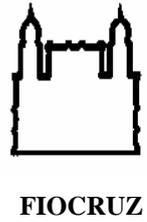




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

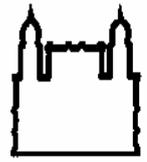
**PRESENÇA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATIVADAS E DAS
CÉLULAS T CD4⁺CD25^{hi} NA MIOCARDITE AGUDA E CRÔNICA
DA DOENÇA DE CHAGAS, EM CAMUNDONGOS DE
LINHAGENS RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL.**

RENATA SIQUEIRA PORTELLA

**Salvador – Bahia – Brasil
2013**



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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**PRESENÇA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATIVADAS E DAS
CÉLULAS T CD4⁺CD25^{hi} NA MIOCARDITE AGUDA E CRÔNICA
DA DOENÇA DE CHAGAS, EM CAMUNDONGOS DE
LINHAGENS RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL.**

RENATA SIQUEIRA PORTELLA

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Gumes Andrade

Tese apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-graduação em Patologia
Humana, como pré-requisito obrigatório
para obtenção do grau Doutor.

**Salvador –Bahia - Brasil
2013**

**PRESENÇA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATIVADAS E DAS CÉLULAS T
CD4⁺CD25^{hi} NA MIOCARDITE AGUDA E CRÔNICA DA DOENÇA DE
CHAGAS, EM CAMUNDONGOS DE LINHAGENS ISOGÊNICAS.**

RENATA SIQUEIRA PORTELLA

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

FONTES DE FINANCIAMENTO
CPqGM
CNPq

"Eterno é tudo aquilo que dura uma fração de segundos, mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força consegue destruir."

(C. Drummond de Andrade)

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me proteger e abençoar.
- À minha orientadora Dra. Sonia G. Andrade, por toda dedicação nesses 14 anos de convívio, por sempre estar disponível em me orientar e pela confiança depositada em mim. Pessoa que tenho um grande carinho, admiração e gratidão.
- O Dr. Zilton Andrade pelo exemplo de pesquisador e pela revisão de minha dissertação.
- Aos meus colegas de laboratório e de pós-graduação, Jorge Nihei, Marcos Lázaro, Monica Rebouças, Marcio Almeida, Isa Rita Moreira, Lorena Magalhães pelas discussões científicas e por toda ajuda sempre que necessitei.
- A meu colega de pós-graduação e amigo Daniel Pessina, por sua grande ajuda na realização e na análise dos resultados da técnica de citometria de Fluxo, que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho. Sem você não teria conseguido.
- Aos estudantes de iniciação científica Beatriz Góes, Amanda Silva, Anderson Luis Basílio e Gabriel Peleteiro pela ajuda nos experimentos.
- Ao Mestre Biólogo Juracy Magalhães (*em memória*) pelos ensinamentos técnicos e companheirismo. Você deixou muita saudade, mas sei que está amparado por Deus e espiritualmente participando desse momento.
- À técnica Fátima Magalhães pela amizade, e organização do laboratório.
- À técnica Dinalva França de Jesus pela dedicação em cuidar das culturas utilizadas neste trabalho.
- A bióloga Ariane Pimentel pelo coleguismo.

- Ao funcionário Preciano por ter cuidado dos animais utilizados nesse trabalho.
- A secretária Miralva Andrade por sempre estar disponível nas horas em que precisei.
- À funcionária do MASP, Maria José dos Santos pela limpeza do ambiente de trabalho.
- A toda família do Laboratório de Doença de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz.
- A todos os meus amigos do LAPEX, em especial Dra. Márcia de Souza, Antonio Carlos Santos, Everton Batista, Elisangela Trindade pela amizade e por sempre estarem disponíveis em ajudar.
- A minha amiga Liliane Cunha pela amizade, incentivo e ajuda.
- A todos do biotério por serem sempre prestativos e cuidarem dos animais, em especial Dr. Vitor Maffili, Rejane Menezes, Erivalda Alves, Josilene de Jesus, Silviane Nascimento, Valdomiro Silveira.
- Ao pessoal do Laboratório de Histopatologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/BA) pelo processamento, corte e coloração dos fragmentos histopatológicos dos animais utilizados nesse trabalho.
- Ao pessoal da Biblioteca Eurídice Santana.
- Ao pessoal da Pós-graduação, Tawar Figueiredo, Flavia Marciel, pela organização, paciência e auxílio.
- Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz-CPqGM) por toda infraestrutura fundamental para o desenvolvimento dessa dissertação.
- Ao terapeuta António Presídio por todo incentivo e ajuda nas questões psicológicas.

- Aos meus pais Márcia e Hélio Portella por todo sentido de vida, amor, responsabilidade, paciência, compreensão enfim por serem responsáveis pela pessoa que hoje sou.
- Aos meus irmãos Horácio, Bruno e Cláudia e ao Sobrinho Arthur pelas alegrias, cumplicidade, amizade e amor.
- Ao meu companheiro Rubens Martins pelo carinho, amor e por toda paciência e compreensão durante o desenvolvimento dessa tese.

PORTELLA, Renata Siqueira. presença de células dendríticas ativadas e das células T CD4⁺CD25^{hi} na miocardite aguda e crônica da doença de chagas, em camundongos de linhagens resistente e susceptível. 97 f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

A doença de Chagas é caracterizada por apresentar duas fases com curso clínico bastante variável. Na fase aguda ocorre uma intensa miocardite, sendo o parasita facilmente detectado no sangue periférico e nos tecidos. A fase crônica cardíaca é caracterizada por uma cardiopatia, com intensa destruição das fibras cardíacas, presença de áreas de fibrose e escassos parasitas. Os mecanismos envolvidos na patogenia dessa miocardite ainda não são muito claros. Acredita-se que as células reguladoras e as células dendríticas estejam envolvidas nesse processo. Para compreender os mecanismos envolvidos, na resposta inflamatória à infecção pelo *T. cruzi*, resolvemos investigar a participação das células dendríticas, das células reguladoras e o perfil dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, utilizando duas linhagens de camundongos isogênicos, que apresentam diferentes graus de susceptibilidade a infecção. Em nossos resultados constatamos que os camundongos DBA/1 apresentaram maior sobrevida à fase aguda (90%), mesmo tratando os camundongos A (70%) com benzonidazol por três dias consecutivos, com o intuito de diminuir a carga parasitária prevenindo a alta mortalidade. A resistência dos DBA/1 e a susceptibilidade dos A, a infecção pelo *T. cruzi*, estaria relacionada ao perfil da resposta inflamatória e regulatória desenvolvida no decorrer da doença. Observamos que os camundongos DBA/1 possuem mais células dendríticas ativadas no baço e coração e mais células T CD4⁺CD25^{hi} do que os camundongos da linhagem A. Essa diferença do perfil de resposta pode estar provocando uma maior expansão e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ pelas células dendríticas, levando ao controle da carga parasitária.

Palavras chave: doença de Chagas, células dendríticas, Treg

PORTELLA, Renata Siqueira. presence of activated dendritic cells and CD4⁺CD25^{hi} cells in acute and chronic myocarditis chagas disease wounds, in inbred strains of mice resistant and susceptible. 97 f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Chagas' disease, due to *Trypanosoma cruzi* infection is characterized by the development of two phases with a variable clinical course. During the acute phase there occurs a severe myocarditis with the parasite being easily detected in peripheral blood and tissues. The chronic cardiac phase is characterized as a chronic cardiopathy, when severe destruction of cardiac myocytes and fibrosis are present and parasites are rare. The mechanisms involved in the pathogenesis of this myocarditis are somewhat obscure. It is believed that regulatory and dendritic cells play a role in this process. In an attempt to clarify the mechanisms involved in the inflammatory response to infection with *T. cruzi* we decided to investigate the participation of dendritic and regulatory cells and of TCD4 and TCD8 lymphocytes, using two strains of isogenic mice, which exhibit different degrees of susceptibility to infection. Our results have shown that the DBA/1 mice presented a higher survival (90%) in the acute phase than the A mice (70%), even when these were treated with Benznidazole for three consecutive days, with the objective of to reduce the parasitemia and the high mortality. Resistance of DBA/1 mice and susceptibility of A mice could be related to the evolution of the inflammatory and regulatory responses, during the infection. It was seen that DBA/1 mice disclosed a higher number of activated dendritic cells in the spleen and heart and a higher number of T CD4⁺CD25^{hi} than the mice of A strain. This differences of the response could be influencing in the TCD4 differentiation and on the control of parasitic load.

Keys words: Chagas disease, dendritic cells, Treg.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Análise da parasitemia dos animais DBA/1 e A infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	47
Figura 2	Índice de sobrevivência dos camundongos DBA/1 e A infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	48
Figura 3	Análise histopatológica do coração dos animais DBA/1 e A livre de infecção.	49
Figura 4	Análise histopatológica dos camundongos da linhagem DBA/1 sacrificados com 1 ano de infecção	50
Figura 5	Análise histopatológica dos camundongos da linhagem DBA/1 sacrificados com 1 ano de infecção	53
Figura 6	Pesquisa de antígenos do <i>T. cruzi</i> no coração de camundongos DBA/1 e A submetidos à imunohistoquímica pela técnica da imuno-peroxidase.	56
Figura 7	Número absoluto de células inflamatórias CD4+ e CD8 no baço de animais das linhagens DBA/1 e A.	57
Figura 8	Frequência das populações das células CD4+ e CD8+ nos animais das linhagens DBA/1 e A.	59
Figura 9	Número absoluto e frequência das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} no baço dos animais das linhagens DBA/1 e A.	60
Figura 10	<i>Dot Plots</i> para marcação das populações CD4+ e CD25 ^{hi} na células do baço em animais das linhagens DBA/1 e A.	61
Figura 11	<i>Dot Plots</i> para marcação das populações CD4+ e CD25 ^{hi} na células do coração em animais das linhagens DBA/1 e A.	62
Figura 12	Porcentagem das células de memória efetora (CD4 ⁺ CD62L ⁻ e CD8 ⁺ CD62L ⁻) nos animais das linhagens DBA/1 e A.	63

Figura 13	Número absoluto e frequência das populações de células dendríticas em animais das linhagens DBA/1 e A.	64
Figura 14	Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) do CD80 e CD86 sobre as populações de células dendríticas em animais das linhagens DBA/1 e A.	65
Figura 15	Número absoluto e frequência das populações de células dendríticas expressando CD40 em animais das linhagens DBA/1 e A.	67
Tabela 1	Aspecto comparativo entre os estudos histopatológico e sorológico em camundongos DBA/1 infectados com a cepa Colombiana.	51
Tabela 2	Aspecto comparativo entre os estudos histopatológico e sorológico em camundongos A infectados com a cepa Colombiana.	54
Tabela 3	Estudo comparativo entre as linhagens resistentes e susceptíveis quanto à intensidade da inflamação e fibrose, parasitismo, sorologia e sobrevida.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
Bio ou BIO	Biotina
BSA	Albumina bovina
CD	Grupo de diferenciação
CDI	Células dendríticas intersticiais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CTLA-4	do inglês, <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DAB	Diamino benzidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTU's	<i>Discrete typing units</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
Foxp3	do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
kDNA	DNA mitocondrial do parasita
LFA	Leukocyte Function Associated Antigen
MDSC	Célula supressora de origem mieloide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
µm	Micron
µl	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitro

NK	Linfócito <i>Natural Killer</i>
NKT	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
Pcy5	Ficoeritrina-Cianina 5
PE	Ficoeritrina
RPM	Rotação por minutos
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
TCR	Receptor de célula T
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
WHO	World Health Organization

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	Histórico	17
1.2	O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3	Classificação das cepas	19
1.4	A doença de Chagas	20
1.5	Patologia e patogenia da Doença de Chagas	22
1.6	Resposta Imune contra o <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
1.7	Células T reguladoras (Treg)	28
1.8	Apresentação de antígenos pelas células dendríticas	31
1.9	A influencia da linhagem de camundongos quanto a resistencia e a suceptibilidade à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .	35
2.	HIPOTÉSE DE INVESTIGAÇÃO	37
3.	JUSTIFICATIVA	38
4.	OBJETIVO GERAL	39
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	39
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	Animais experimentais	40
5.2	Cepa utilizada	40
5.3	Inóculo	41
5.4	Grupos experimentais	40
6.	METODOLOGIA	41
6.1	Parasitemia	41

6.2	Mortalidade	41
6.3	Eutanásia	41
6.4	Histopatologia	42
6.5	Sorologia	42
6.6	Imunohistoquímica para antígenos do <i>T. cruzi</i>	43
6.7	Citometria de Fluxo	44
6.7.1	Marcação de Células Dendríticas	45
6.7.2	Marcação de células Inflamatórias, de Memória e Regulatórias	46
6.8	Análise Estatística	46
7.	RESULTADOS	47
7.1	Análise Parasitemica	47
7.2	Índice de Sobrevida	48
7.3	Análise Histopatológica	48
7.3.1	Camundongos das linhagens DBA/1 e A sem infecção	48
7.3.2	Linhagem DBA/1	49
7.3.3	Linhagem A	52
7.4	Pesquisa de Antígenos Parasitários	55
7.5	Análise por Citometria	57
7.5.1	Quantificação de Linfócitos T CD4 ⁺ E CD8 ⁺	57
7.5.2	Frequência das Populações de Linfócitos T	58
7.5.3	Frequência da População de Células CD4+CD25 ^{hi}	59
7.5.4	Frequência das Populações de Células de Memórias efetora	62
7.5.5	Caracterização das células dendríticas do baço e miocárdio	63
7.5.6	Intensidade de Expressão do CD80 e CD86 pelas Células Dendríticas	65

7.5.7	Frequência das células dendríticas expressando CD40	66
8.	DISCUSSÃO	68
9.	CONCLUSÃO	77
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	79
11.	ANEXOS	

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 quando Carlos Chagas investigava um surto de Malaria entre operários que trabalhavam na construção da estrada de ferro Central do Brasil, na região Norte de Minas Gerais.

Comunicado pela população local da existência de insetos hematófagos, popularmente conhecidos como “Barbeiro”, os quais eram constantemente vistos nas proximidades das residências, Chagas resolveu investigar se esses insetos eram capazes de transmitir algum tipo de doenças para a população. Enviou alguns exemplares para o Rio de Janeiro, para que fossem alimentados em *Callithrix penicillata* livres de infecção (Chagas, 1909).

Passados os dias, examinando os animais, Oswaldo Cruz observou a presença de protozoários flagelados no sangue periférico, com sua morfologia inteiramente diferente de qualquer espécie conhecida do gênero *Trypanosoma*. Carlos Chagas resolveu então examinar os habitantes das casas infestadas pelos “barbeiros”, notando a presença de um gato infectado e posteriormente uma criança febril, que apresentava formas do parasita circulando na corrente sanguínea (CHAGAS; 1909). Depois de diversos estudos, Chagas classificou o protozoário como *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mestre Dr. Oswaldo Cruz (Chagas, 1909).

1.2 - O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado encontrado tanto no sangue como nos tecidos dos seus hospedeiros. Pertence ao reino Protista e sub-reino Protozoa. Está incluído no filo Sarcomastigophora, na classe Kinetoplastidea e ordem Kinetoplastida, por possuir uma única mitocôndria, apresentando no cinetoplasto o kDNA, com minicírculos e maxicírculos. Pertence à família *Trypanosomatidae*, ao gênero *Trypanosoma* e ao subgênero *Schizotrypanum*, sendo o parasita da espécie *Trypanosoma cruzi*, tendo como hospedeiro invertebrado, numerosas espécies de hemíptera hematófagos da família Reduviidae (DE SOUZA, 2000)

A transmissão aos vertebrados ocorre no momento em que o triatomíneo infectado faz o repasto sanguíneo, eliminando fezes com formas tripomastigotas metacíclicas. Ao coçar o local da picada, os parasitas penetram através da pele, caindo na corrente sanguínea, onde irão infectar as células teciduais, principalmente musculares e macrófagos. No interior destas células, o parasito adquire a forma amastigota (arredondada), iniciando a sua multiplicação por divisão binária.

Os parasitas apresentam diferentes formas, durante o curso da infecção. Dependendo da cepa, podem predominar formas delgadas, formas largas e às vezes muito largas (BRENER & CHIARI, 1963). As formas largas são mais resistentes ao sistema imunológico do hospedeiro e permanecem por mais tempo no sangue periférico, enquanto as formas delgadas penetram rapidamente nos tecidos e são mais susceptíveis (BRENER, 1969).

1.3 - Classificação das cepas

Amostras do *T. cruzi* obtidas de casos humanos, de animais silvestres naturalmente infectados ou de triatomíneos são isoladas e mantidas em laboratório, através de passagens em animais suscetíveis ou por meio de cultura (LUMSDEN, 1970). Essas amostras isoladas foram denominadas pelos pesquisadores como cepas.

As cepas do *T. cruzi* são populações multiclonais (TIBAYRENC, et al., 1986) que diferem nas suas características genéticas e biológicas, apresentando diferentes graus de virulência, patogenicidade e tropismo tecidual. Com o objetivo de compreender as variações de comportamento biológico e o perfil genético, diferentes pesquisadores resolveram classifica-las de acordo com as características biológicas como tipos biológicos (ANDRADE, 1974), posteriormente designados como Biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), pelos perfis isoenzimáticos como Zimodemas (MILES, et al., 1986, ROMANHA, 1988) e pelas características genéticas como Esquizodemas (MOREL, et al., 1980, 1986, GONÇALVES, et al., 1984).

Em 1999, na Fiocruz do Rio de Janeiro, ocorreu o Simpósio Internacional Sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas “*Satellite Meeting*”, quando os pesquisadores propuseram uma nova classificação para o *T. cruzi* (ANONYMOUS, 1999), subdividindo em *T. cruzi I* e *T. cruzi II*, englobando os parâmetros biológicos (Biodemas), bioquímicos (Zimodemas) e moleculares (Esquizodemas) já consolidados, e as classificações filogenéticas baseadas nas análises de multiloci enzimáticos (TIBAYRENC & AYALA, 1987), do DNA

ribossomal (SOUTO et al., 1996) e nos genes do mini-exon (FERNANDES, et al., 1999).

Dez anos depois, completando 100 anos da descoberta da doença de Chagas (2009) outro grupo de pesquisadores (ZINGALES, et al., 2009) se reuniu em um segundo “*Satellite Meeting*” com o intuito de atualizar a nomenclatura do *T. cruzi* e melhorar a comunicação dentro da comunidade científica. Para isso, foi criado um novo consenso classificando as cepas do *T. cruzi*, baseadas nas DTU's (*discrete typing units*) referidas como *T. cruzi* I a VI (ZINGALES, et al., 2009).

NOVA NOMENCLATURA		
Designação DTU	Abreviação	Nomenclaturas mais antigas
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I e DTU I
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II e DTU IIb
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc e <i>T. cruzi</i> III
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3, Z3-B e DTU IIa
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2, rDNA 1/2, clonet 39 e DTU II d
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2, Zymodeme B e DTU IIe

(Zingales et al., 2009)

1.4 - A doença de Chagas

A doença de Chagas é uma tripanossomíase do Continente Americano, com predominância na América do Sul, sendo o Brasil, a Argentina, o Equador e a Venezuela os países mais afetados (WHO, 2010). Essa enfermidade é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas é considerada um sério problema de saúde pública, estimando-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam

infectadas em todo o continente americano e que 60 milhões vivam nas áreas de risco (WHO, 2010).

O programa de controle do vetor, através da aplicação de inseticidas ou melhoria habitacional, resultou em uma significativa redução da transmissão vetorial (DIAS, et al., 2002). Apesar da redução de casos novos, a doença de Chagas pode ser transmitida de diversas maneiras, sendo que a transmissão vetorial (SILVEIRA et. al. 2011), transfusional (PEREIRA, et al., 2011; BWITITI, et al., 2012), congênita (BITTENCOURT, 1976; FREILIJ & ALTCHER, 1995) e oral (CALVO MENDEZ, et al., 1992; VALENTE, et al., 1999, 2009; PINTO et al., 2001; CAMANDARROBA, et al., 2002; COURA, 2006) são as mais evidentes. Casos esporádicos de infecção ainda costumam aparecer, mostrando que a doença está longe de ser eliminada. Em 2005, no estado de Santa Catarina (SC), um surto de transmissão oral da doença de Chagas aguda chamou atenção de todo o país, contaminando 24 pessoas por ingerir um caldo-de-cana contaminado pelo *T. cruzi* (STEINDEL, et al., 2008). ANDRADE, et al., (2011) caracterizaram as cepas do *T. cruzi* originadas de Santa Catarina, constatando que algumas cepas isoladas de marsupiais, de triatomíneos da região e de pacientes contaminados mostraram dupla infecção (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II).

A doença de Chagas evolui em duas diferentes fases, com curso clínico bastante variável. A fase aguda geralmente inicia-se com o aparecimento do sinal de Romanã ou chagoma de inoculação, podendo desencadear alguns sinais e sintomas como febre, cefaléia, mal-estar e hepatoesplenomegalia (WHO, 2002). Nessa fase podemos detectar facilmente o parasita nos tecidos

e sangue periférico, e as lesões cardíacas e a meningoencefalite podem ser graves levando ao óbito cerca de 7 a 10% dos casos sintomáticos (ANDRADE, 2000). Os sintomas da doença de Chagas podem ser confundidos com os de outras infecções, com isso, a infecção aguda pode passar despercebida. Após a fase aguda, os sobreviventes passam para a fase crônica. Esta pode permanecer por um longo período assintomático, que é chamado de forma indeterminada (latente). Nesse período, as lesões cardíacas são discretas e os pacientes não apresentam alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos do coração e tubo digestivo, sendo a doença detectada através de sorologia e do xenodiagnóstico (WHO, 2002). Com o passar dos anos, cerca de 10% dos indivíduos soro positivos irão desenvolver os megas do aparelho digestivos (RESENDE, 2000) e 30% a 40% as alterações crônicas cardíacas, apresentando arritmias, bloqueios átrio ventriculares, bloqueio do feixe de Hiss, aumento da área cardíaca, podendo ocasionar, insuficiência cardíaca congestiva (LARANJA, et al., 1953 & MARIN-NETO, et al., 1999), que são as formas crônicas sintomáticas. Durante essa fase os parasitas são escassos e as lesões inflamatórias observadas, estão provavelmente relacionadas com o processo de hipersensibilidade tardia e a persistência de antígenos parasitários (ANDRADE, 2000).

1.5 - Patologia e patogenia da doença de Chagas

A doença de Chagas inicia-se com a penetração do *T. cruzi* nas células do hospedeiro vertebrado, causando a sua multiplicação e o aparecimento de uma resposta inflamatória contra o parasita. Essa inflamação atinge principalmente

o coração, desencadeando uma intensa miocardite aguda, caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios difusos, com predominância de células mononucleares, sendo frequentemente acompanhada de necrose de células parasitadas e não parasitadas (ANDRADE, et al., 1984). Através da microscopia eletrônica, ANDRADE, et al., em 1994, perceberam que a destruição celular pode ocorrer nas áreas de contato de miócitos com linfócitos (granular e agranular) e macrófagos.

Após a fase aguda, a infecção é controlada pela resposta imune do hospedeiro, desenvolvendo um estado de equilíbrio, o que chamamos de forma indeterminada. Nessa forma as lesões inflamatórias são discretas e focais sendo difícil a detecção do parasita (ANDRADE, 2000). Em um estudo ultraestrutural, realizado por ANDRADE, et al., (1994), foi demonstrado que o infiltrado inflamatório é composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e poucos polimorfonucleares. Essas células estão localizadas em áreas focais do miocárdio, sem estabelecer um contato direto com os miocardiócitos e sem apresentar a destruição tecidual que é encontrada na fase aguda.

Com o passar do tempo, cerca de 30 a 40% dos indivíduos infectados podem desenvolver as alterações crônicas cardíacas, com presença de um intenso e difuso infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de necrose e formação de fibrose (MARIN-NETO, et al., 1999; ANDRADE, et al., 1991, 1999, 2000). As lesões ocorridas na fase crônica da doença são responsáveis pela hipertrofia do coração, insuficiência cardíaca, fenômenos tromboembólicos, arritmias variadas e morte súbita (ANDRADE, 2000). Apesar do coração ser o órgão mais afetado na doença de Chagas, 10% dos indivíduos infectados

desenvolvem os megas do aparelho digestivo (RESENDE, 2000). Isso ocorre devido à perda de neurônios que afeta os movimentos peristálticos, desencadeando a hipertrofia da camada muscular do esôfago e do cólon (KOBERLE, 1958a, 1958b).

A miocardite encontrada nos indivíduos cronicamente infectados, não está correlacionada com a carga parasitaria (ANDRADE, 1999). Os parasitas são dificilmente detectados nos locais de maior destruição tecidual, sugerindo que a resposta patogênica na doença de Chagas, não seja apenas contra antígenos do parasita, mas também contra antígenos próprios, caracterizando uma doença autoimune (SOARES, et al., 2001). Existe a possibilidade de que a autoimunidade seja induzida pelo compartilhamento de epítomos entre o parasita e o hospedeiro (mimetismo molecular) (CUNHA-NETO, et al., 1995). As lesões teciduais são inicialmente causadas pela infecção, ocasionando a destruição do miocárdio e com isso, a liberação da miosina que apresenta epítomos com sequencias de aminoácidos semelhantes aos epítomos B13 do *T. cruzi* (CUNHA-NETO, et al., 1995, 2001). Entretanto, a doença de Chagas não apresenta a maioria dos principais critérios para ser considerada como uma doença autoimune (BENOIST & MATHIS, 2001). Uma revisão realizada por ANDRADE (1999), sugere que a grande variação das idades dos pacientes no começo das manifestações clínicas, a falta de períodos de exacerbação e remissão, a ausência típica de um elevado e constante nível de auto-anticorpos e a falta de envolvimento de outros órgãos, diferenciam a doença de Chagas de um processo autoimune.

Se a doença de Chagas fosse uma doença autoimune, que não dependesse da contínua estimulação do parasita, porque a gravidade da mesma aumentaria, quando o indivíduo sofre reinfecções? (MACEDO, et al., 1976; STORINO, et al., 2002; BUSTAMANTE, et al., 2003; ANDRADE, et al., 2006). Como explicar o decréscimo da morbidade em grupos de pacientes que fizeram tratamento quimioterápico com drogas antiparasitárias? (VIOTTI, et al., 1994). Por que os pacientes que soro negativaram, com o passar do tempo, após o tratamento específico não desenvolvem a doença autoimune? Como explicar a regressão das lesões fibrotico-inflamatório em camundongos tratados? (ANDRADE, et al., 1991) Essas são perguntas que fortalecem a hipótese da persistência do parasito para o desenvolvimento das graves lesões encontradas na doença de Chagas crônica.

Os danos teciduais encontrados no coração na fase crônica da doença foram associados com a persistência do parasita nos tecidos, através da utilização de técnicas mais sensíveis, como a PCR (JONES, et al., 1993), a imunohistoquímica (HIGUCHI, et al., 1993) e a imunofluorescência *in situ* (YOUNÈS-CHENNOUFI, et al., 1998). A presença de antígenos parasitários também foi encontrada em células dendríticas intersticiais do miocárdio, no modelo do cão (ANDRADE, 2000) e do camundongo (PORTELLA & ANDRADE, 2009), sugerindo que as mesmas são responsáveis pela estimulação antigênica de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Apesar da possível influência dos mecanismos autoimunes nas lesões teciduais, o papel do parasita deve ser melhor estudado, principalmente se considerarmos que o tratamento curativo poderá proporcionar a regressão das

lesões (VIOTTI, et al., 1994) e uma melhora no quadro clínico dos pacientes chagásicos.

1.6 - Resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi*

A resposta imune do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* se inicia com múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata atuando na destruição direta dos parasitas.

A proliferação exagerada dos parasitas nos tecidos pode levar à morte de animais mais susceptíveis. Esse efeito pode ser reduzido pela secreção de citocinas pro-inflamatórias pelos macrófagos, células dendríticas e células NK. Vários estudos têm demonstrado que o Interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral (TNF- α), e a interleucina-12 (IL-12) são importantes para o controle da infecção, assegurando a indução de uma eficiente resposta adaptativa do hospedeiro, porém podem exercer efeitos tóxicos letais se produzidas em excesso (ABRAHAMSOHN, 1998; GOLDEN & TARLETON, 1991; TORRICO, et al., 1991; WIRTH, et al., 1985). No entanto, quando são utilizadas linhagens de camundongos resistentes, a mortalidade é prevenida por uma combinação dos efeitos antiparasitários induzidos por citocinas Th1 com os efeitos antagônicos que citocinas regulatórias anti-inflamatórias, tais como o TGF- β e a IL-10, exercem sobre as primeiras (DOS REIS & LOPES, 2000).

Investigando a ação do TNF- α , LIMA, et al. (2001), detectaram uma forte expressão dessa citocina nos locais de parasitismo e de destruição celular,

sugerindo que o TNF- α possa desempenhar um papel importante no desencadeamento de necrose no baço associada com a grave infecção experimental pelo *T. cruzi*.

A associação entre o TNF- α e o IFN- γ produzido por células NK ativa os mecanismos microbicidas dos macrófagos (CARDILLO, et al., 1996). Entre eles está a produção de moléculas reativas de oxigênio, como o NO e peroxinitrito, em decorrência da indução da síntese de iNOS após estimulação com IFN γ , exibindo uma atividade tóxica sobre o *T. cruzi* (MUNÓZ-FERNANDEZ, et al., 1992).

A resposta imune adquirida caracteriza-se pela ativação e expansão clonal de linfócitos específicos, assim como, pelo aparecimento da memória imunológica (FEARON & LOCKSLEY, 1996). No entanto, na infecção pelo *T. cruzi* ocorre intensa ativação policlonal de linfócitos T e B, com hiperprodução de imunoglobulina (Ig) (ORTIZ-ORTIZ, et al., 1980; MINOPRIO, et al., 1986). A detecção de anticorpos específicos está relacionado com a queda da parasitemia, e os isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b estão envolvidos na eliminação de formas sanguíneas do parasita (BRODSKYN, et al., 1989).

Os macrófagos e as células dendríticas ativados pela resposta inata adquirem a capacidade de processar e apresentar peptídeos antigênicos do *T. cruzi*, associados às moléculas de MHC classe I e classe II aos linfócitos T (HART & McKENZIE, 1990; TARLETON, 2007). As células T CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados via MHC de classe II e secretam citocinas, tais como o IFN- γ , que induzem mecanismos microbicidas em macrófagos (TARLETON, et al., 1996). Por outro lado, as células T CD8⁺ reconhecem antígenos

parasitários expressos em moléculas de MHC classe I das células infectadas, produzindo IFN- γ , ativando os macrófagos na destruição de formas intracelulares do parasita, bem como na destruição das células infectadas (TARLETON, et al., 1996). A importância da célula CD8 está no fato de que, o *T. cruzi* é capaz de infectar praticamente qualquer tipo de célula nos diversos tecidos do hospedeiro (LENZI, et al., 1996). De fato, animais *nude* (desprovido de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) não controlam a infecção pelo *T. cruzi* e morrem precocemente devido a uma elevada carga parasitária (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979).

A atividade de linfócitos T contra o parasita pode também ser responsável pelos infiltrados inflamatórios e pela lesão nos tecidos do hospedeiro (TARLETON, 1995). É importante lembrar que o sistema imune não consegue eliminar o *T. cruzi*, permanecendo este em níveis subpatentes durante toda a fase crônica. Esta persistência parasitária estaria relacionada com a habilidade de escape do parasita e os mecanismos regulatórios do hospedeiro (DOS REIS, 2011). Estes mecanismos regulatórios servem para limitar os danos teciduais, mas também podem impedir a eliminação do parasita suprimindo as respostas imunes (BELKAID & ROUSE, 2005)

1.7 - Células T reguladoras (Treg)

As células T reguladoras (Tregs) têm sido descritas na regulação das respostas imunes a antígenos próprios (SAKAGUCHI, 2000 e 2004), a antígenos exógenos (KRETSCHMER, et al., 2005) e até mesmo a agentes infecciosos

(MENDEZ, et al., 2004; HISAEDA, et al., 2004; VITELLI-AVELAR, et al., 2005; DE ARAUJO, et al., 2011), limitando os danos teciduais causados pela intensa resposta imune.

As células Treg são geradas no timo e nos órgãos linfoides periféricos, principalmente naqueles associados à mucosa e constituem de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas em animais e humanos (BAECHER-ALLAN, et al., 2001; MILLS, 2004; MUCIDA, et al., 2009). Essas células são uma subpopulação das células T CD4⁺ que expressam o marcador de superfície CD25 e o fator de transcrição Foxp3 (SAKAGUCHI, 2005). A expressão do gene Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁺ e a ausência de expressão deste gene em células T virgens e em células T CD4⁺CD25⁻ recém-ativadas, sugerem que a expressão do Foxp3 é um fator determinante no desenvolvimento das células T reguladoras (FONTENOT, et al., 2003; KHATTRI, et al., 2003; HORI, et al., 2004).

As células Treg têm a capacidade de controlar o potente efeito patológico da resposta efetora durante a infecção (COOLS, et al., 2007), mas também podem impedir a eliminação completa do parasita, suprimindo as respostas imunes (BELKAID & ROUSE, 2005). Acredita-se que um dos mecanismos pelos quais as células Treg regulam a resposta imune seja através da modulação das células dendríticas, reduzindo com isso a sua capacidade de ativar os linfócitos T (TANG & KRUMMEL, 2006). Dessa forma, as moléculas co-estimulatórias inibidoras presentes nas células TCD4⁺CD25⁺, tais como o CTLA-4, podem ser um importante mecanismo utilizado por essas células para induzir a supressão das APCs (BAECHER-ALLAN, et al., 2001).

Atualmente existe uma controvérsia sobre a participação das células Treg na infecção pelo *T. cruzi*. Investigando o papel das células Treg endógenas durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, KOTNER & TARLETON (2007) concluíram que essas células não parecem desempenhar papel importante na regulação das células T CD8⁺ efetoras. Já FLORES-GARCIA e colaboradores (2013) afirmam que as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3 desempenham um papel positivo no decorrer da infecção aguda pelo *T. cruzi* induzindo atividade supressora que controlaria a precoce inflamação cardíaca, prolongando a sobrevivência dos animais, mas ao mesmo tempo, facilitando a multiplicação parasitária. MARIANO, et al., (2008) demonstraram que as células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ GITR⁺ migram para o coração de camundongos infectados e que a depleção dessas células pelo tratamento com anti-CD25 ou anti-GITR resultou no aumento da mortalidade.

Estudando o efeito da inativação dos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, SALES, et al., (2008) verificaram que com a inativação dessas células, os animais tiveram uma menor parasitemia e mortalidade. Sugerindo que o aumento da resistência estaria correlacionada com o aumento da ativação das células T CD4⁺ efetoras.

A presença de células T reguladoras em humanos pode controlar as funções efetoras dos linfócitos T na infecção pelo *T. cruzi*. VITELLI-AVELAR, et al., (2005), investigando as células Treg em diferentes formas clínicas da doença de Chagas, concluíram que os indivíduos na forma indeterminada da doença têm uma maior frequência de células Treg quando comparado aos indivíduos

na forma cardíaca e aos não infectados, sugerindo que a expansão dessas células pode ser benéfica, limitando a citotoxicidade aos cardiomiócitos e prevenindo as lesões cardíacas.

Dessa mesma forma, DE ARAÚJO, et al., (2012) avaliando o perfil fenotípico e os mecanismos utilizados pelas células Treg em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, verificaram que os pacientes na fase indeterminada produziam elevados níveis de IL-17, IL-10 e granzima B, enquanto que os pacientes com a forma cardíaca apresentam maior frequência de IL-6, IFN- γ , TNF- α e CTLA-4. Sugeriram que essas células têm um papel importante no controle da exacerbada resposta imune, provavelmente modulando a secreção de citocinas ou indiretamente eliminando as células efectoras.

1.8 - Apresentação de antígenos pelas células dendríticas

As células apresentadoras de antígenos (APC) participam ativamente durante todo o desenvolvimento de um processo inflamatório. Dentre essas células, destacamos as células dendríticas, como sendo responsáveis pela ativação dos linfócitos T antígeno-específicos. Estas células são originadas na medula óssea e após sua maturação, podem ser encontradas tanto nos tecidos linfóides como nos não linfóides (HART & MCKENZIE, 1990). As células dendríticas respondem a vários estímulos no local da inflamação e uma vez ativadas, pelos microorganismos e estímulos inflamatórios, elas capturam e processam os antígenos, migrando para os linfonodos ou para o baço onde

irão emitir sinais específicos para a ativação dos linfócitos T. Esses sinais são primeiramente a ligação do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) ao receptor das células T (TCR), e posteriormente um sinal co-estimulador através das moléculas CD40, CD80, CD86 e de adesão LFA e ICAM (HART & McKENZIE, 1990; McADAM, et al., 1998). A habilidade das células dendríticas para liberar o sinal co-estimulador é principalmente induzido por agentes infecciosos. Protozoários parasitas podem modular a função acessória das APCs de um modo negativo. Em particular, a infecção *in vitro* de células dendríticas humanas pelo *T. cruzi* induz um defeito no processo de maturação, causando uma baixa expressão das moléculas HLA-DR e moléculas co-estimuladoras CD40, prejudicando a produção de TNF- α e IL-12 (VAN OVERTVELT, et al., 1999). Vários estudos têm mostrado que o IFN- γ , o TNF- α , e a IL-12 são importantes para o controle desta infecção, assegurando a indução de uma eficiente resposta adaptativa do hospedeiro (ABRAHAMSOHN, 1998; ALIBERTI, et al., 1996; GOLDEN & TARLETON, 1991). Estudando o perfil de moléculas co-estimuladoras e a expressão de citocinas pelas APCs de camundongos resistentes ou suscetíveis à infecção com *T. cruzi*, PLANELLES, et al., (2003) detectaram uma elevada expressão de citocinas IL-12 e TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 (resistentes) infectados, o que não foi observado nos macrófagos dos camundongos BALB/c (susceptíveis). Estes autores detectaram também diminuição na expressão das moléculas CD40 e CD86 apenas nos macrófagos e nas células dendríticas de camundongos BALB/c. Sabemos que a ausência de sinais co-estimuladoras durante a apresentação de antígenos para as células T em repouso pode ocasionar redução na estimulação dessas células

ou levá-las a um estado de anergia (BOUSSIOTIS, et al., 1996), sugerindo que a alteração da expressão destas moléculas na fase aguda da doença pode estar associada com a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, contribuindo para a elevada mortalidade dos camundongos BALB/c após a infecção.

A persistência das lesões inflamatórias na fase crônica da doença pode estar correlacionada com a apresentação de antígenos do *T. cruzi* capturados pelas células dendríticas. A presença de antígenos específicos do parasita foi detectada em células dendríticas intersticiais do miocárdio, na miocardite da fase aguda e na forma crônica cardíaca de cães infectados pelo *T. cruzi*, tratados com ciclofosfamida em baixas doses na fase indeterminada da infecção, sugerindo que as mesmas são responsáveis pela estimulação antigênica de linfócitos T CD4⁺ (ANDRADE, 2000) e manutenção da miocardite na doença de Chagas. A participação dessas células na manutenção das lesões cardíacas na fase crônica da doença de Chagas foi posteriormente investigada no modelo do camundongo. PORTELLA & ANDRADE (2009), constataram que as células dendríticas intersticiais, contendo antígenos do *T. cruzi*, estavam presentes em todos os casos examinados. O decréscimo da inflamação após o tratamento com benzonidazol era proporcional ao número de CDIs, confirmando a hipótese de que as mesmas participam na manutenção da resposta imunológica de hipersensibilidade tardia nestes animais.

Estudando a expressão diferencial de moléculas co-estimuladoras e modulação de citocinas por monócitos e linfócitos T de indivíduos normais, pacientes assintomáticos e com a forma cardíaca grave da doença de Chagas, SOUZA, et al., (2007) observaram diminuição da intensidade da expressão do CD86

pelos monócitos de pacientes com a forma cardíaca, e uma maior proporção de IL-10 e TNF- α em células de pacientes com a forma indeterminada, sugerindo que o parasita induz um equilíbrio na regulação da produção de citocinas entre células de pacientes de forma indeterminada, mas não de pacientes portadores da forma cardíaca.

Interações iniciais entre as células natural killer (NK) e as células dendríticas moldam a resposta imune na fronteira da imunidade inata e adaptativa. Esta interação pode conduzir à ativação das células NK, das células dendríticas ou apoptose, dependendo do estado de ativação de ambos os tipos celulares (WALZER, et al., 2005). Em um estudo realizado por BATALLA, et al., (2013), apurando o papel das células natural killer (NK) na regulação e maturação das células dendríticas, em camundongos infectados com uma cepa virulenta do *T. cruzi*, observaram que após a infecção, houve redução da capacidade das células NK de induzir a maturação das CD derivadas da medula ossea.

ALBA SOTO, et al., (2003), utilizando duas cepas de diferentes virulências, perceberam que a modulação da expressão da molécula de MHC classe II nas células dendríticas intersticiais depende da virulência da cepa. Cepas mais virulentas inibem ou reduzem a expressão da molécula de MHC classe II na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC), enquanto cepas menos virulentas preservam a maturação dessas células, permitindo que o hospedeiro possa melhor controlar a carga parasitária e sobreviver na infecção aguda. Na fase crônica da infecção, as células dendríticas dos camundongos infectados com a cepa virulenta restauraram os níveis da expressão de moléculas de MHC classe II semelhantes aos encontrados nos camundongos infectados com

a cepa susceptível, obtendo uma elevada regulação da expressão de moléculas co-estimuladoras, sugerindo que a imunossupressão causada por esta cepa é apenas transitória. Esses resultados sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* pode modular a função das APCs em particular das células dendríticas.

1.9 - A influencia da linhagem de camundongos quanto a resistência e a susceptibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Na pesquisa científica, a escolha da linhagem de camundongo deve estar de acordo com o problema a ser investigado, levando em conta, o conhecimento prévio das potencialidades de sua resposta.

PIZZI & PRAGER (1952) observaram, em linhagens de camundongos, diferenças de susceptibilidade a infecção ao *T. cruzi*, sendo os camundongos C3H mais susceptíveis à infecção do que os da linhagem Swiss. ANDRADE, et al., (1985), estudando seis diferentes linhagens de camundongos (A, AKR, C3H, BALB/c, C57BL/10 e DBA/1) detectaram diferentes graus de susceptibilidade à infecção com as cepas Peruana, 21SF e Colombiana do *T. cruzi*, concluindo que uma mesma linhagem pode ser mais resistente à infecção com uma determinada cepa e mais susceptível à outra, embora de uma maneira geral, as linhagens DBA e C57BL/10 sejam mais resistentes, apresentando um menor índice de mortalidade e os das linhagens A e AKR foram os mais susceptíveis.

ANDRADE, et al., (1985) analisando o comportamento dos diferentes tipos de cepas, na infecção de seis diferentes linhagens isogênicas de camundongos,

verificaram que as cepas do *T. cruzi* mantiveram as suas características básicas, independente da linhagem analisada, e que o número de parasitas circulantes não se correlaciona com o parasitismo tissular. Animais mais susceptíveis nem sempre apresentam maior parasitismo.

Linhagens de camundongos isogênicos têm sido usadas para obter infecções padronizadas, garantidas pelo padrão genético. DE TITTO (1994) postulou que, embora a resposta imune tenha papel importante na resistência, à sobrevivência está mais relacionada com o padrão genético dos animais do que com os produtos dos locus H-2. Analisando o padrão genético, BOYER, et al., (1983) comprovaram que a infecção em camundongos portadores de um único gen *Ipr*, ligado à linfoproliferação, controla certas reações autoimunes, observando que a mortalidade e a parasitemia eram mais elevadas nestas linhagens após a infecção com a cepa Y do *T. cruzi*.

ZHANG e TARLETON (1996), estudando a produção de citocinas e sua associação com as moléculas de MHC e de adesão em camundongos C57BL/6 e C3H infectados com as cepas Brasil e Sylvio, constataram que os camundongos C57BL/6, são mais resistentes à infecção e que as duas linhagens mantiveram constante a produção das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e TGF- β no miocárdio, tanto na fase aguda quanto na fase crônica.

Com base nos trabalhos de ANDRADE, et al., (1985a, 1985b), selecionamos a linhagem DBA/1 como sendo resistente a infecção pelo *T. cruzi*, e a linhagem A como susceptível. No presente trabalho investigamos alguns fatores que induzem camundongos destas linhagens a apresentar diferentes graus de resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

2 - HIPOTÉSE DE INVESTIGAÇÃO

Os diferentes graus de resistência à infecção pelo *T. cruzi* estão relacionados à intensidade de supressão das células dendríticas pelas células T CD4⁺ reguladoras de camundongos.

3 - JUSTIFICATIVA

Sabe-se que as células dendríticas intersticiais do miocárdio participam na manutenção da miocardite em camundongos cronicamente infectados pelo *T.cruzi*. e tratados com benzonidazol (PORTELLA & ANDRADE, 2009). Essas células estariam relacionadas com a intensidade da inflamação (ANDRADE, et al., (2000).

As células Treg têm a capacidade de controlar o potente efeito patológico da resposta efetora durante a infecção (COOLS, et al., 2007). Estes mecanismos regulatórios podem contribuir para limitar os danos teciduais, prolongando a sobrevivência dos animais, mas também podem impedir a eliminação do parasita suprimindo as respostas imunes (Belkaid & Rouse, 2005; FLORES-GARCIA, et al., 2013).

Por isso resolvemos investigar a influência das células dendríticas e das células T CD4+CD25^{hi} no processo patológico, e avaliar se essas células participam ativamente na resistência de algumas linhagens de camundongos à infecção pelo *T. cruzi*. Para responder a essa pergunta utilizamos duas linhagens de camundongos, uma resistente (DBA/1) e a outra susceptível (A) à infecção.

4 - OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil das células dendríticas e dos linfócitos T nas linhagens DBA/1 e A, e correlacionar esse perfil com a resistência e/ou susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*.

4.1 - OBJETIVOS ESPECIFICOS

1- Comparar as lesões teciduais em coração e músculo esquelético nos camundongos DBA/1 (resistente) e A (susceptível), infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*.

2- Demonstrar a presença de antígenos parasitários associados à membrana das células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI) e sua distribuição no tecido cardíaco na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

3- Caracterizar e quantificar as células dendríticas do miocárdio e do baço nas duas linhagens de camundongos infectados com a cepa Colombiana.

4- Quantificar as células T CD4⁺CD25^{hi} nas fases aguda e crônica da infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*.

5- Quantificar as populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ e caracterizar seu perfil de memória/ativação no curso da infecção, em camundongos das linhagens DBA/1 e A.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Animais experimentais: Para a realização desse trabalho utilizamos duas linhagens de camundongos isogênicos, DBA/1 e A, com idades de 21 a 30 dias, pesando entre 15 a 20 g, que foram mantidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) no Rio de Janeiro e quando solicitado, fornecido ao Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz. O projeto recebeu o certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 24/09/2008, com licença N° 030/08 e validade ate 30/10/2013.

5.2 - Cepa utilizada: Os animais foram infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, caracterizada como Biodema Tipo III , *T. cruzi* I.

5.3 - Inoculo: O inoculo foi de 10^4 formas tripomastigotas sangüícolas, obtidas de camundongos previamente infectados, administrado por via intraperitoneal.

5.4 - Grupos experimentais:

Os animais foram divididos em dois grupos:

- **Grupo I:** Composto por 35 camundongos infectados da linhagem DBA/1 e 10 camundongos livres de infecção.

- **Grupo II:** Composto por 59 camundongos infectados da linhagem A e 10 camundongos sem infecção.

6 – METODOLOGIA

6.1 - Parasitemia: A parasitemia dos animais infectados foi obtida através da contagem do número de formas tripomastigotas encontrados no sangue periférico, obtido pela secção da cauda de animal infectado e examinado entre lâmina e lamínula em 50 campos microscópicos de grande aumento (400X). Os resultados foram avaliados pela média obtida ao exame de 5 animais de cada grupo, num período de 45 dias pós-infecção .

Com o objetivo de diminuir a carga parasitária e controlar a mortalidade, todos os camundongos da linhagem A, infectados com a cepa Colombiana foram tratados do 27º ao 29º dia de infecção, com o benzonidazol, na dose de 100mg/kg/dia.

6.2 - Mortalidade: Foi avaliada diariamente durante o curso da infecção, em todos os dois grupos experimentais, e a sobrevivência foi avaliada pelo número de animais que sobreviveram em um período de 80 dias pós-infecção.

6.3 - Eutanásia: Os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia por exsanguinação após anestesia com ketamina e xilasina, com 30 dias e 1 ano de infecção. Os órgãos dos animais utilizados para estudo histopatológicos (coração e músculo esquelético) foram submetidos à perfusão pela injeção no ventrículo esquerdo de PBS gelado após secção da veia porta. Para análise celular por citometria de fluxo, foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas e os órgãos coletados (coração e

baço), foram macerados em PBS pH 7.2. Três controles não infectados foram eutanasiados em cada ponto de análise.

6.4 - Histopatologia: Fragmentos do coração e músculo esquelético foram fixados em formol Milloning, incluídos em parafina para a obtenção de secções de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina para estudo histopatológico.

O estudo histopatológico foi realizado em camundongos com infecção aguda e crônica pelo *T. cruzi*. Foi feita uma análise semi-quantitativa caracterizando as lesões inflamatórias de acordo com a expressão de +, ++ e +++, dos quais (+) designa *lesões discretas*, correspondendo a escassos e difusos infiltrados mononucleares e/ou pequenos focos de infiltração mononuclear; (++) corresponde a *lesões moderadas*, representada por difuso infiltrado mononuclear mais acentuado do que no grau + e focos inflamatórios localizados, com lesão focal de miócitos; (+++) representa lesões intensas que correspondem a densos infiltrados difusos e/ou infiltrados focais extensos e confluentes, com presença de necrose de miócitos.

6.5 - Sorologia: O soro dos animais dos diferentes grupos foi coletado para titulação de anticorpos pela técnica de imunofluorescência indireta. A titulação mínima de positividade é a partir de 1:40.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos coletando-se o soro. Em seguida foram preparadas diluições do soro em PBS de 1/10 a 1/1280 em placas de múltiplos poços. Lâminas contendo 10 poços foram previamente preparadas utilizando como antígeno formas de cultura do *T. cruzi* em meio Warren, fixadas em formol. Sobre as formas de cultura foram

colocados 10 µl do soro diluído em PBS 1/10 a 1/1280. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e em seguida, lavadas 3 vezes com PBS pH 7.4 durante 5 min. Posteriormente foram adicionados sobre cada poço, 10 µl do anticorpo anti-IgG de camundongo ligado à fluoresceína (Sigma), incubando as lâminas em câmara úmida durante 30 min. As lâminas após 3 lavagens com PBS pH 7.4 durante 5 min foram secadas e montadas em tampão carbonato / bicarbonato pH 9.6 (0,02 M) e analisadas em microscópio Zeiss de epifluorescência. O título mínimo de positividade foi considerando o de 1:40.

6.6 - Imunohistoquímica para antígenos do *T. cruzi*: Para a detecção de antígenos do *T. cruzi* no miocárdio e associados a células dendríticas, foi aplicada a técnica de imunoperoxidase utilizando anticorpo primário anti- *T. cruzi* produzido em coelho e como anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (No A-6154 / Sigma). Foram selecionados cinco casos de cada grupo, sendo os casos escolhidos de acordo com a intensidade dos infiltrados inflamatórios e presença de fibrose ao exame histopatológico, nos dois grupos experimentais.

Os cortes histológicos em parafina, com 5 µm de espessura, colocados em lâminas com poli-lisina, foram utilizados para marcação de antígenos parasitários do *T. cruzi* através da técnica de imunomarcacão com peroxidase por método imunohistoquímico.

Os cortes foram desparafinizados antes do início da reação. Foram feitos inicialmente 3 banhos em PBS de pH 7.4 e em seguida o bloqueio da reação com H₂O₂ a 3% diluído em metanol. As lâminas foram lavadas em água

destilada e depois em PBS. Posteriormente foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado a 10% durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS. O anticorpo primário anti-*T.cruzi* produzido em coelho foi diluído em PBS em uma diluição de 1:600 e colocado sobre o corte durante 30 minutos a 37°C. Depois os cortes passaram por banhos em PBS. Foi aplicado o soro de cabra (livre de infecção) inativado a 10% por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS, acrescentando em seguida o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma), com diluição de 1:800 em PBS, incubando a 37°C por 30 minutos. Após o anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS. A revelação foi feita com DAB (25 mg/mL) a 24% + DMSO a 10% + H₂O₂ a 1% e a coloração do núcleo com Hematoxilina a 1%. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

6.7 - Citometria de fluxo: A análise populacional dos marcadores de superfície em células dendríticas, células regulatórias (CD4⁺CD25^{hi}), células de memória efetoras e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, foram realizados através da citometria de fluxo. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. Os camundongos da linhagem A eutanasiados com 30 dias de infecção não foram tratados com benzonidazol.

O baço e o coração dos animais foram macerados em PBS gelado e depois centrifugados a 6°C, a 1000 rpm, por 15 minutos. As células esplênicas foram armazenadas temporariamente em 2 ml de meio RPMI incompleto e as células do coração foram pré-tratadas com colagenase tipo V (Sigma) na concentração de 2 mg/ml de meio RPMI incompleto a 37°C, durante uma hora. Em seguida o

restante do tecido cardíaco foi macerado e centrifugado a 6°C, 1000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado, completando com 6 ml de Percoll 80% e depois 6 ml de Percoll 40%, com cuidado para não misturar as duas soluções. O tubo contendo a mistura de Percoll e tecido cardíaco foi centrifugado a 20°C, 3000 rpm, por 30 minutos, com o objetivo de isolar as células mononucleares do infiltrado inflamatório. As células isoladas foram para um tubo falcon contendo meio RPMI incompleto e depois passaram por 2 lavagens em meio RPMI para retirar o restante do percoll. As células do baço e do tecido cardíaco foram contadas em Câmara de Neubauer (10 µl das células em Líquido de Turk, para coloração dos mononucleares e lise das hemácias) e dois milhões de células foram separadas e colocadas em cada poço. A placa foi centrifugada a 860G, por 5 segundos e acrescentado 20 µl de Fc Block em cada poço. Depois de nova incubação por 10 minutos, foram acrescentados 100 µl de tampão FACS. A placa foi centrifugada a 860G, por 5 segundos, os poços completados com 25 µl da mistura de anticorpos monoclonais conjugados a fluocromos, e incubados por 20 minutos. Após a marcação, as células foram fixadas com 0,1% de paraformoldeído em PBS e analisadas um dia depois, no FACSort (Becton and Dickinson, San Jose, CA-EUA), sendo as aquisições programadas para 300,000 células. Para análise dos dados obtidos com a leitura no FACSort, foi utilizado o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR-EUA).

Os anticorpos monoclonais e a diluição utilizada nesse experimento foram:

6.7.1 - Marcação de Células Dendríticas: anti-CD11c FITC (BD Pharmingen) com diluição de 1:100, anti-CD80 Pcy5 (eBioscience) com diluição de 1:125,

anti-CD86 PE (eBioscience) com diluição 1:200 e anti-CD40 PE (Invitrogen) com diluição de 1:100.

6.7.2 - Marcação de células Inflamatórias, de Memória e Reguladoras: anti-CD4 PE (BD Pharmingen) com diluição de 1:100, anti-CD4 FITC (BD Pharmingen) com diluição de 1:75, anti-CD8 Pcy⁵ (BD Pharmingen) com diluição de 1:150, anti-CD8 FITC (BD Pharmingen) com diluição de 1:75, anti-CD25 BIO (BD Pharmingen) com diluição de 1:200, anti-CD62L FITC (BD Pharmingen) com diluição de 1:75, anti-CD62L PE (BD Pharmingen) com diluição de 1:50.

6.8 - Análise estatística: Após verificar a normalidade amostral por meio do teste de Shapiro-Wilk, através do software IBM SPSS Statistics (IBM), utilizamos o teste t Student bilateral, paramétrico, para análise estatística dos resultados. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7 – RESULTADOS

7.1 - ANÁLISE PARASITEMICA:

Na análise da parasitemia, notamos que os camundongos das linhagens DBA/1 infectados com a cepa Colombiana apresentaram pico mais elevado no 29º dia de infecção (Figura 1). Os camundongos da linhagem A infectados com a cepa Colombiana apresentaram uma curva parasitemica com pico mais elevado no 27º dia de infecção, negativando após 35º dia. Os camundongos A foram tratados a partir do 27º dia, por três dias consecutivos pelo benzonidazol, na dose de 100 mg/kg/dia, com o intuito de controlar a carga parasitaria evitando a alta mortalidade, com isso ocorreu uma queda na curva parasitemica logo após o tratamento. (Figura 1).

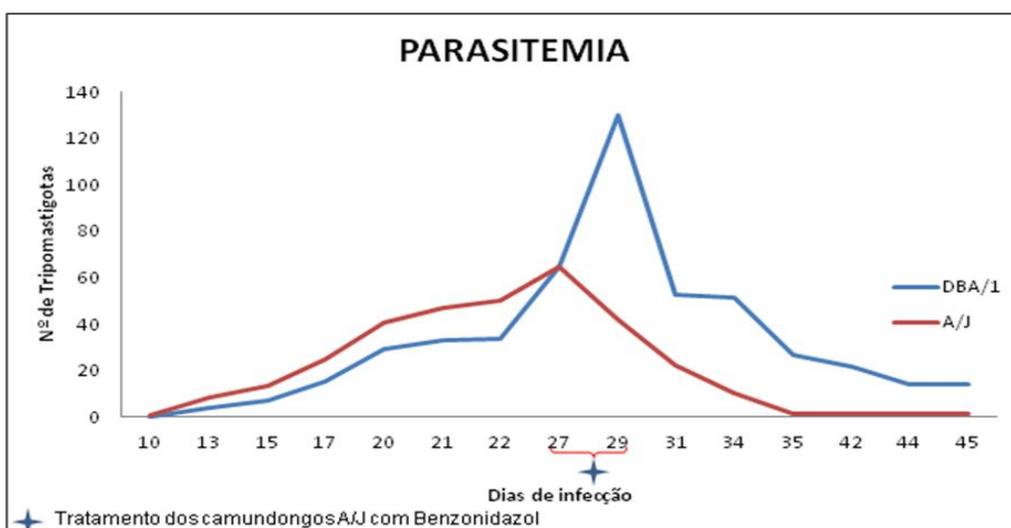


Figura 1: Curva parasitêmica da fase aguda da infecção pela cepa Colombiana, dos animais das linhagens DBA/1 e A. Foi utilizada a media de parasitemia de 5 animais de cada grupo.

7.2 - ÍNDICE DE SOBREVIDA:

A sobrevivência dos animais DBA/1 infectados com a cepa Colombiana foi de 90% até 80 dias (Figura 2 A). Já os camundongos da linhagem A tiveram uma sobrevivência de 70%, isso porque todos os animais foram tratados no 27º, 28º e 29º dia de infecção com Benzonidazol (Figura 2 B).

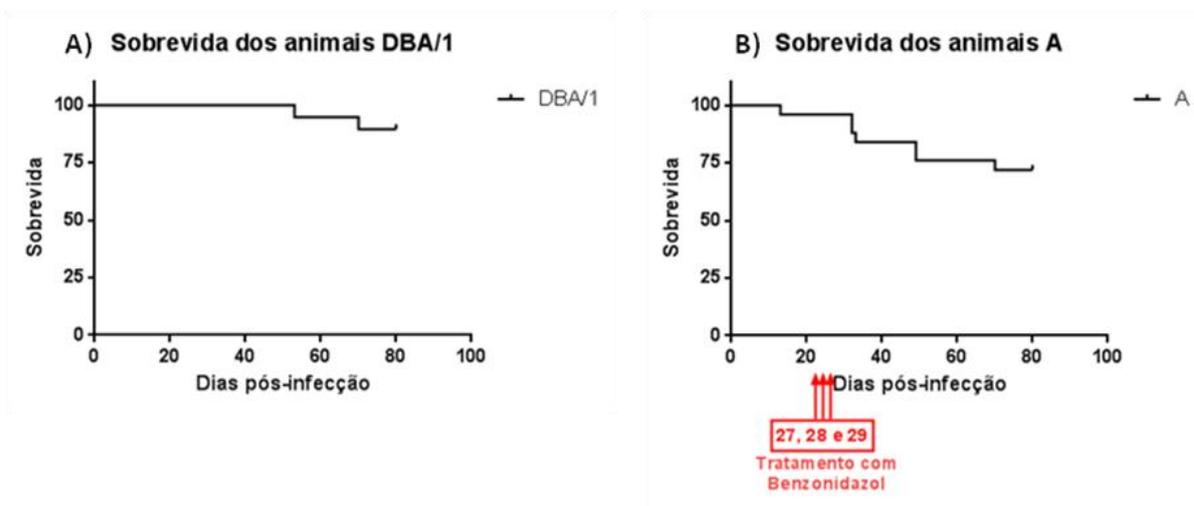


Figura 2- Gráfico da sobrevivência dos camundongos DBA/1 (A) e A (B) infectados com a cepa Colombiana.

7.3 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

7.3.1 - Camundongos das linhagens DBA/1 e A sem infecção:

Camundongos não infectados, das linhagens DBA/1 (Figura 3 A) e A (Figura 3 B) foram utilizados como controle dos grupos experimentais.

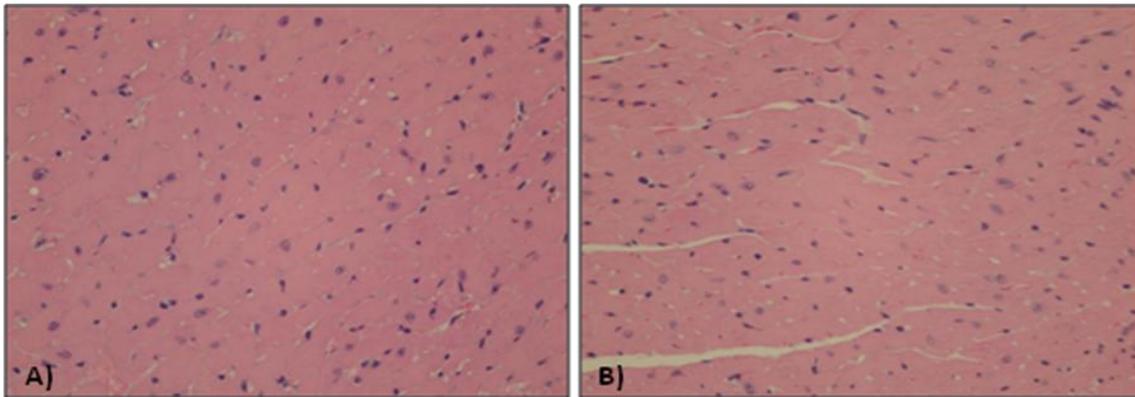


Figura 3: Secções de miocárdio de camundongos sem infecção, com estrutura preservada, sem alterações morfológicas, inflamatórias ou degenerativas. **A)** Secção de coração de camundongo da linhagem DBA/1 livre de infecção. **B)** Secção de coração de camundongo da linhagem A sem infecção.

7.3.2 - Linhagem DBA/1:

Avaliação do processo inflamatório no coração e músculo esquelético foi feito em 14 camundongos da linhagem DBA/1 infectados com a cepa Colombiana e sacrificados com 1 ano de infecção.

Foi observado no miocárdio infiltrado inflamatório mononuclear focal (Figura 4 A) e difuso, variando de discreto a intenso, sendo que 4/14 dos casos apresentavam lesões discretas (+), 9/14 dos casos eram moderadas (++) e apenas em 1 dos casos apresentou intensa inflamação (+++) (Tabela 1). Fibrose intersticial do miocárdio (Figura 4 C, D) variando de discreta a intensa foi observado em 12/14 casos analisados. Em alguns casos notamos a presença de arteriolite e raros parasitas (Figura 4 B). O músculo esquelético apresentou infiltrado inflamatório, variando de discreto a intenso (Figura 4 E), sendo que em grande parte dos casos, os infiltrados eram perivascularres, com

presença de arteriolite (Figura 4 F). Notamos a presença de mastócitos e pouco parasitismo.

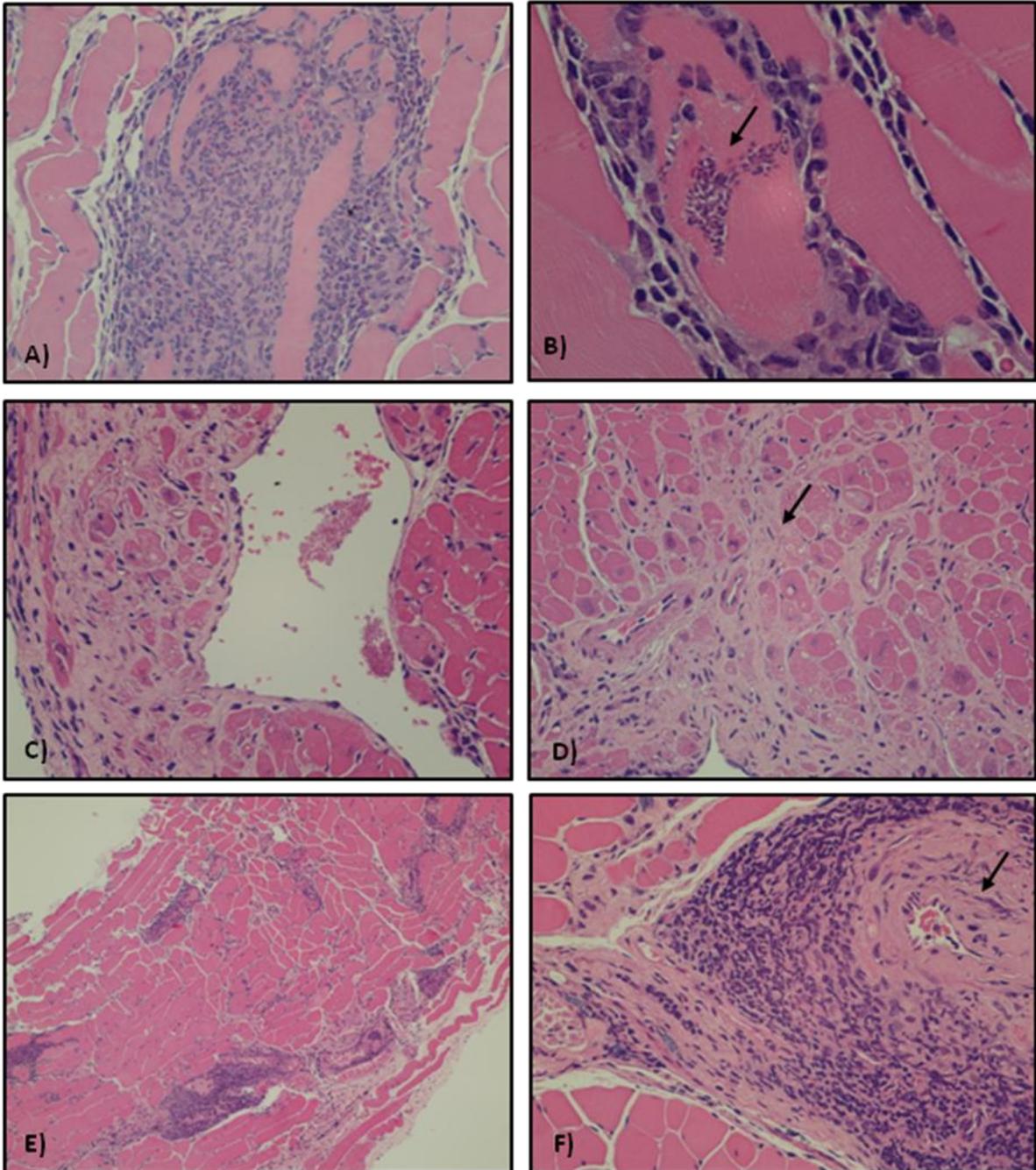


Figura 4 - Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos da linhagem DBA/1 infectados com a cepa Colombiana e sacrificados com 1 ano de infecção. **A:** secções de miocárdio com grande foco inflamatório e destruição das fibras cardíacas, H & E - 400X; **B:** Presença de formas amastigotas do *T. cruzi* em miocélula cardíaca com reação inflamatórias, H & E - 400X; **C, D:** Densa e difusa fibrose ventricular, H & E - 400X; **E:** Vista panorâmica do músculo esquelético com inflamação focal e difusa,

principalmente na região perivascular, H & E - 100X; **F**: Músculo esquelético com lesão inflamatória peri-vascular e processo de arteriolite, com infiltração da média, oclusão da luz vascular e presença de mastócitos, H & E – 400X.

Tabela 1 – Aspecto comparativo entre os estudos histopatológico e sorológico em camundongos DBA/1 infectados com a cepa Colombiana e sacrificados com um ano de infecção.

Código	Coração		Fibrose	Coração e Musc. Esq.	
	Inflam. focal / difusa			Parasitismo	*Sorologia
D-COL-C/01	++	++	+++	Neg.	1:320
D-COL-C/02	+	+	+	Neg.	1:640
D-COL-C/03	++	++	++	Pos.	1:320
D-COL-C/04	++	+	+	Pos.	1:320
D-COL-C/05	+	++	++	Neg.	1:320
D-COL-C/06	+++	++	++	Pos.	1:320
D-COL-C/07	+	++	++	Neg.	1:320
D-COL-C/08	+	+	-	Neg.	1:320
D-COL-C/09	++	++	++	Neg.	1:320
D-COL-C/10	+	+	+	Neg.	1:320
D-COL-C/11	++	++	+++	Pos.	1:160
D-COL-C/12	++	++	+	Pos.	1:320
D-COL-C/13	+	-	-	Neg.	1:160
D-COL-C/14	++	+	+	Pos.	1:160

* Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão

Pos. = Positivo; Neg. = Negativo

7.3.3 - Linhagem A:

Avaliação do processo inflamatório no coração e músculo esquelético foi feito em 21 camundongos da linhagem A infectados com a cepa Colombiana e sacrificados com 1 ano de infecção.

No coração foram vistas lesões inflamatórias focais e difusas com predominância de células mononucleares, variando de discretas a intensas. Dos 21 casos analisados, 10 apresentaram lesões discretas (+), 8 moderadas (++) e 3 lesões intensas (+++) (Tabela 2). As lesões inflamatórias eram mais frequentes nas regiões perivasculares (Figura 5 A). Em um dos casos notamos a presença de trombose na região atrial. Depósitos colagênicos com adensamentos focais (Figura 5 B, C) variando de discreto a intensos estavam presentes em 12/21 dos casos analisados. Observamos arteriolite em 6 casos. Em apenas 1 caso encontramos parasitismo. No músculo esquelético notamos infiltrados inflamatórios focais e difusos variando de moderados a intensos comprometendo as fibras musculares (Figura 5 D). Em 15/21 casos analisados observamos a presença de arteriolite. Notamos grande quantidade de mastócitos espalhado por todo tecido muscular (Figura 5 F) e raros parasitas (Figura 5 E).

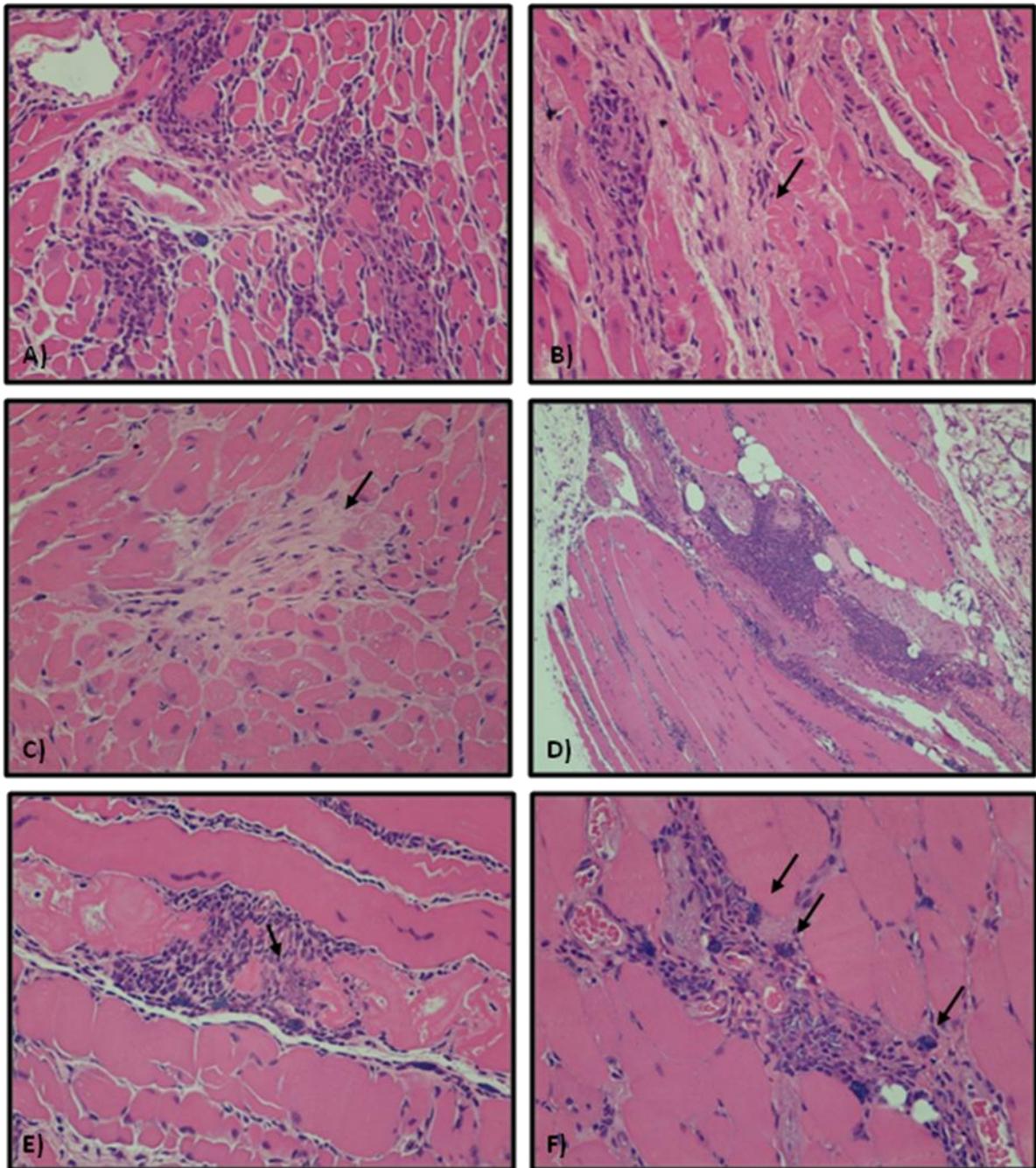


Figura 5 – Secções de coração de camundongos da linhagem A infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* sacrificados com 1 ano de infecção. **A:** Infiltrado inflamatório mononuclear focal e perivascular, H & E, 400X; **B:** Área focal de destruição de miócitos, com infiltrado inflamatório intersticial e substituição por área de fibrose do miocárdio. H & E, 400X; **C:** Presença de fibrose dissociando as miocélulas cardíacas. H & E, 400X; **D:** Vista panorâmica do músculo esquelético com grande foco inflamatório, destruição das fibras musculares e presença de adipócitos. H & E, 100X; **E:** Fibra muscular destruída por infiltrado inflamatória mononuclear com presença de parasitas. H & E, 400X; **F:** Infiltrado inflamatório perivascular com numerosos mastócitos no músculo esquelético. H & E, 400X.

Tabela 2 - Aspecto comparativo entre os estudos histopatológico e sorológico em camundongos A infectados com a cepa Colombiana e sacrificados com um ano de infecção.

Código	Coração		Fibrose	Coração e Musc. Esq.	
	Inflam. focal / difusa			Parasitismo	*Sorologia
A-COL-C/01	+	+	+	Neg.	1:160
A-COL-C/02	+	++	-	Neg.	1:160
A-COL-C/03	+++	++	+++	Neg.	1:320
A-COL-C/04	++	++	+++	Pos.	1:160
A-COL-C/05	+	++	++	Neg.	1:160
A-COL-C/06	+	+	+	Pos.	1:80
A-COL-C/07	++	+++	+	Neg.	1:640
A-COL-C/08	+	+	+	Pos.	1:640
A-COL-C/09	++	++	+	Pos.	1:1280
A-COL-C/10	-	++	-	Neg.	1:1280
A-COL-C/11	+++	++	+	Pos.	1:1280
A-COL-C/12	+	+	+	Neg.	1:1280
A-COL-C/13	+	-	-	Neg.	1:320
A-COL-C/14	+	+	-	Neg.	1:1280
A-COL-C/15	+	++	+	Neg.	1:320
A-COL-C/16	+	+	-	Neg.	1:320
A-COL-C/17	-	+	-	Neg.	1:640
A-COL-C/18	-	+	-	Pos.	1:640
A-COL-C/19	++	++	+	Neg.	1:1280
A-COL-C/20	-	+	-	Neg.	1:320
A-COL-C/21	+	++	-	Neg.	1:160

* Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão
Pos. = Positivo; Neg. = Negativo

Tabela 3: Estudo comparativo entre as linhagens resistentes e susceptíveis quanto à intensidade da inflamação, presença de fibrose, parasitismo, sorologia e sobrevida.

Linhagem	Inflamação			Fibrose	Parasitismo	sorologia	Sobrevida
	+	++	+++				
DBA/1	29%	64%	7%	86%	43%	1:160 – 1:640	90%
A	48%	38%	14%	57%	28,5%	1:80 - 1:1280	70%

7.4 - PESQUISA DE ANTÍGENOS PARASITÁRIOS:

Através da análise de imunohistoquímica, observamos a presença de antígenos parasitários em todos os casos analisados. Esses antígenos estavam presentes em focos inflamatórios (Figura 6 A), depositados em miocélulas cardíacas (Figura 6 B) ou associados à membrana de células dendríticas (Figura 6 C, D, E e F). As células dendríticas intersticiais marcadas pelo anticorpo anti-*T.cruzi* foram vistas no interstício, aderentes à membrana basal dos miócitos, tanto no coração dos animais da linhagem DBA/1 (Figura 6 C,D), quanto nos animais da linhagem A (Figura 6 E, F). A presença de detritos parasitários foi visto no interior de células dendríticas, mostrando que essas células podem ser facilmente infectadas pelo parasita (Figura 6, D).

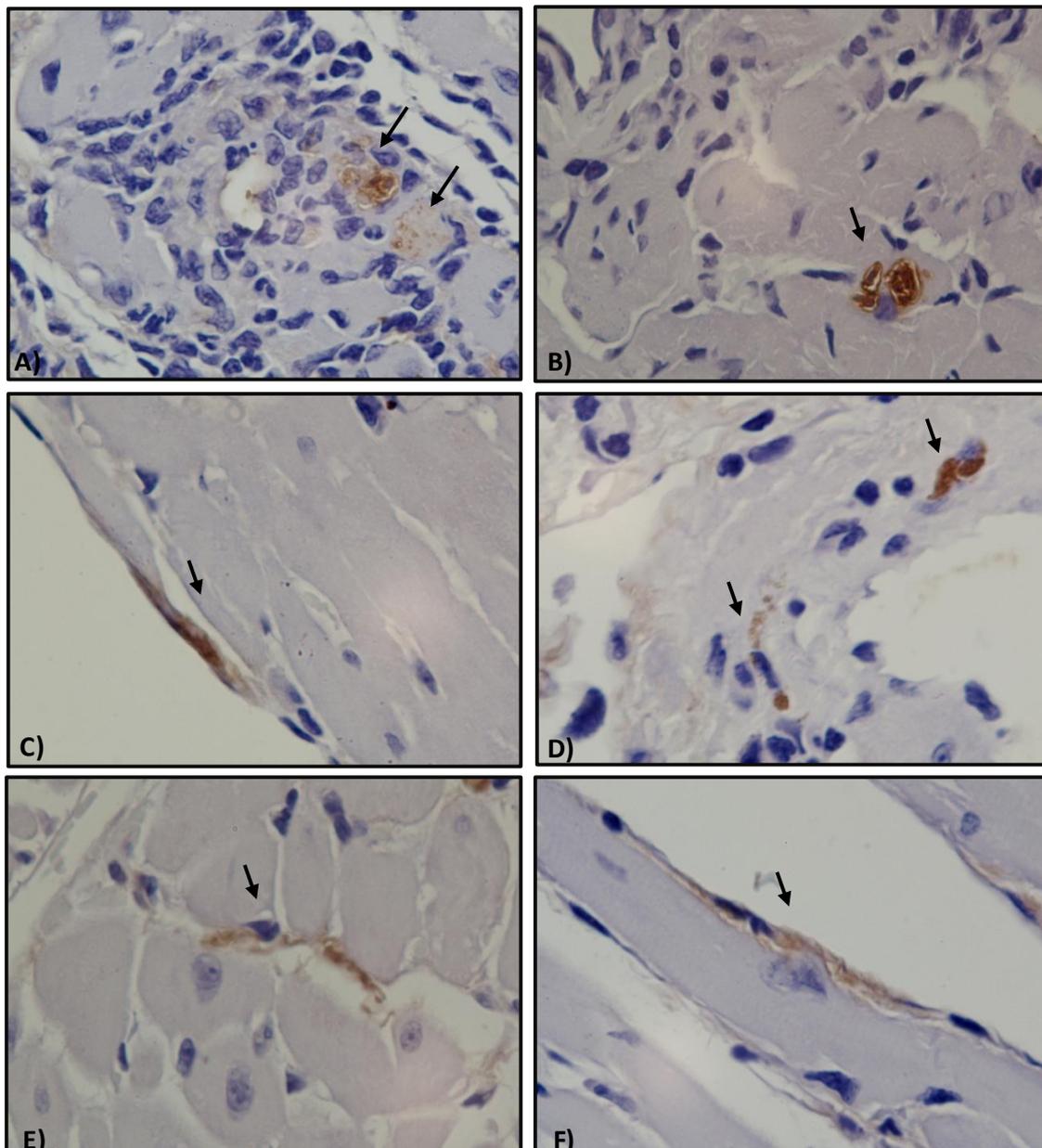


Figura 6 - Secções de coração submetidas à imunohistoquímica pela técnica da imuno-peroxidase para demonstração de antígenos do *T. cruzi*. **A**: Presença de detritos parasitários no citoplasma de macrófagos em foco inflamatório, camundongo DBA/1, 1000X; **B**: Presença de restos parasitários intracelulares em miocélula cardíaca, camundongo A, 1000X; **C, D**: Presença de antígeno parasitário associado à membrana de células dendríticas em camundongo DBA/1, 1000X; **D**: Presença de detritos parasitários no interior da célula dendrítica. **E, F**: Presença de antígeno do *T. cruzi* associado à membrana de células dendríticas em camundongo A, 1000X.

7.5 - ANÁLISE POR CITOMETRIA:

7.5.1 – QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺:

Observamos que as populações de células T CD4⁺ no baço foram predominantes nos animais da linhagem DBA/1 (8 milhões), apresentando elevada significância estatística quando comparadas com as populações de linfócitos T CD8⁺ (4 milhões) (Figura 7). Com a infecção notamos um aumento da celularidade do baço, contudo as células T CD4⁺ (19 e 30 milhões, respectivamente) continuaram sendo predominantes em relação às células T CD8⁺ (8 e 11 milhões). Nos animais da linhagem A, só encontramos diferença estatisticamente significativa nos controles normais, que apresentaram predominância das células T CD4⁺ (4 milhões CD4⁺ e 2 milhões CD8⁺). Após a infecção ocorreu um aumento da celularidade do baço, contudo não houve diferença entre as populações CD4⁺ (12 e 15 milhões) e CD8⁺ (13 e 14 milhões).

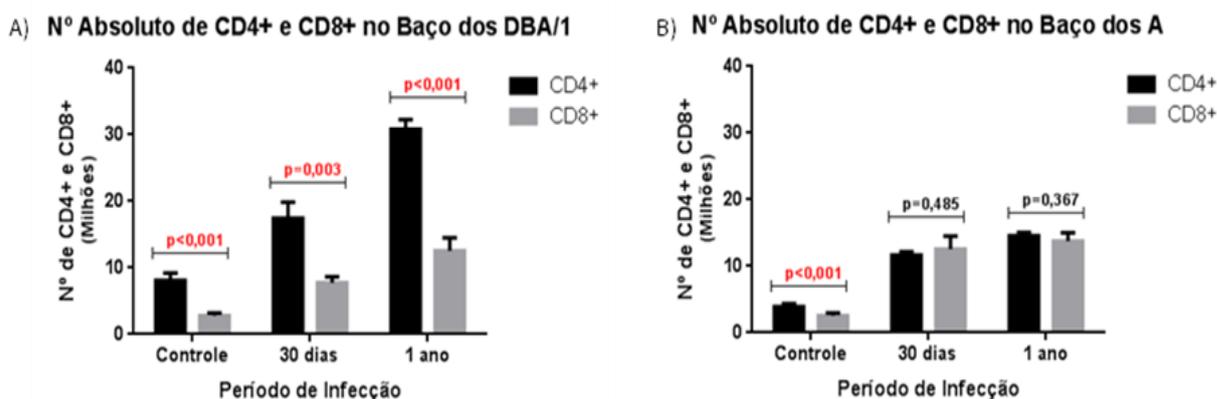


Figura 7 - Número total de células CD4⁺ e CD8⁺ no baço de camundongos não infectados e infectados sacrificados com 30 dias e 1 ano de infecção. **A)** Representa o grupo dos camundongos da linhagem DBA/1 e **B)** Representa o grupo dos camundongos da linhagem A. Foram utilizados 3 camundongos por grupo experimental nas duas linhagens estudadas. A análise estatística foi

realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados *significantes*.

7.5.2 - FREQUÊNCIA DAS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T:

A porcentagem de células T CD4⁺ esplênica dos camundongos DBA/1 não infectados (14%), infectados e sacrificados com 30 dias (9%) e um ano de infecção (15%) foi maior do que nos camundongos A (9%, 6% e 8%), respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 8 A). Uma maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ foi observado no baço dos camundongos A não infectados (8%) e aqueles sacrificados com 30 dias (6%) e um ano de infecção (8%) comparados aos camundongos DBA/1 (5%, 4% e 6%), respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 8 B). Quando observamos o perfil das células inflamatórias no coração, notamos que houve um grande aumento da frequência das populações de linfócitos T após infecção, contudo não existiram diferenças significantes entre as porcentagens de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no miocárdio dos camundongos DBA/1 e A (Figura 8, C e D).

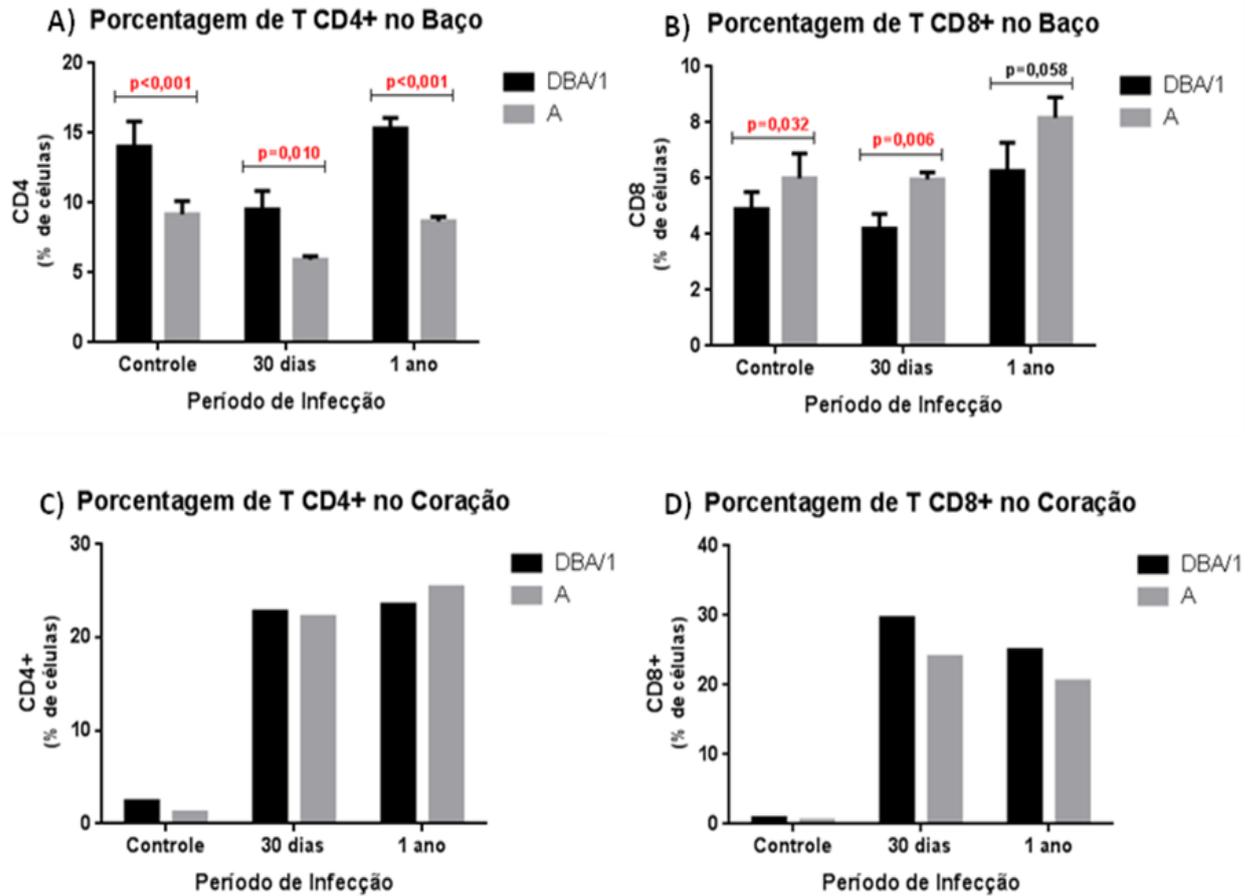


Figura 8 - Porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos animais das linhagens DBA/1 e A, sacrificados com 30 dias e 1 ano de infecção. **A)** Porcentagem das populações CD4+ no baço. **B)** Porcentagem das populações CD8+ no baço. **C)** Porcentagem das populações CD4+ no coração. **D)** Porcentagem das populações CD8+ no coração. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística das populações do baço foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7.5.3 - FREQUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE CELULAS T CD4+ CD25^{hi}

Foi constatada a presença de mais células T CD4⁺CD25^{hi} no baço dos camundongos DBA/1 (600 mil) do que nos camundongos A (400 mil), e o número absoluto dessas células aumentam no decorrer da infecção (1,5 e 2,7 milhões nos DBA/1; 800 mil e 1,1 milhões nos A) (Figura 9 A). A porcentagem

de células $CD4^+CD25^{hi}$ no baço mostrou uma diferença relevante, entre os animais não infectados (DBA/1 7% e A 8,5%) e com 30 dias de infecção (DBA/1 8,5% e A 6%), predominando nos camundongos DBA1 (Figura 9 B). Quando infectados com a cepa Colombiana, notamos que os animais DBA/1 apresentaram um aumento da expressão de $CD4^+CD25^{hi}$ com 30 dias, que é mantido com 1 ano de infecção (Figura 9 B).

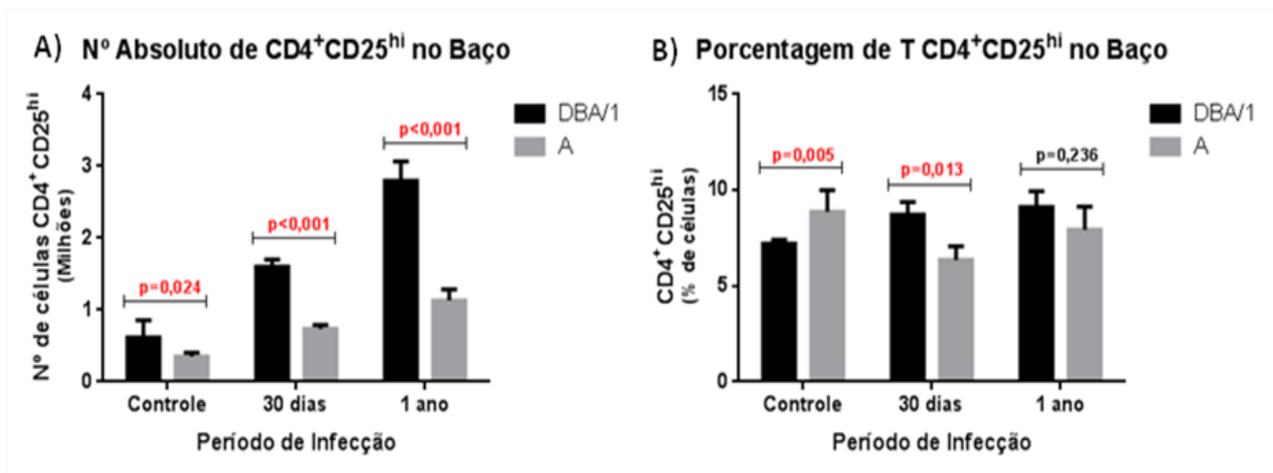


Figura 9 - Número absoluto (A) e frequência (B) das populações de células T $CD4^+CD25^{hi}$ no baço de camundongos das linhagens DBA/1 e A, com 30 dias e 1 ano de infecção. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística das populações do baço foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados *significantes*.

Dados representativos podem ser visualizados através dos *dot plots* com marcação para células $CD4^+CD25^{hi}$ no baço, onde notamos que a frequência dessas células é modificada com a infecção, aumentando em animais DBA/1, enquanto diminuem em animais A, após 30 dias de infecção (Figura 10).

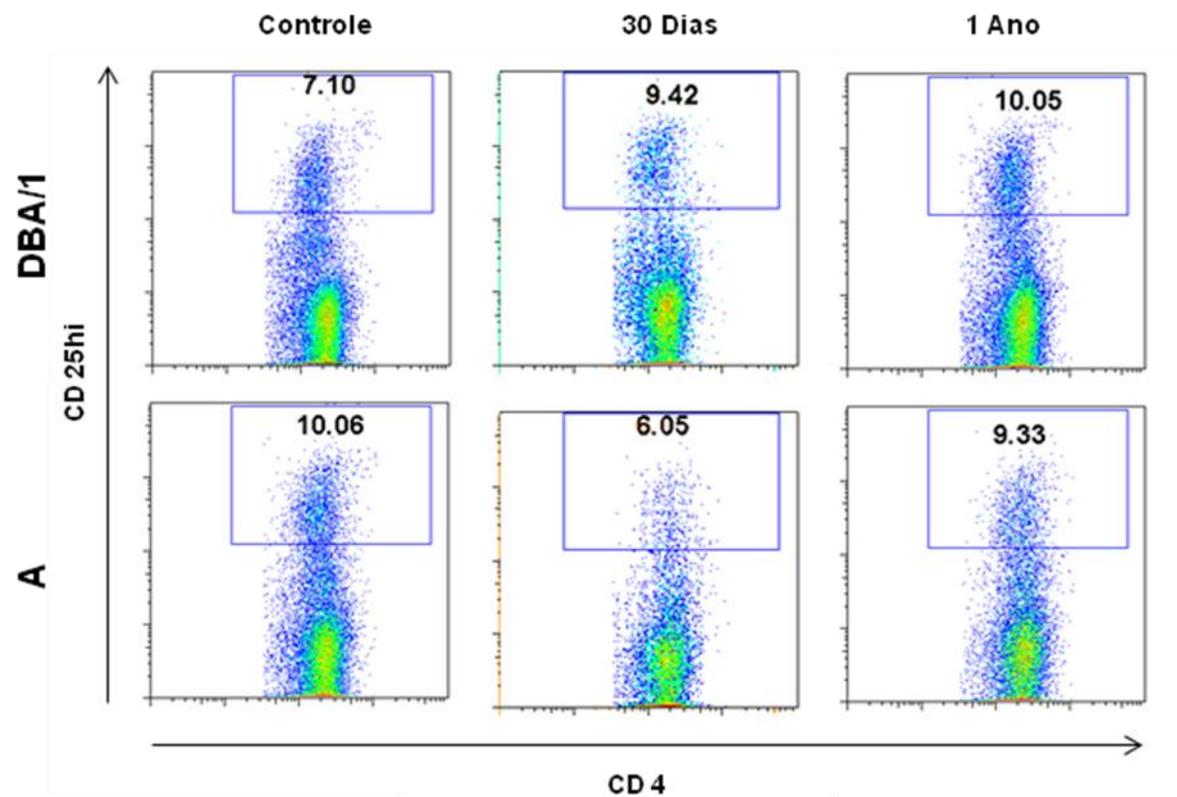


Figura 10 - Dados representativos para marcação de populações de células CD4⁺CD25^{hi} do baço de um animal por ponto de eutanásia nas linhagens DBA/1 e A, sacrificados com 30 dias e 1 ano de infecção.

Na análise das células inflamatórias do coração, observou-se uma maior frequência de células CD25^{hi} na linhagem susceptível A infectada, quando comparado à linhagem resistente DBA/1 (Figura 11). Esta diferença é mais visível aos 30 dias pós-infecção, mas se mantém também na fase crônica.

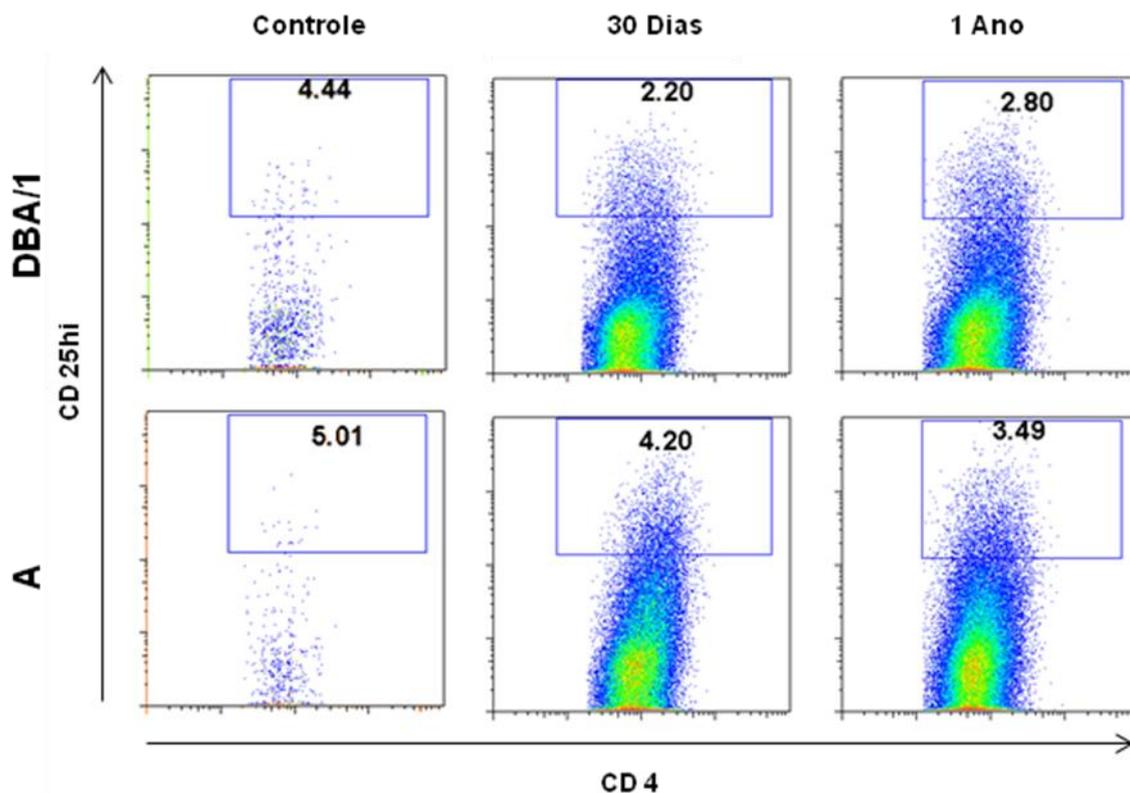


Figura 11 – Dados representativos para marcação das populações de células $CD4^+CD25^{hi}$ no infiltrado inflamatório do coração de um animal por ponto de eutanásia nas linhagens DBA/1 e A, não infectados e com 30 dias e 1 ano de infecção com a cepa Colombiana.

7.5.4 - FREQUÊNCIA DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE MEMÓRIA EFETORA

Analisando o fenótipo das populações linfocitárias no baço, notamos que com a infecção ocorreu um aumento na frequência de células T de memória efetora ($CD62L^-$) nas duas linhagens estudadas (Figura 12). A população de células $CD8^+CD62L^-$ que era predominante na linhagem DBA/1, após a infecção passou a ser maior na linhagem A (28%, 55% e 40% nos DBA/1 e 15%, 68% e 68% nos A) (Figura 12, B). O $CD4^+CD62L^-$ só apresentou diferenças

estatísticas entre as duas linhagens com 30 dias de infecção, sendo mais elevado nos animais A (50% nos DA/1 e 79% nos A) (Figura 12 A).

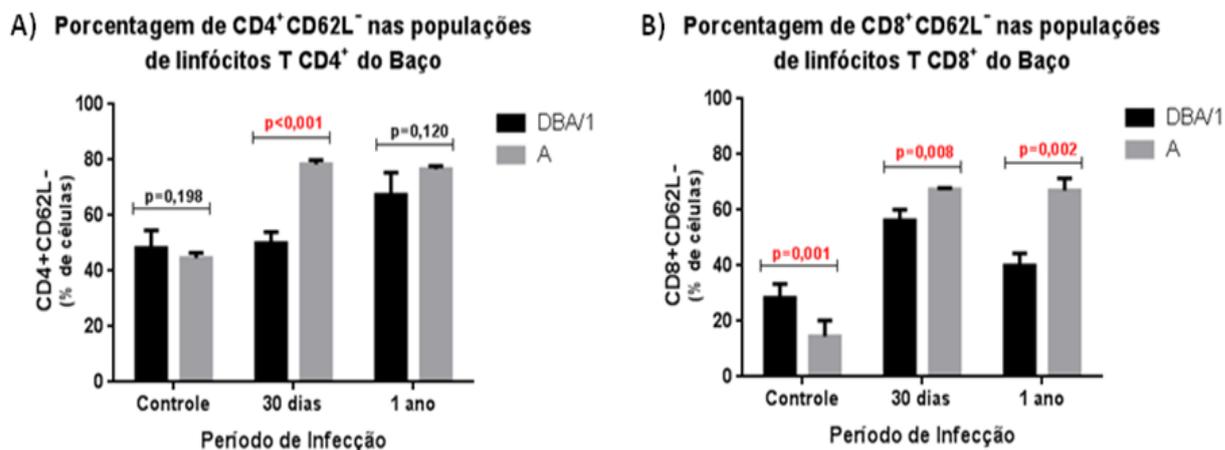


Figura 12 - Porcentagem das células de memória (CD4+CD62L⁻ e CD8+CD62L⁻) nos animais das linhagens DBA/1 e A, sacrificados com 30 dias e 1 ano de infecção. **A)** Porcentagem das populações CD4+CD62L⁻ no baço. **B)** Porcentagem das populações CD8+CD62L⁻ no baço. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística foi realizada com o teste *t* Student bilateral. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7.5.5 - CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DO BAÇO E MIOCÁRDIO

Os camundongos DBA/1 possuem mais células dendríticas no baço (1,3 milhões) do que nos animais da linhagem A (300 mil) (Figura 13 A). Após a infecção com *T. cruzi*, notamos um aumento das populações de células dendríticas no baço. Essa diferença é mais evidente com um ano de infecção, onde é maior nos animais da linhagem DBA/1 (3 milhões nos DBA/1 e 1,6 milhões nos A) (Figura 13 A). No coração, observamos um aumento da

frequência das populações das células dendríticas intersticiais com 30 dias de infecção e posterior queda no decorrer da doença, sendo mais evidente nos animais da linhagem DBA/1 (2%, 14% e 9% nos DBA/1 e 2%, 9% e 6% nos A) (Figura 13, C).

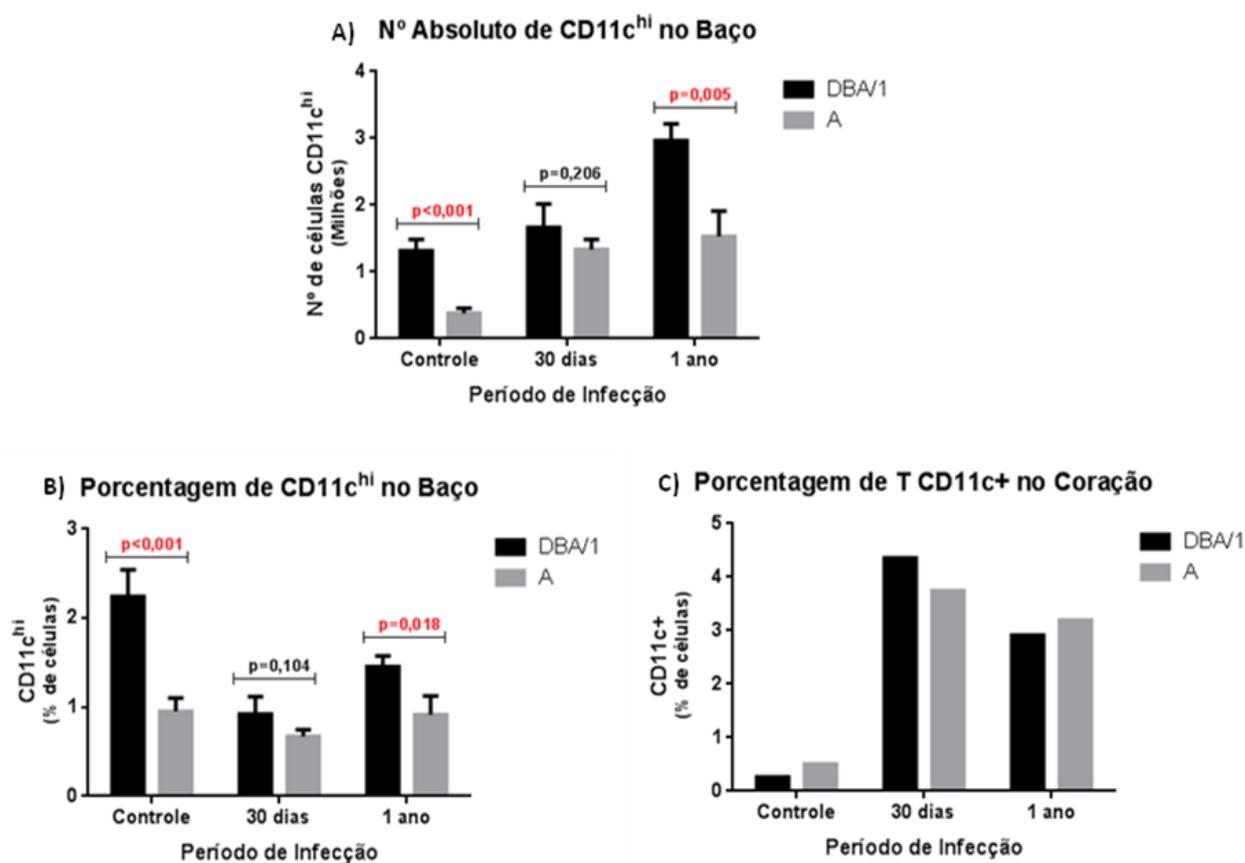


Figura 13 - Número absoluto e frequência das populações de células dendríticas em animais das linhagens DBA/1 e A, com 30 dias e 1 ano de infecção. **A)** Número absoluto das populações de células dendríticas no baço. **B)** Porcentagem das populações de células dendríticas no baço. **C)** Porcentagem das populações de células dendríticas no coração. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7.5.6 - INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DO CD80 E CD86 PELAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Não foram observadas no decorrer da infecção, alterações significativas da intensidade de fluorescência do CD80 sobre as células dendríticas (CD11c+) do baço dos animais nas duas linhagens (Figura 14 A). No coração notamos uma maior expressão do CD80 com a infecção, principalmente após 1 ano (Figura 14 B). Com relação ao CD86, também não observamos uma expressão significativa sobre células dendríticas do baço nas duas linhagens estudadas (Figura 14 C). No coração notamos que houve um aumento da intensidade de fluorescência do CD86 com 30 dias de infecção, e um aumento ainda maior após um ano (Figura 14 D).

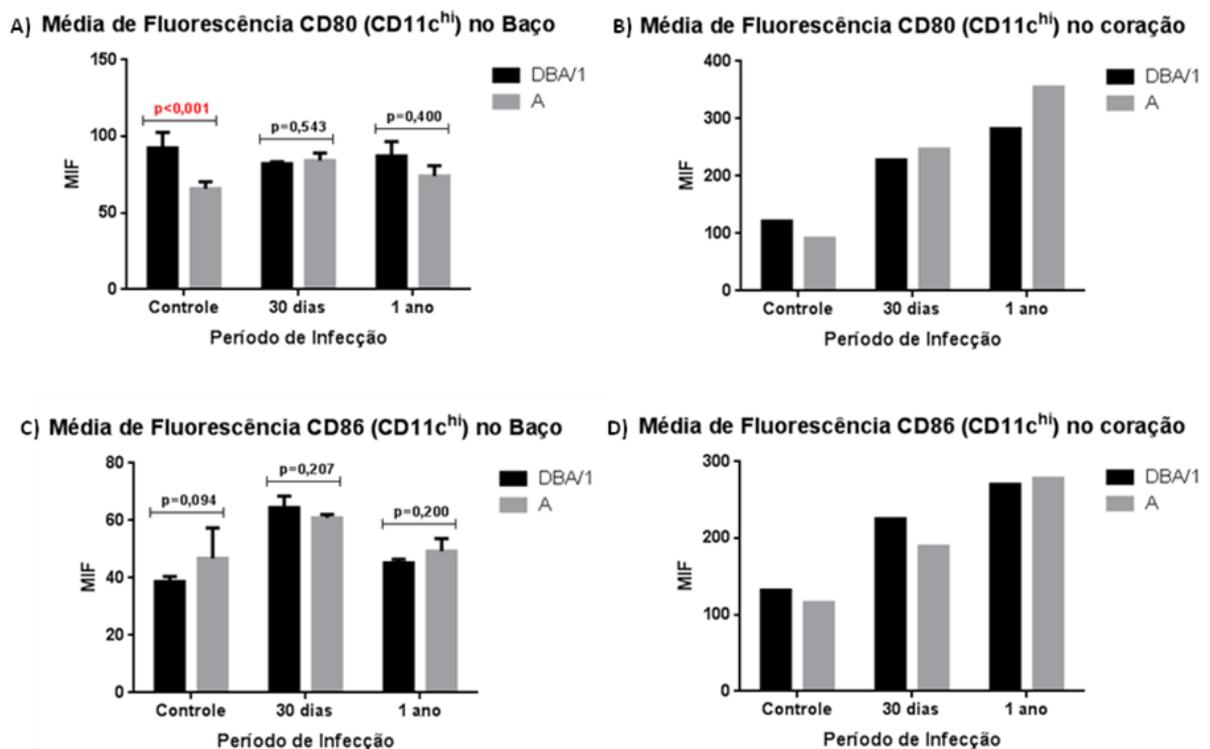


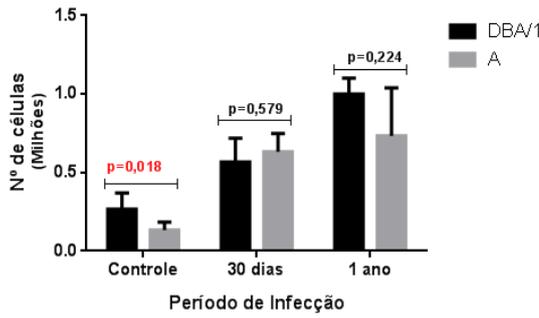
Figura 14 - Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) do CD80 no baço (A) e coração (B) e do CD86 no baço (C) e coração (D) sobre as populações de células dendríticas em animais das linhagens DBA/1 e A, com 30 dias e 1 ano

de infecção. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística das populações do baço foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados *significantes*.

7.5.7 - FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD11c) EXPRESSANDO CD40

Os camundongos sem infecção da linhagem DBA/1 (260 mil) têm mais células dendríticas expressando CD40 quando comparados com os da linhagem A (125 mil). Após infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi* ocorreu um aumento do número absoluto dessas células nas duas linhagens estudadas (Figura 15 A). Esse aumento permanece com 1 ano, mas não foi encontrada diferença significativa entre as duas linhagens após infecção (Figura 15 A). Quando analisamos a frequência da população de células dendríticas expressando CD40, só notamos diferenças significativas antes da infecção (0,45% nos DBA/1 e 0,25% nos A). Ocorreu uma queda da frequência nos animais DBA/1 após 30 dias de infecção, restabelecendo com um ano (Figura 15 B). Nos animais A observamos um aumento da frequência das células dendríticas expressando CD40 com 1 ano de infecção (Figura 15 B). Dados representativos podem ser visualizados através dos *dot plots* com a marcação das células dendríticas expressando CD40 e CD80 (Figura 15 C).

A) N° Absoluto de Célula dendrítica expressando CD40 no Baço



B) Porcentagem de Células dendríticas expressando CD40 no Baço

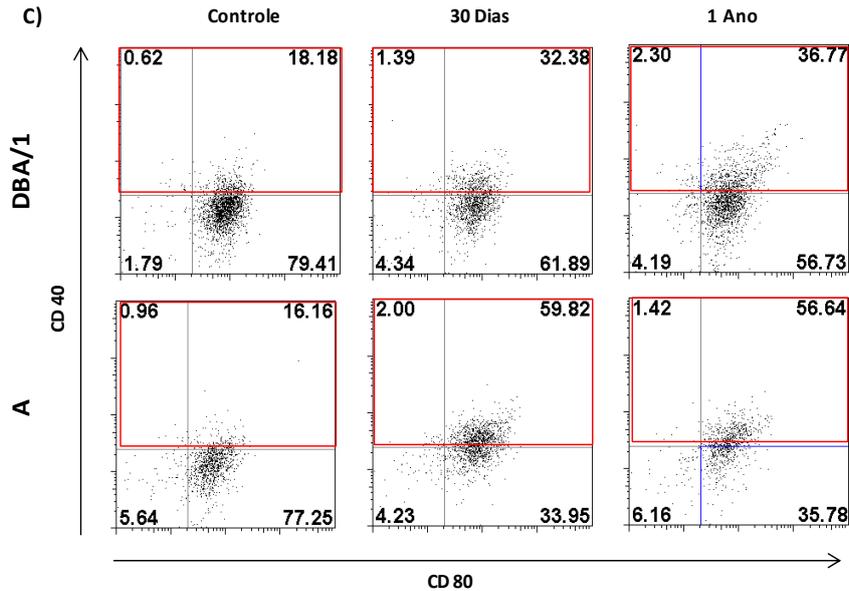
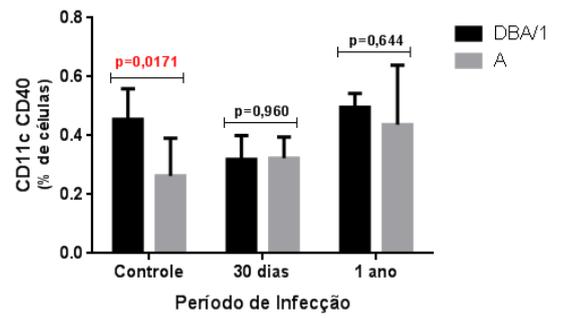


Figura 15 - Número absoluto e frequência das populações de células dendríticas expressando CD40 em animais das linhagens DBA/1 e A, sacrificados com 30 dias e 1 ano de infecção. **A)** Número absoluto das populações de células dendríticas expressando CD40 no baço. **B)** Porcentagem das populações de células dendríticas expressando CD40 no baço. **C)** Dot Plots para marcação das de células dendríticas expressando CD40 no coração. Foram utilizados 3 camundongos por ponto de eutanásia nas duas linhagens estudadas. A análise estatística das populações do baço foi realizada com o teste *t* Student bilateral. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

8 - DISCUSSÃO

Os mecanismos específicos envolvidos na manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são muito complexos. Não se sabe explicar como alguns indivíduos infectados desenvolvem formas graves da doença e outros permanecem assintomáticos ao longo da vida. Acredita-se que essas manifestações são consequência de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) (DIAS, 2000).

Para compreender os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória à infecção pelo *T. cruzi* resolvemos utilizar duas linhagens de camundongos isogênicos que, de acordo com ANDRADE e colaboradores (1985), apresentam diferentes graus de susceptibilidade à infecção. Camundongos da linhagem DBA/1 são mais resistentes apresentando baixa mortalidade quando infectados com o *T. cruzi*, enquanto os camundongos da linhagem A são mais susceptíveis à infecção, apresentando alto índice de mortalidade quando infectados.

Após infectarmos com a cepa Colombiana, tratamos os animais A com benzonidazol, por 3 dias consecutivos, a partir do 27^o dia de infecção, com o objetivo de controlar a carga parasitária e evitar uma alta mortalidade. A ausência de histopatologia na fase aguda impossibilitou a avaliação das lesões inflamatórias no início da infecção, contudo os animais A, mesmo sendo

tratados por 3 dias consecutivos, apresentaram uma menor sobrevida em relação aos camundongos DBA/1 que sobreviveram em torno de 90%.

Com um ano de infecção, analisando dados histopatológicos, notamos que a maior parte dos camundongos DBA/1 desenvolveu acentuada fibrose na região do miocárdio, o que não se reproduziu nos animais da linhagem A.

Mesmo com uma predominância de lesões moderadas no coração, os animais DBA/1 apresentaram uma maior sobrevida. Essa sobrevida pode estar relacionada com o perfil das células inflamatórias e reguladoras. As células T CD4⁺ e CD8⁺ estão envolvidas no controle da carga parasitária e nas lesões teciduais. Animais *nude* (desprovidos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) não são capazes de controlar a infecção pelo *T. cruzi*, devido à grande replicação parasitária, levando à morte precocemente (KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979). Alguns pesquisadores acreditam que o padrão de resistência à infecção estaria relacionado aos linfócitos T CD4⁺ (ARAUJO, 1989; DOS SANTOS, et al., 1992) outros aos linfócitos T CD8⁺ (TARLETON, 1990; CARDILLO, et al., 2007). Nos nossos resultados notamos que os animais resistentes tiveram uma maior frequência de células T CD4⁺ no baço do que nos camundongos susceptíveis. Quando observamos a frequência das células T CD8⁺, constatamos predominância nos animais susceptíveis antes e durante a fase aguda da infecção. Quando analisamos o coração, constatamos um ligeiro aumento da porcentagem de células T CD8⁺ com 30 dias e 1 ano de infecção nos animais DBA/1. Essa mudança do perfil inflamatório no coração pode estar correlacionada com a resistência dos camundongos DBA/1 durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Com a infecção, ocorre a expansão das populações de linfócitos e diferenciação em células efetoras. Após o controle da carga parasitária, muitos linfócitos antígeno-específicos entram em apoptose, mantendo a homeostasia. Uma pequena porção destas células entretanto, se diferencia em células de memória, proporcionando uma rápida resposta e imunidade a longo prazo após reinfeção (MEIS, et al., 2009).

Quando analisamos o fenótipo das populações linfocitárias no baço com a infecção, observamos que ocorre um aumento na frequência de células T de memórias efetora nas duas linhagens estudadas. A população de células $CD8^+CD62L^-$ passou a ser predominante na linhagem A após a infecção. Já as células $CD4^+CD62L^-$ só apresentaram diferenças estatísticas entre as duas linhagens com 30 dias de infecção, sendo mais elevado nos animais A.

As células T $CD4^+CD25^+$ suprimem a ativação de ambos os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ *in vitro* (SHEVACH, et al., 2001). A supressão é mediada por uma interação celular dependente de contato e independente de citocina. As células Treg podem ser geradas no timo ou nos órgão linfoides periféricos, principalmente naqueles associados à mucosa (MUCIDA, et al., 2009; TAAMS, et al., 2002). Quando ativadas, desempenham funções importantes na regulação das respostas imune inata e adaptativa, controlando a magnitude da resposta contra antígenos próprios (SAKAGUCHI, 2000 e 2004), antígenos exógenos (KRETSCHMER, et al., 2005) e também agentes infecciosos (MENDEZ, et al., 2004; HISAEDA, et al., 2004; VITELLI-AVELAR, et al., 2005; ARAUJO, et al., 2011).

Investigando as células Treg em diferentes formas clínicas da doença de Chagas, VITELLI-AVELAR e colaboradores (2005) demonstraram que os indivíduos na forma indeterminada da doença têm uma maior frequência de células Treg, quando comparados aos indivíduos na forma cardíaca e com os não infectados, sugerindo que a expansão dessas células pode ser benéfica, limitando a forte citotoxicidade, prevenindo lesões cardíacas, permanecendo os pacientes, ao longo da vida, na forma clínica indeterminada. ARAUJO, et al., (2007) encontraram resultados semelhantes e concluíram que a IL-10 produzida pelas células T $CD4^+CD25^{hi}$ dos pacientes na forma indeterminada parecem reduzir a gravidade da resposta do tipo Th1 à infecção pelo *T. cruzi*. De acordo com ARAUJO, et al., (2007) as células T $CD4^+CD25^{hi}$ têm maior expressão da FOXP3, já as células $CD4^+CD25^{low}$ e as células $CD4^+CD25^-$ têm baixa expressão desta proteína, em pacientes com doença de Chagas.

Em nossos resultados, notamos que os camundongos DBA/1 apresentam mais células T $CD4^+CD25^{hi}$ no baço do que os camundongos A, e que a frequência dessas células é modificada com a infecção. Em animais DBA/1 há um aumento da proporção de células T $CD4^+$ esplênicas que expressam altos níveis de CD25, enquanto esta proporção diminui em animais A, com 30 dias de infecção. Tal diferença pode ser devido a uma maior migração destas células para os sítios inflamatórios, em resposta ao dano tissular, uma vez que sua presença no infiltrado cardíaco é maior em animais A. Por outro lado, a maior presença de células $CD4^+CD25^{hi}$ no baço de animais DBA/1 correlaciona-se com uma menor proporção de linfócitos T com fenótipo efetor ($CD62L^-$), e esta limitação do estado reativo pode estar favorecendo um controle no envio de células efetoras inflamatórias para os tecidos.

De acordo com YAMAZAKI, et al., (2003), para a proliferação das células T CD4⁺CD25⁺, é necessário o contato com as células dendríticas, sendo parcialmente dependente da produção de pequenas quantidades de IL-2. A capacidade das células dendríticas para expandir as células TCD4⁺CD25⁺ proporciona um mecanismo adicional para regular a autoimunidade e outras respostas imunes indesejáveis (YAMAZAKI, et al., 2006; TARBELL, et al., 2006). TANG & KRUMMEL (2006), descreveram que as células Tregs limitam a ligação das células T CD4⁺ às células dendríticas, suprimindo a sua proliferação e diferenciação.

As células dendríticas constituem uma população de células heterogêneas originadas na medula óssea, sendo encontradas nos tecidos num estágio imaturo e respondem a vários quimiotáticos no local da inflamação. Uma vez ativada pelos micro-organismos e estímulos inflamatórios, elas capturam e processam antígenos, migrando para os órgãos linfoides, onde irão ativar as células T *naive* antígeno – específicas (HART & McKENZIE, 1990).

Investigando a influência de duas cepas do *T. cruzi*, que diferem no grau de virulência e patogenicidade, sobre as células dendríticas, e a expressão do complexo MHC classe II e das moléculas coestimuladoras na capacidade de estimular os linfócitos T, ALBA SOTO, et al., (2003) demonstraram que a modulação da expressão da molécula de MHC classe II pelas células dendríticas intersticiais depende da virulência da cepa do *T. cruzi*. Cepas mais virulentas inibem ou reduzem a expressão dessa molécula na superfície das APC, enquanto cepas menos virulentas preservam a maturação das células dendríticas, permitindo que o hospedeiro possa melhor controlar a carga

parasitária e sobrevida na fase aguda. Na fase crônica da infecção, as células dendríticas dos camundongos infectados com a cepa virulenta restauraram os níveis do MHC classe II semelhantes aos encontrados nos camundongos infectados com a cepa susceptível, obtendo uma elevada regulação da expressão de moléculas co-estimuladoras, sugerindo que a imunossupressão causada por esta cepa é apenas transitória. Esses resultados sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* pode modular a função das células apresentadoras de antígenos (APC).

Em nossos resultados, analisando o número absoluto das células dendríticas, observamos que após a infecção com *T. cruzi*, ocorreu um aumento da população dessas células no baço. Essa diferença é mais evidente com um ano de infecção, sendo maior nos animais da linhagem DBA/1. A resistência à infecção pelo *T. cruzi*, pode estar relacionada ao fato dos camundongos DBA/1 possuírem mais células dendríticas no baço do que nos animais da linhagem A, o que levaria a uma expansão mais abrangente de linfócitos T antígeno-específicos e conseqüentemente a um controle mais eficiente do parasitismo. No coração ocorreu um grande aumento das populações das células dendríticas intersticiais com 30 dias de infecção, com uma leve predominância nos animais da linhagem DBA/1, e posterior redução no decorrer da doença.

A infecção *in vitro* de células dendríticas pelo *T. cruzi* induz uma falha no processo de maturação, ocasionando uma baixa expressão das moléculas HLA-DR e moléculas co-estimuladora CD40, prejudicando a produção de TNF- α e IL-12 (OVERTVELT, et al., 1999).

A molécula co-estimuladora CD40, expressa pelas células apresentadoras de antígenos (dendríticas, macrófagos e linfócitos B), tem um papel central na ativação e proliferação de células B e T (MA & CLARK, 2009). A ligação da CD40 com a CD40L induz uma mudança na célula dendrítica, tornando-a mais eficaz na expressão do MHC de classe II e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (CAUX, et al., 1994; PINCHUK, et al., 1994). A redução da expressão de moléculas co-estimuladoras sobre as células dendríticas pode contribuir na diminuição da sua capacidade de induzir a proliferação das células T CD4⁺ e na geração de células Treg (MA & CLARK, 2009). Em camundongos, os níveis de CD40 são utilizados como marcador para distinguir células dendríticas ativadas das não ativadas, visto que, a expressão do CD40 é regulada pelas células dendríticas após encontro com produtos microbianos ligados a receptores Toll-like (KAWAI & AKIRA, 2007).

Em nossos resultados, só constatamos diferença estatística entre as duas linhagens estudadas, nos animais sem infecção, onde os camundongos DBA/1 têm mais células dendríticas expressando CD40. Após infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi* ocorreu um aumento do número absoluto dessas células, com 30 dias e 1 ano, nas duas linhagens estudadas. Analisando a frequência da população de células dendríticas expressando CD40, observamos uma queda nos animais DBA/1 após 30 dias de infecção, possivelmente devido a uma diluição em decorrência da expansão policlonal de linfócitos T naquele órgão.

Estudando o perfil de moléculas co-estimuladoras e a expressão de citocinas pelas APCs de camundongos resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (BALB/c) à

infecção pelo *T. cruzi*, PLANELLES, et al., (2003), detectaram uma elevada expressão de citocinas IL-12 e TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados, o que não foi observado nos macrófagos dos camundongos BALB/c. Detectaram também uma diminuição na taxa de expressão das moléculas CD40 e CD86 apenas nos macrófagos e nas células dendríticas dos camundongos susceptíveis à infecção.

No decorrer da infecção, não foram observadas no baço dos camundongos DBA/1 e A, alterações significativas da intensidade de fluorescência do CD80 e do CD86 sobre as células dendríticas. No coração notamos uma maior expressão do CD80 e CD86 com 30 dias de infecção, e posteriormente com 1 ano. Neste órgão foi observado também, aos 30 dias, uma ligeira tendência ao aumento na expressão de CD86 em animais DBA/1 quando comparado a animais A. O inverso foi observado com 1 ano pós-infecção.

A persistência das lesões inflamatórias na fase crônica da doença pode estar correlacionada com a apresentação de antígenos do *T. cruzi* capturados pelas células dendríticas. A presença de antígenos parasitários foi anteriormente detectada na superfície de células dendríticas intersticiais, através da imunohistoquímica, na miocardite da fase aguda e crônica de cães tratados com Ciclofosfamida em baixas doses, na forma indeterminada da infecção (ANDRADE, et al., 2000). Posteriormente, no modelo do camundongo (PORTELLA & ANDRADE, 2009) observaram a presença desses antígenos nas células dendríticas intersticiais do miocárdio e que o decréscimo da inflamação por causa do tratamento com benzonidazol foi proporcional ao número de células dendríticas, confirmando a hipótese de que as mesmas

participam na manutenção das lesões cardíacas na fase crônica da doença de Chagas. Através da análise de imunohistoquímica, encontramos resultados semelhantes, onde os antígenos do *T. cruzi* estavam presentes em focos inflamatórios, depositados em miocélulas cardíacas integras ou associados à membrana de células dendríticas, nas duas linhagens de camundongo utilizadas. As células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs) são identificadas pela sua localização e sua morfologia peculiar, com aspecto alongado, com citoplasma compacto, núcleo central arredondado e dois ou três prolongamentos citoplasmáticos finos, localizadas no interstício e aderentes à membrana do miócito cardíaco (ANDRADE, et al., 2000). Detectamos também a presença de detritos parasitários no interior de células dendríticas, mostrando que essas células podem ser facilmente infectadas pelo parasita.

Os resultados do presente trabalho corroboram com o papel das células dendríticas e das células T $CD4^+CD25^{hi}$ na miocardite aguda e crônica da doença de Chagas. As células T $CD4^+CD25^{hi}$ provavelmente participam do controle do potente efeito patológico da resposta efetora durante a infecção e as células dendríticas na ativação e proliferação dos linfócitos $CD4^+$, permitindo que o hospedeiro possa melhor controlar a carga parasitária e uma maior sobrevivência a fase aguda.

A resistência dos camundongos DBA/1 e a susceptibilidade dos camundongos A, à infecção pelo *T. cruzi*, está relacionada ao perfil da resposta inflamatória desenvolvida no decorrer da doença.

9 - CONCLUSÕES

- 1- Os camundongos da linhagem DBA/1 são mais resistentes à infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi* do que os da linhagem A, embora apresentem lesões inflamatórias mais acentuadas na fase crônica da infecção.
- 2- A manutenção das lesões cardíacas na fase crônica da doença de Chagas pode estar correlacionada com a apresentação de antígenos do *T. cruzi* capturados pelas células dendríticas intersticiais do miocárdio.
- 3- A diferença do perfil de células inflamatórias entre as duas linhagens estudadas, pode influenciar na resistência dos camundongos DBA/1 à infecção pelo *T. cruzi*.
- 4- A elevada expansão de linfócitos T CD4⁺ pode estar correlacionado a maior resistência dos camundongos DBA/1 à infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*.
- 5- A resistência à infecção pelo *T. cruzi*, está associada a um número maior de células dendríticas no baço e a uma quantidade ligeiramente aumentada no coração dos camundongos DBA/1, o que pode estar provocando uma expansão mais abrangente de linfócitos T CD4⁺ nesses animais.

- 6- A diferença de susceptibilidade entre as linhagens DBA/1 e A não está relacionado a alterações da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 por células dendríticas (CD11c^{hi}) destes animais.
- 7- O aumento das células T CD4⁺CD25^{hi} no baço dos camundongos da linhagem DBA/1 correlaciona-se a uma menor proporção de células T com fenótipo efetor nesta linhagem.

10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 1, p. 117-21, 1998.

ALBA SOTO, C. D.; MIRKIN, G. A.; SOLANA, M. E.; GONZALEZ CAPPA, S. M. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1194-9, 2003.

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.**, v. 64, n. 6, p. 1961-7, 1996.

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

ANDRADE, S.G. Patologia experimental da Doença de Chagas. In: ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 177p.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, K. S.; MAGALHAES, J. B.; GUEDES, R. S.; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biomes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; STEINDEL, M.; GUERREIRO, M. L.; MAGALHAES, J. B.; ALMEIDA, M. C.; REIS, J. N.; SANTOS, V. C.; VALADARES, H. M.; REIS, M. G.; MACEDO, A. M. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new T. cruzi Taxonomy Consensus (2009). **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 106, n. 8, p. 948-56, 2011.

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

ANDRADE, S. G.; PIMENTEL, A. R.; DE SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, n. 1-2, p. 64-70, 2000.

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

ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B. [Immunological aspects of infection of 6 inbred strains of mice by 3 different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.**, v. 80, n. 2, p. 203-11, 1985.

ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of Chagas' disease. **Res. Immunol.**, v. 142, n. 2, p. 126-9, 1991.

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94 Suppl 1, p. 71-80, 1999.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V. J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **Am. J. Pathol.**, v. 144, n. 6, p. 1403-11, 1994.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). **J. Pathol.**, v. 143, n. 2, p. 93-101, 1984.

ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 94 (Supl. II): 429-432, 1999.

ARAUJO, F. F.; GOMES, J. A.; ROCHA, M. O.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; PINHEIRO, V. M.; MORATO, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 2797-806, 2007.

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

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, 2001.

BATALLA, E. I.; PINO MARTINEZ, A. M.; PONCINI, C. V.; DUFFY, T.; SCHIJMAN, A. G.; GONZALEZ CAPPAS, S. M.; ALBA SOTO, C. D. Impairment in Natural Killer Cells Editing of Immature Dendritic Cells by Infection with a Virulent *Trypanosoma cruzi* Population. **J. Innate. Immun.**, v. 5, n. 5, p. 494-504, 2013.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 353-60, 2005.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 797-801, 2001.

BITTENCOURT, A. L. Congenital Chagas disease. **Am. J. Dis. Child.**, v. 130, n. 1, p. 97-103, 1976.

BOUSSIOTIS, V. A.; FREEMAN, G. J.; GRIBBEN, J. G.; NADLER, L. M. The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. **Immunol. Rev.**, v. 153, p. 5-26, 1996.

BOYER, M. H.; HOFF, R.; KIPNIS, T. L.; MURPHY, E. D.; ROTHS, J. B. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility in mice carrying mutant gene *lpr* (lymphoproliferation). **Parasite Immunol.**, v. 5, n. 2, p. 135-42, 1983.

BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 63, n. 2, p. 215-20, 1969.

BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 5, p. 220-4, 1963.

BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Cell Biol.**, v. 67 (Pt 6), p. 343-8, 1989.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 104, n. 4, p. 415-20, 2003.

BWITITI, P. T.; BROWNE, J. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in blood donors at the National Blood Transfusion Services--Guyana. **West. Indian Med. J.**, v. 61, n. 6, p. 559-63, 2012.

CALVO MENDEZ, M. L.; NOGUEDA TORRES, B.; ALEJANDRE AGUILAR, R. [The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*]. **Rev. Latinoam Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 39-42, 1992.

CAMANDAROBA, E. L.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L. S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology.**, v. 122, n. 4, p. 584-95, 2007.

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

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 4, p. 1263-72, 1994.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 1(2):1-62, 1909

COOLS, N.; PONSARTS, P.; VAN TENDELOO, V. F.; BERNEMAN, Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 6, p. 1365-74, 2007.

COURA, J. R. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39 Suppl 3, p. 113-7, 2006.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M. E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, n. 8, p. 3541-5, 1995.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity.**, v. 34, n. 3, p. 187-92, 2001.

DE ARAUJO, F. F.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O.; CHAVES, A. T.; FIUZA, J. A.; FARES, R. C.; FERREIRA, K. S.; NUNES, M. C.; KEESEN, T. S.; DAMASIO, M. P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GOMES, J. A. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology.**, v. 217, n. 8, p. 768-77, 2012.

DE ARAUJO, F. F.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANTAS, P. R.; ASSIS SILVA GOMES, J.; SATHLER-AVELAR, R.; OTAVIO COSTA ROCHA, M.; ELOI-SANTOS, S. M.; PINHO, R. T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 5, p. e992, 2011.

DE MEIS, J.; MORROT, A.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; VILLA-VERDE, D. M.; SAVINO, W. Differential regional immune response in Chagas disease. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 7, p. e417, 2009.

DE SOUZA, A. P.; OLIVIERI, B. P.; DE CASTRO, S. L.; ARAUJO-JORGE, T. C. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. **Parasitol Res.**, v. 86, n. 10, p. 800-8, 2000.

DE TITTO E. Bases genéticas. Em: Storino R., Milei J. **Enfermedad de Chagas**. Mosby-Doyma, 75-86, 1994.

DIAS, J. C. [Epidemiological surveillance of Chagas disease]. **Cad. Saude. Publica.**, v. 16 Suppl 2, p. 43-59, 2000.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 5, p. 603-12, 2002.

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

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

DOS REIS, G.A.; LOPES, M.F. **Resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais.** In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 153-159p.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science.**, v. 272, n. 5258, p. 50-3, 1996.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology.**, v. 118 (Pt 2), p. 161-6, 1999.

FLORES-GARCIA, Y.; ROSALES-ENCINA, J. L.; ROSALES-GARCIA, V. H.; SATOSKAR, A. R.; TALAMAS-ROHANA, P. CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) Treg Cells Induced by rSSP4 Derived from *T. cruzi* Amastigotes Increase Parasitemia in an Experimental Chagas Disease Model. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 632436, 2013.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 330-6, 2003.

FREILIJ, H.; ALTICHEH, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 551-5, 1995.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 4, p. 391-402, 1991.

GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Tripanosomatid characterization by Schizodeme analysis. In: MOREL, C.M. (Ed.) **Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual**. 2.ed. Geneva/ RJ. :UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/Fundação Oswaldo Cruz , 1984. p.102-115

HART, D. N.; MCKENZIE, J. L. Interstitial dendritic cells. **Int. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 2-3, p. 127-38, 1990.

HIGUCHI, M.L; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Pathol.**, 2:101-106, 1993.

HISAEDA, H.; MAEKAWA, Y.; IWAKAWA, D.; OKADA, H.; HIMENO, K.; KISHIHARA, K.; TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nat. Med.**, v. 10, n. 1, p. 29-30, 2004.

HORI, S.; SAKAGUCHI, S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. **Microbes. Infect.**, v. 6, n. 8, p. 745-51, 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends. Mol. Med.**, v. 13, n. 11, p. 460-9, 2007.

KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S. A.; RAMSDELL, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 337-42, 2003.

KIERSZENBAUM, F.; PIENKOWSKI, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.**, v. 24, n. 1, p. 117-20, 1979.

- KOBERLE, F. Megacolon. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 1, p. 21-4, 1958a.
- KOBERLE, F. Megaesophagus. **Gastroenterology.**, v. 34, n. 3, p. 460-6, 1958b.
- KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 861-9, 2007.
- KRETSCHMER, K.; APOSTOLOU, I.; HAWIGER, D.; KHAZAIE, K.; NUSSENZWEIG, M. C.; VON BOEHMER, H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1219-27, 2005.
- LARANJA, F. S. [Clinical aspects of Chagas' disease]. **Rev. Bras. Med.**, v. 10, n. 7, p. 482-91, 1953.
- LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 1, p. 16-27, 1996.
- LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, n. 6, p. 327-36, 2001.
- LUMSDEN, W. H. Trypanosomiasis. **Trop. Dis. Bull.**, v. 67, n. 5, p. 465-81, 1970.
- MA, D. Y.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Semin. Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 265-72, 2009.

MACEDO, V.O. **Influência da exposição a reinfecção na evolução da doença de Chagas. Estudo longitudinal de 5 anos.** Tese (Doutorado). **Rev. Patol. Trop.**, 5:33-115, 1976

MARIANO, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M.; CAVASSANI, K. A.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, B. R.; CUNHA, F. Q.; CARDOSO, C. R.; SILVA, J. S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 7, p. 825-33, 2008.

MARIN NETO, J. A.; SIMOES, M. V.; SARABANDA, A. V. Chagas' heart disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 72, n. 3, p. 247-80, 1999.

MCADAM, A. J.; SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. **Immunol. Rev.**, v. 165, p. 231-47, 1998.

MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 2, p. 201-10, 2004.

MILES, M. A.; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today.**, v. 2, n. 4, p. 94-7, 1986.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 841-55, 2004.

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

MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 5 Suppl, p. 1070-4, 1980.

MUCIDA, D.; PINO-LAGOS, K.; KIM, G.; NOWAK, E.; BENSON, M. J.; KRONENBERG, M.; NOELLE, R. J.; CHEROUTRE, H. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. **Immunity.**, v. 30, n. 4, p. 471-2; author reply 472-3, 2009.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 2, p. 301-7, 1992.

ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D. E.; RODRIGUEZ, M.; WEIGLE, W. O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 124, n. 1, p. 121-6, 1980.

PEREIRA, B. I.; NAZARETH, C.; MALCATA, L.; ALVES, H.; FERNANDEZ, J. R.; SARGENTO, C.; DA CUNHA, S. [Transfusion-transmitted protozoal infections: what is the risk in non-endemic countries?]. **Acta. Med. Port.**, v. 24 Suppl 4, p. 897-906, 2011.

PINCHUK, L. M.; POLACINO, P. S.; AGY, M. B.; KLAUS, S. J.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. **Immunity.**, v. 1, n. 4, p. 317-25, 1994.

PINTO, A. Y.; HARADA, G. S.; VALENTE, V.; ABUD, J. E.; GOMES, F.; SOUZA, G. C.; VALENTE, S. A. [Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 5, p. 413-9, 2001.

PIZZI, T.; PRAGER, R. [Immunity to infection induced by culture of *Trypanosoma cruzi* of attenuated virulence; preliminary communication]. **Bol. Inf. Parasit. Chil.**, v. 7, n. 2, p. 20-1, 1952.

PLANELLES, L.; THOMAS, M. C.; MARANON, C.; MORELL, M.; LOPEZ, M. C. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 131, n. 1, p. 41-7, 2003.

PORTELLA, R. S.; ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: parasite antigens sequestered in heart interstitial dendritic cells are related to persisting myocarditis in benznidazole-treated mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 7, p. 1023-30, 2009.

RESENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanozoma cruzi e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 14, p.246-259.

ROMANHA, A. J.; BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epidemiological tool. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83 Suppl 1, p. 383-6, 1988.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell.**, v. 101, n. 5, p. 455-8, 2000.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531-62, 2004.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-52, 2005.

SALES, P. A. JR.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R. V.; VIEIRA, V.; ARANTES, R. M.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, V 10 n. 6, p. 680-8, 2008.

SHEVACH, E. M.; MCHUGH, R. S.; PICCIRILLO, C. A.; THORNTON, A. M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 58-67, 2001.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. [The control of vectorial transmission]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44 Suppl 2, p. 52-63, 2011.

SILVERIO, J. C.; PEREIRA, I. R.; CIPITELLI MDA, C.; VINAGRE, N. F.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS. Pathog.**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SOARES, M. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 73, n. 4, p. 547-59, 2001.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 141-52, 1996.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; MENEZES, C. A.; COELHO, J. S.; CHAVES, A. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 4, p. 1886-94, 2007.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M.; DE CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

STORINO, R.; AUGER, S.; CARAVELLO, O.; URRUTIA, M. I.; SANMARTINO, M.; JORG, M. [Chagasic cardiopathy in endemic area versus sporadically infected patients]. **Rev. Saude Publica.**, v. 36, n. 6, p. 755-8, 2002.

TAAMS, L. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M.; SMITH, J.; DUNNE, P. J.; FLETCHER, J. M.; PLUNKETT, F. J.; EBELING, S. B.; LOMBARDI, G.; RUSTIN, M. H.; BIJLSMA, J. W.; LAFEBER, F. P.; SALMON, M.; AKBAR, A. N. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, n. 6, p. 1621-30, 2002.

TANG, Q.; KRUMMEL, M. F. Imaging the function of regulatory T cells in vivo. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 496-502, 2006.

TARBELL, K. V.; YAMAZAKI, S.; STEINMAN, R. M. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. **Semin. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 93-102, 2006.

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

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today.**, v. 11, n. 1, p. 7-9, 1995.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 430-4, 2007.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L. H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int. Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 13-22, 1996.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. [High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*]. **CR. Acad. Sci. III.**, v. 304, n. 4, p. 89-92, 1987.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 1, p. 115-9, 1986.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M. T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol.**, v. 146, n. 10, p. 3626-32, 1991.

VALENTE, S. A.; DA COSTA VALENTE, V.; DAS NEVES PINTO, A. Y.; DE JESUS BARBOSA CESAR, M.; DOS SANTOS, M. P.; MIRANDA, C. O.; CUERVO, P.; FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 3, p. 291-7, 2009.

VALENTE SA, VALENTE VC, FRAIHA NETO H. Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32 (Suppl. 2): 51-55, 1999.

VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4033-40, 1999.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **Am. Heart. J.**, v. 127, n. 1, p. 151-62, 1994.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C.; PASCOAL, V. P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, P. S.; ELOI-SANTOS, S. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

WALZER, T.; DALOD, M.; ROBBINS, S. H.; ZITVOGEL, L.; VIVIER, E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". **Blood.**, v. 106, n. 7, p. 2252-8, 2005.

WHO HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. **WHO. Tech. Rep. Ser.**, 905: i-vi, 1-109, 2002.

WHO HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: control and elimination. **World Health Organ.**, A63/17 Provisional agenda item 11.14, 2010

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F.; SONNENFELD, G.; ZLOTNIK, A. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 49, n. 1, p. 61-6, 1985.

YAMAZAKI, S.; INABA, K.; TARBELL, K. V.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 314-29, 2006.

YAMAZAKI, S.; IYODA, T.; TARBELL, K.; OLSON, K.; VELINZON, K.; INABA, K.; STEINMAN, R. M. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 2, p. 235-47, 2003.

YOUNES-CHENOUFFI, A.B.; HONTEBEYRIE-JOSCOVICZ, M.; TRICOTTET, V.; EISSEN, H.; REYNES, M.; SAID, G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82:77-83, 1998.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 203-13, 1996.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, 2009.

11 - ANEXOS