1981.
- NOMIZO A, POSTOL E, DE ALENCAR R, CARDILLO F, MENGEL J. Natural killer T cells are required for the development of a superantigen-driven T helper type 2 immune response in mice. **Immunology.**, **116**(2):233-44, 2005.
- NUSSENZWEIG V., SONNTAG R., BIANCALANA A., DE FREITAS J.L., AMATO NETO V., KLOETZEL J. Effect of triphenylmethane dyes on *Trypanosoma cruzi* in vitro; use of gentian violet in prevention of transmission of Chagas disease by blood transfusion. **Hospital (Rio J).** **44**(6):731-44, 1953.

PARK, SH, BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, **17**;406(6797):788-92, 2000.

PEARCE, EJ, SHER, A. Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.**, **73**(1):110-6, 1991.

PETRAY, PB, ROTTENBERG, ME, BERTOT, G, CORRAL, RS, DIAZ, A, ORN, A, GRINSTEIN, S. Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, **35**(1):77-80, 1993.

PORCELLI, SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. **Adv. Immunol.**, **59**:1-98, 1995.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., CARDILLO, F. Increased inflammatory responses in skeletal muscle of gene knockout B cell deficient mice during early chronic *T. cruzi* infection. **Scand. J. Immunol**, **54**(1), 2001b.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., NOMIZO, A. AND CARDILLO, F. Protection against *T. cruzi* infection does not require B cells. **Scand. J. Immunol.** **54** (1), 2001a.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S. AND CARDILLO, F. Cytokine production and inflammatory responses in skeletal muscles of \square MT C57BL/6 mice during *T. cruzi* infection. **Inflammation Research.** **50**:149-S230, 2001.

RAMIREZ LE, LAGES-SILVA E, SOARES JUNIOR JM, CHAPADEIRO E. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **27**(3):163-9, 1994

- REED, SG, BROWNELL, CE, RUSSO, DM, SILVA, JS, GRABSTEIN, KH, MORRISSEY, PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** **1**;153(7):3135-40, 1994.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R, MENGEL, JO, POSTOL, E, SOARES, RA, FERREIRA-FERNANDEZ, E, SOARES, MB, PONTES-DE-CARVALHO, LC. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** **23**(2):93-101, 2001.
- RIVERA A, CHEN CC, RON N, DOUGHERTY JP, RON Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. **Int. Immunol.** **13**(12):1583-93, 2001.
- ROARK, JH, PARK, SH, JAYAWARDENA, J, KAVITA, U, SHANNON, M, BENDELAC, A. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. **J. Immunol.**, **160**(7):3121-7, 1998.
- ROBERSON EL, HANSON WL. *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. **Exp. Parasitol.** **34**(2):168-80, 1973.
- ROCK KL, BENACERRAF B, ABBAS AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. **J. Exp. Med.** **1**;160(4):1102-13, 1984.
- ROTTENBERG, ME, 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, ME, RIARTE, A, SPORRONG, L, ALTSCHEH, J, PETRAY, P, RUIZ, AM, WIGZELL, H, ORN, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol. Lett.**, **45**(1-2):53-60, 1995.

RUSSO, M, STAROBINAS, N, MINOPRIO, P, COUTINHO, A, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, **139**(3):225-36, 1988.

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

SANT'ANGELO, DB, WATERBURY, PG, COHEN, BE, MARTIN, WD, VAN KAER, L, HAYDAY, AC, JANEWAY, CA Jr. The imprint of intrathymic self-peptides on the mature T cell receptor repertoire. **Immunity.**, **7**(4):517-24, 1997.

SATO MN, YAMASHIRO-KANASHIRO EH, TANJI MM, KANENO R, HIGUCHI ML, DUARTE AJ. 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):1024-30, 1992.

SAVINO, W, LEITE-DE-MORAES, MC, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M, DARDENNE, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, **19**(9):1727-33, 1989.

SCHMUNIS, G.A.; CAPPA, S.M.; TRAVERSA, O.C.; JANOVSky, J.F. The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **65**(1):89-94, 1971.

SCHOFIELD, C.J., MINTER, D.M., TONN, R.J. The triatoma bugs: biology and control. Geneva: **World Health Organization**; Document WHO/BC/87-941. 1987.

SCHOFIELD, C.J., DIOTAIUTI, L. & DUJARDIN, J.P. The process of domestication in Triatominae. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, **94** (Suppl. I): 375-378, 1999.

SCOTT, M.T. and MOYES, L. ⁷⁵Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. **Clin. Exp. Immunol.**, **48**(3):754-7, 1982.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, **112**:161-82, 1989.

SERREZE, D.V.; CHAPMAN, H.D.; VARNUM, D.S.; HANSON, M.S.; REIFSNYDER, P.C.; RICHARD, S.D.; FLEMING, S.A.; LEITER, E.H.; SHULTZ, L.D. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. **J. Exp. Med.**, **184**(5):2049-53, 1996.

SHI FD, FLODSTROM M, BALASA B, KIM SH, VAN GUNST K, STROMINGER JL, WILSON SB, SARVETNICK N. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **5**;98(12):6777-82, 2001.

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PADUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**(1):111-5, 1998.

SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J. Exp. Med.** **174**(3):539-45, 1991.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, **63**(12):4862-7, 1995.

- SPINELLA, S. and LIEGEARD, P. Hontebeyrie-Joskowicz M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp. Parasitol.**, **74**(1):46-56, 1992.
- SPRENT, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, **5**(3):433-8, 1993.
- SPRENT J, SURH CD. Generation and maintenance of memory T cells. **Curr. Opin. Immunol** **13**(2):248-54., 2001
- SPRENT J. Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells. **Microbes. Infect.** **5**(3):227-31, 2003.
- SUN J, TARLETON RL. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **48**(2):161-9, 1998.
- SURH, C.D.; LEE, D.S.; FUNG-LEUNG, W.P.; KARLSSON, L.; SPRENT, J. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. **Immunity**, **7**(2):209-19, 1997.
- 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.
- TAKEHARA HA, PERINI A, DA SILVA MH, MOTA I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp. Parasitol.** **52**(1):137-46, 1981..
- TAKEHARA, H.A.; DA SILVA, A.M.; BRODSKYN, C.I.; MOTA, I. A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. **Immunol. Lett.**, **23**(2):81-5, 1989.

- TALIAFERRO, W.H.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, **96**(3):199-226, 1955.
- 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.
- TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, **356**(6367):338-40, 1992.
- TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.**, **62**(5):1820-9, 1994.
- TOUGH D.F. Deciphering the relationship between central and effector memory CD8+ T cells. **Trends Immunol.** **24**(8):404-7, 2003.
- TEIXEIRA AR, SANTOS-BUCH CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. **Immunology.** **28**(3):401-10, 1975.
- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. Acquired cell mediated immunodepression in acute chagas' disease. **J. Clin. invest.**, **62**(6):1132-1141, 1978.
- TRIPP CS, WOLF SF, UNANUE ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **90**(8):3725-9, 1993.

TRISCHMANN T, TANOWITZ H, WITTNER M, BLOOM B. *Trypanosoma cruzi* control of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Exp. Parasitol** 45(2):160-8, 1978.

TRISCHMANN, T.M. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. **J. Immunol.**, 130(4):1953-7, 1983.

TRISCHMANN, T.M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Parasite Immunol.**, 6(6):561-70, 1984.

TSUNAWAKI, S.; SPORN, M.; DING, A.; NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**, 334(6179):260-2, 1988.

WEISS S, BOGEN B. B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 86(1):282-6, 1989.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. **WHO Technical Report Series**, 811;95 1991.

WHO. Chagas Disease. In: Tropical disease research Twelfth programme of UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and training in Tropical Diseases (TDR). **World Health Organization**, Geneva, Switzerland;125:135, 1995.

WILLIAMS MA, BEVAN MJ. Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. **J. Immunol.** 1;173(11):6694-702, 2004.

WILLIAM P. Fundamental Immunology. Raven Press. Second Edition. New York. 1989

WIRTH, J.J. and KIERSZENBAUM, F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. **J. Immunol.**, 141(1):286-8, 1988.

WURTZ, O.; BAJENOFF, M.; GUERDER, S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. **Int. Immunol.**, **16**(3):501-8, 2004.

YANG, X. and BRUNHAM, R.C. Gene knockout B cell-deficient mice demonstrate that B cells play an important role in the initiation of T cell responses to *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis) lung infection. **J. Immunol.**, **161**(3):1439-46, 1998.

YOSHIMOTO T, BENDELAC A, HU-LI J, PAUL WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** **5**;92(25):11931-4, 1995.

ZELEDON, R. and RABINOVICH J.E. Chagas disease: na ecological appraisal with special emphasis on its insects vectors. **Annue Ver. Entomol.**, **26**:110-133, 1981.

ZHENG, W. And FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for T_h2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, **89**:587, 1997.