

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia

**Estudo da cardiopatia chagásica em camundongos que apresentam
disfunção colinérgica**

ALINE ALVES LARA GOMES

Belo Horizonte
2014

ALINE ALVES LARA GOMES

**Estudo da cardiopatia chagásica em camundongos que apresentam
disfunção colinérgica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

Belo Horizonte

2014

"ESTUDO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA EM CAMUNDONGOS QUE APRESENTAM DISFUNÇÃO COLINÉRGICA"

ALINE ALVES LARA GOMES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 21 de fevereiro de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



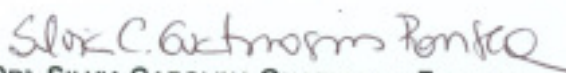
PROFA. DRª. CARLA MÁXIMO PRADO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



PROF. DR. HELIO CESAR SALGADO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



PROFA. DRª. LUCIANA DE OLIVEIRA ANDRADE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. SILVIA CAROLINA GUATIMOSIM FONSECA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2014

RESUMO

Recentemente foi descrito o papel antiinflamatório da acetilcolina (ACh). Similar ao seu papel de neurotransmissor, a ACh é um mediador do Sistema Imune, agindo negativamente em processos inflamatórios. Com intuito de avaliar o papel da ACh no processo inflamatório cardíaco, camundongos VAcHT KD^{HOM}, que apresentam aproximadamente 65% de redução na expressão do transportador vesicular de ACh (VAcHT) e conseqüente redução na liberação de ACh, foram infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. Apesar de não ter sido observada diferença significativa na parasitemia, o parasitismo cardíaco foi maior (~50%) nos camundongos VAcHT KD^{HOM} aos 35 dias pós infecção (dpi), sendo similar ao dos camundongos WT aos 40 e 55dpi. Esse aumento no parasitismo cardíaco pode se explicado, pelo menos em parte, pela redução na expressão de iNOS no coração dos camundongos VAcHT KD^{HOM}. Cortes histológicos cardíacos revelaram maior infiltrado inflamatório em corações de camundongos VAcHT KD^{HOM} aos 35 dpi quando comparado aos corações de camundongos WT. Para melhor entender o aumento do infiltrado inflamatório cardíaco foram feitas dosagens de citocinas inflamatórias no coração dos camundongos WT e VAcHT KD^{HOM} aos 20, 35, 40 e 55 dpi, os resultados foram expressos em ng/mL. Não houve diferença na produção basal de citocinas entre os camundongos WT e VAcHT KD^{HOM} controles. Os níveis de TNF- α (WT=0.625 \pm 0.16; VAcHT KD^{HOM}=2.00 \pm 0.26), IL-6 (WT=1.598 \pm 0.32; VAcHT KD^{HOM}=3.20 \pm 0.14), IL-12 (WT=2.05 \pm 0.73; VAcHT KD^{HOM}=3.69 \pm 0.37) e IFN- γ (WT=0.682 \pm 0.13; VAcHT KD^{HOM}=2.273 \pm 0.35) mantiveram-se elevados nos corações dos camundongos VAcHT KD^{HOM} aos 55dpi, enquanto que os mesmos decaíram nos corações dos camundongos WT infectados. Contrariamente, os níveis de produção da IL-10 decaíram após 40 dpi nos corações de camundongos VAcHT KD^{HOM} (40dpi=1.399 \pm 0.293; 55dpi=0.872 \pm 0.07). Já a produção de TGF- β , mesmo com a queda entre 40 e 55 dpi, continuou maior nos corações dos camundongos VAcHT KD^{HOM} quando comparada aos WT aos 55dpi (WT=1.61 \pm 0.37; VAcHT KD^{HOM}=5.12 \pm 0.67). A expressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de INF- γ em baço de camundongos WT e VAcHT KD^{HOM}, controles e infectados, foi investigada através de citometria de fluxo (FACS). A expressão de células T CD4⁺ em baço de camundongos WT e VAcHT KD^{HOM} foi semelhante durante a infecção por *T.cruzi*. Porém, a infecção aumentou a expressão de linfócitos T CD8⁺ no baço de camundongos VAcHT KD^{HOM} aos 55 dpi quando comparado aos camundongos WT (WT=2.13; VAcHT KD^{HOM}=3.89). Após ser identificada que a expressão basal de RNAm para o gene que codifica FOXP-3 foi cinco vezes maior no coração dos camundongos VAcHT KD^{HOM} quando comparados aos WT e que esse comportamento foi observado durante a infecção, contagem de linfócitos T reg foi avaliada através de FACS nos dois genótipos. Os resultados encontrados mostraram que tanto no timo (WT=1.09 ; VAcHT KD^{HOM}=3.38) quanto no baço (WT=2.18; VAcHT KD^{HOM}=68.5) foi encontrada maior expressão de células Treg nos camundongos VAcHT KD^{HOM} aos 35 dpi. Para comprovar que a redução na liberação de ACh era o fator primordial para os fenótipos observados em camundongos VAcHT KD^{HOM}, esses camundongos foram infectados com *T. cruzi* e tratados durante 55 dias com piridostigmina (PIR), um inibidor de colinesterase. Os resultados de FACS mostraram que o tratamento com PIR reverteu a porcentagem de expressão de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ em baço

de camundongos VAcT KD^{HOM} para níveis semelhantes aos encontrados em camundongos WT infectados. Além disso, a expressão de linfócitos T regulatórios aumentou ainda mais no baço de camundongos VAcT KD^{HOM} infectados e tratados com PIR, sugerindo que seja esse o mecanismo contrarregulatório dos linfócitos T produtores de IFN- γ . A avaliação da função cardíaca revelou que infecção com *T. cruzi* causou um remodelamento menos evidente em camundongos VAcT KD^{HOM} do que em camundongos WT, o que pode ser devido a maior expressão de linfócitos Treg em camundongos VAcT KD^{HOM}. Os dados obtidos indicam que a ACh regula o processo inflamatório cardíaco em infecção por *T. cruzi* e também sugerem um papel crucial da ACh para a contenção da inflamação no coração.

Palavras-chave: acetilcolina, inflamação, Treg, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Recently was described the antiinflammatory role of acetylcholine (ACh). Similar to its role as a neurotransmitter, ACh is a mediator of the immune system, acting negatively in inflammatory processes. In order to evaluate the role of ACh in cardiac inflammation, VACHT KD^{HOM} mice, which have approximately 65 % reduction in the expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and the consequent reduction in the ACh release, were infected with 50 trypomastigotes of Colombian *Trypanosoma cruzi* strain. Although there have been significant differences in parasitemia, cardiac parasitism was higher (~ 50 %) in VACHT KD^{HOM} mice at 35 days post infection (dpi), similar to that of WT mice at 40 and 55dpi. This increase in cardiac parasite can be explained, at least in part, by a reduction in iNOS expression in the heart of VACHT KD^{HOM} mice. Heart histology data revealed higher inflammatory infiltrate in hearts of VACHT KD^{HOM} mice at 35 dpi when compared to WT hearts. To better understand the increased cardiac inflammatory infiltrate, measurements of inflammatory cytokines were made in hearts of WT and VACHT KD^{HOM} mice at 20, 35, 40 , and 55 dpi , and the results were expressed in ng/ml. We didn't observe differences in the basal production of cytokines between control groups. The levels of TNF- α (WT=0.625 \pm 0.16 ; VACHT KD^{HOM}= 2.00 \pm 0.26) , IL-6 (WT =1.598 \pm 0.32 ; VACHT KD^{HOM}= 3.20 \pm 0.14), IL-12 (WT = 2.05 \pm 0.73 ; VACHT KD^{HOM}= 3.69 \pm 0.37) and IFN- γ (WT= 0.682 \pm 0.13 ; VACHT KD^{HOM}= 2.273 \pm 0.35) remained high in the hearts of VACHT KD^{HOM} mice in 55dpi , while they decreased in the hearts of infected WT mice. In contrast, levels of IL-10 production decreased after 40 dpi in the hearts of VACHT KD^{HOM} mice (40dpi=1.399 \pm 0.293; 55dpi=0.872 \pm 0.07). The production of TGF- β , even with the drop between 40 and 55 dpi, continued higher in hearts of VACHT KD^{HOM} mice compared to WT (WT =1.61 \pm 0.37 ; VACHT KD^{HOM}= 0.67 \pm 5.12). The expression of INF- γ producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen of controls and infected mice from WT and VACHT KD^{HOM} was investigated by flow cytometry (FACS). The CD4⁺ T cells expression in the spleen of WT and VACHT KD^{HOM} mice was similar during *T. cruzi* infection. However, the infection increased the CD8⁺ T cells expression in the spleen of VACHT KD^{HOM} mice at 55 dpi when compared to WT mice (WT = 2.13; VACHT KD^{HOM}= 3.89). After the observation that the basal expression of mRNA for the FOXP-3 encoding gene was five times greater in the heart of VACHT KD^{HOM} mice when compared to WT, and that this profile was observed during the infection, T reg lymphocytes were counted, using FACS, in both genotypes. The results showed that both in the thymus (WT=1.09; VACHT KD^{HOM}=3.38) and in the spleen (WT=2.18; VACHT KD^{HOM}=68.5) a higher population of Treg cells was found in VACHT KD^{HOM} mice at 35 dpi. To prove that the reduction of ACh release was the primary factor for the observed phenotypes in VACHT KD^{HOM} mice, these mice were infected with *T. cruzi* and treated for 55 days with pyridostigmine (PYR), a cholinesterase inhibitor. FACS results showed that PYR treatment reversed the expression of INF- γ producing CD8⁺ cells in the spleen of VACHT KD^{HOM} mice to levels similar to that found in WT infected mice. Furthermore, the expression of regulatory lymphocytes in the spleen was further increased infected VACHT KD^{HOM} mice treated with PYR, suggesting that this mechanism may counterregulate T lymphocytes INF- γ producers. The assessment of cardiac function revealed that infection by *T. cruzi* caused a less evident remodeling in VACHT KD^{HOM} mice than in WT mice, which may be due to increased Treg lymphocytes expression in VACHT KD^{HOM} mice. The data

indicate that ACh modulates the cardiac inflammatory process in infection by *T. cruzi* and also suggest a crucial role of ACh for the control of inflammation in the heart.

Keywords: acetylcholine, inflammation, Treg, *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 7$ nAChR - Receptor de acetilcolina $\alpha 7$ nicotínico

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ACK - Amonio-cloreto-potassio

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

ANP - Peptídeo natriurético atrial

BSA - Albumina sérica bovina

Ca²⁺ - Cálcio

cDNA - DNA complementar

CO₂ - Gás carbônico

CREB - cAMP response element-binding protein

DC- Doença de Chagas

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeo

DPI - Dias pós infecção

FBS - Soro fetal bovino

FOXP-3 - *Forkhead box P3*

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

h – Hora

HE - Hematoxilina e eosina

HMGB1- *High-mobility group box 1*

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IFN-γ - Interferon-γ

IL- Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

JAK - Janus cinase

Kg – Quilograma

KO – *Knockout*

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

NaNO₂ - Nitrito de sódio

NE - Noradrenalina

NF-κB - Fator nuclear kappa B

ng – Nanograma

NK - Natural killer

nm - Nanômetro

NO - Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

OPD - o-fenilenediamina

PBS - Tampão fosfato salino

PIR – Piridostigmina

qPCR - *quantitative polymerase chain reaction*

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

RPM - Rotação por minuto

STAT - Sinal de tradução e ativador de transcrição

TGF- β - Fator de transformação do crescimento β

TNF- α - Fator de necrose tumoral do tipo α

T reg - T regulatório

VAC_hT - Transportador vesicular de acetilcolina

VAC_hT KD^{HOM} - VAC_hT *Knockdown* homozigoto

VAC_hT KD^{HET} - VAC_hT *Knockdown* heterozigoto

WT - *Wild type*

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 2: Eventos celulares envolvidos na resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por <i>T.cruzi</i>	27
Figura 3: Representação esquemática da via antiinflamatória colinérgica ou reflexo inflamatório.....	39
Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias através do receptor $\alpha 7$ -nicotínico com ativação da via JAK2/STAT3, MAPK e I- κ B	40
Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias através do receptor $\alpha 7$ -nicotínico pela ativação da via CREB/ <i>cfos</i>	41
Figura 6: Cultura de macrófagos de camundongos VACHT KD ^{HOM} incubadas com <i>T. cruzi</i> apresentaram número reduzido de tripomastigotas no sobrenadante.....	52
Figura 7: <i>Uptake</i> de <i>T. cruzi</i> foi semelhante em culturas de macrófagos de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM}	53
Figura 8: Cultura de macrófagos de camundongos VACHT KD ^{HOM} é menos infectada pelo <i>T. cruzi</i>	54
Figura 9: Dosagem de nitrito foi similar em culturas de macrófagos de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} estimulados com IFN- γ e <i>T. cruzi</i>	55

Figura 10: Sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos WT tratados com vesamicol apresentou redução no número de tripomastigotas.....	56
Figura 11: Curva de sobrevivência de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	57
Figura 12: Curva de parasitemia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	61
Figura 13: Camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentaram maior parasitismo cardíaco aos 35dpi.....	62
Figura 14: Reduzida expressão de iNOS em tecido cardíaco de camundongos VACHT KD ^{HOM} antes e após a infecção por <i>T. cruzi</i>	63
Figura 15: Camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam aumento no infiltrado inflamatório aos 35 dpi.	64
Figura 16: Cinética da produção de IL-12 nos corações de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i>	65
Figura 17: Camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados apresentaram alteração na cinética de produção de TNF- α	66
Figura 18: Camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados apresentaram alteração na cinética de IL-6.	67
Figura 19: Camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados apresentaram alteração na cinética de IFN- γ	68

Figura 20: Análise funcional cardíaca obtida por meio de ecocardiografia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	69
Figura 21: Análise morfológica do Ventrículo Esquerdo obtida por meio de ecocardiografia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	70
Figura 22: Análise morfológica do Ventrículo Direito obtida por meio de ecocardiografia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	71
Figura 23: Camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados apresentaram alteração na cinética de produção de IL-10.	72
Figura 24: Camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados apresentaram alteração na cinética de produção de TGF- β	73
Figura 25: Camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam aumento na expressão de FOXP-3 no coração em condições basais e após infecção por <i>T.cruzi</i>	74
Figura 26: Expressão de linfócitos Treg no timo e no baço foi maior em camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	76
Figura 27: Cinética na população de linfócitos T CD8 ⁺ em baço de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	77
Figura 28: Cinética na população de linfócitos T CD4 ⁺ no baço de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i>	78
Figura 29: Mudanças na expressão de células Treg no timo e no baço de camundongos VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T.cruzi</i> e tratados com piridostigmina.	80

Figura 30: O tratamento com piridostigmina reverteu a expressão de linfócitos T CD8⁺ isolados do baço de camundongos VChT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*....81

Figura 31: O tratamento com piridostigmina reverteu a expressão de linfócitos T CD4⁺ isolados do baço de camundongos VChT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*. ...82

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Sequência de <i>primers</i> utilizados em qPCR.....	51
Tabela 2: Monitoramento de peso corporal de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} infectados com <i>T. cruzi</i>	58
Tabela 3: Monitoramento do tamanho do coração normalizado pelo comprimento da tíbia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} controles e infectados com <i>T. cruzi</i>	59
Tabela 4: Monitoramento do tamanho do baço normalizado pelo comprimento da tíbia de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} controles e infectados com <i>T. cruzi</i>	60
Quadro 1: Sumário da cinética da produção de citocinas inflamatórias encontradas no coração dos camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} controles e infectados com <i>T.cruzi</i>	107
Tabela 5: Sumário da % da população de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do baço de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} controles e infectados com <i>T.cruzi</i>	108
Tabela 6: Sumário da % da população de linfócitos T regulatório do timo e baço de camundongos WT e VACHT KD ^{HOM} controles e infectados com <i>T.cruzi</i>	109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. JUSTIFICATIVA	22
4. REVISÃO DE LITERATURA	23
4.1. DOENÇA DE CHAGAS	23
4.2. RESPOSTA IMUNE NA DC	26
4.2.1 CITOCINAS	27
4.3. LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS	35
4.4. VIA ANTIINFLAMATÓRIA COLINÉRGICA	37
4.5. MODELO MURINO DE DISFUNÇÃO COLINÉRGICA-VACH KD ^{HOM}	42
4.6. PIRIDOSTIGMINA	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1. ANIMAIS	45

5.2. INFECÇÃO COM AS CEPAS DE <i>T.cruzi</i>	45
5.3. PARASITEMIA	45
5.4. CULTURA DE MACRÓFAGOS.....	46
5.5. DROGAS UTILIZADAS	47
5.6. DOSAGENS DE CITOCINAS POR ELISA.....	47
5.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	48
5.8. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS E CITOMETRIA DE FLUXO	48
5.9. ECOCARDIOGRAFIA	49
5.10. EXTRAÇÃO DE RNA	50
5.11. TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR EM TEMPO REAL.....	50
5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6. RESULTADOS.....	52
6.1. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> : CULTURA DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS WT E VACHT KD ^{HOM} INFECTADAS COM <i>T. cruzi</i>	52
6.2. MODELO <i>IN VIVO</i> : CAMUNDONGOS WT E VACHT KD ^{HOM} INFECTADOS COM <i>T. cruzi</i>	57
6.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CAMUNDONGOS WT E VACHT KD ^{HOM} INFECTADOS COM <i>T. cruzi</i>	57
6.2.2. AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM <i>T. cruzi</i> NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS WT E VACHT KD ^{HOM}	62

6.2.3. IDENTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T NO TIMO E NO BAÇO DE CAMUNDONGOS WT E VACHT KD ^{HOM} INFECTADOS COM <i>T. cruzi</i>	75
6.2.4. TRATAMENTO COM PIRIDOSTIGMINA DURANTE 55 DIAS MODULA A EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T DE CAMUNDONGOS VACHT KD ^{HOM} INFECTADOS COM <i>T. cruzi</i>	79
7. DISCUSSÃO	83
8. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICES	106

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta imune essencial que permite a sobrevivência do indivíduo durante a infecção ou lesão e mantém a homeostase do tecido sob uma variedade de condições nocivas (Medzhitov, 2010). Independente da origem do estímulo que leva a inflamação, se é por patógenos ou se é estéril, uma cascata de sinais é ativada causando o recrutamento de células inflamatórias, que têm a função primária de erradicar o patógeno e limpar debris celulares ocasionados por morte celular, enquanto ativa mecanismos de reparo tecidual. Porém, quando a inflamação não é capaz de exterminar o agente agressor, tornando-se crônica, a inflamação pode levar o indivíduo a sérias consequências, culminando na disfunção orgânica e morte (Chen & Nuñez, 2010). Em doenças cardiovasculares, a inflamação do miocárdio é um sério agravante que contribui de forma expressiva para o remodelamento do miocárdio, caracterizado por profundas alterações na geometria, estrutura e função cardíaca (Frangogiannis, 2002). Desse modo, estratégias que controlem ou cessem a inflamação são de grande relevância em processos inflamatórios diversos, bem como no sistema cardiovascular.

Tracey (2000) descreveu uma nova via antiinflamatória que tem sido estudada de forma consistente. É chamada de via antiinflamatória colinérgica ou reflexo inflamatório, e tem como principal mediador a acetilcolina (ACh). A ACh tem demonstrado conter os níveis inflamatórios locais e sistêmicos em uma variedade de patologias experimentais.

Assim, esse trabalho teve como objetivo central investigar se a ACh é capaz de modular o processo inflamatório cardíaco em um modelo clássico de miocardite, a Doença de Chagas (DC). Para isso, camundongos VAcHT *knockdown* homocigoto (VAcHT KD^{HOM}) que apresentam aproximadamente 65% de redução na expressão do transportador vesicular da acetilcolina (VAcHT), com consequente redução na liberação de ACh (Prado e cols., 2006) foram infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Os dados obtidos mostraram que a ACh participa no controle do processo inflamatório cardíaco ocasionado pela infecção experimental por *T. cruzi*. Uma vez que

corações de camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram maior parasitismo, infiltrado inflamatório e expressão de citocinas inflamatórias. Uma possível justificativa para esses eventos é a modulação diferenciada de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e T regulatórios do baço encontrada nesses camundongos. Nossos dados mostraram que a ACh regula a produção/expansão de células Treg durante a infecção por *T.cruzi*. Esse fato pode estar associado ao remodelamento cardíaco menos evidente observado nos camundongos VACHT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a redução na liberação de ACh exacerba a resposta imune em processo inflamatório cardíaco durante a infecção experimental por *T.cruzi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Avaliar a taxa de sobrevivência de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*;
- ii) Avaliar a parasitemia e o parasitismo cardíaco de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*;
- iii) Investigar a atividade tripanocida de macrófagos provenientes de camundongos WT e VACHT KD^{HOM};
- iv) Investigar o processo inflamatório cardíaco através da quantificação do infiltrado inflamatório e da produção de citocinas pró e antiinflamatórias em coração de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} controles e chagásicos;
- v) Averiguar a produção/expansão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ durante a infecção experimental com *T. cruzi*;
- vi) Identificar a produção/expansão de linfócitos T regulatórios durante a infecção experimental com *T. cruzi*;
- vii) Comprovar se as alterações na resposta imune em camundongos infectados com *T. cruzi* são decorrentes da deficiência de ACh;
- viii) Avaliar a função cardíaca de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} infectados com *T.cruzi*.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar de todos os avanços e progressos que vem acontecendo na área da terapêutica das patologias cardiovasculares, estas ainda são um grande problema de saúde pública e as principais responsáveis por morte em todo o mundo (WHO, 2010). Considerando que o sistema imune pode atuar ativamente no desenvolvimento e agravamento das doenças cardíacas e que ACh participa da homeostase inflamatória, torna-se necessário o melhor entendimento da interação sistema imune - ACh - doenças cardiovasculares. Baseando-se no fato que a DC é uma patologia de intenso processo inflamatório cardíaco, a proposta desse trabalho foi avaliar se ACh modula a resposta imune cardíaca durante o processo inflamatório causado pela infecção por *T.cruzi*. A inflamação do miocárdio é um dos grandes fatores associados a piora da função cardíaca e desta forma estratégias que consigam resolver a inflamação e restaurar a função do coração são extremamente importantes na perspectiva de melhora de tratamento dessas patologias.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana, é uma doença endêmica da América Latina e segundo os dados publicados pela Organização Mundial da Saúde em 2013 há entre 7 e 8 milhões de pessoas infectadas.

Aspectos clínicos da DC, bem como o ciclo de transmissão e agente etiológico, foram descritos pela primeira vez pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em 1909. O agente causador da patologia chagásica é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente a ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* que infecta animais mamíferos incluindo humanos (Hoare & Wallace, 1966). O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo e envolve um vetor intermediário invertebrado hematófago da subfamília *Triatominae* e um hospedeiro vertebrado mamífero. No triatomíneo (insetos da família *Reduviidae*) é possível encontrar no tubo digestivo as formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas, sendo ambas flageladas (Brenner, 1973). A infecção natural do hospedeiro mamífero ocorre quando formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes), eliminadas nas fezes do inseto vetor penetram na pele lesada ou mucosas. Ao penetrar nas células, as formas tripomastigotas escapam do fagolisossomo e sofrem, no citoplasma, diferenciação celular para as formas amastigotas. Em aproximadamente cinco dias, tais formas se transformam em tripomastigotas e iniciam um intenso movimento que contribui para a ruptura da célula hospedeira levando a liberação dos parasitos e infecção de novas células (Hoare & Wallace, 1966). Portanto, no hospedeiro vertebrado são encontradas a forma tripomastigota, que é vista na circulação sanguínea e é a forma infectante de células nucleadas (incluindo células dendríticas, musculares, nervosas, macrófagos, cardiomiócitos e fibroblastos) e a forma amastigota, que se replica no citosol da célula do hospedeiro (Mayer, 1914) (Figura 1).

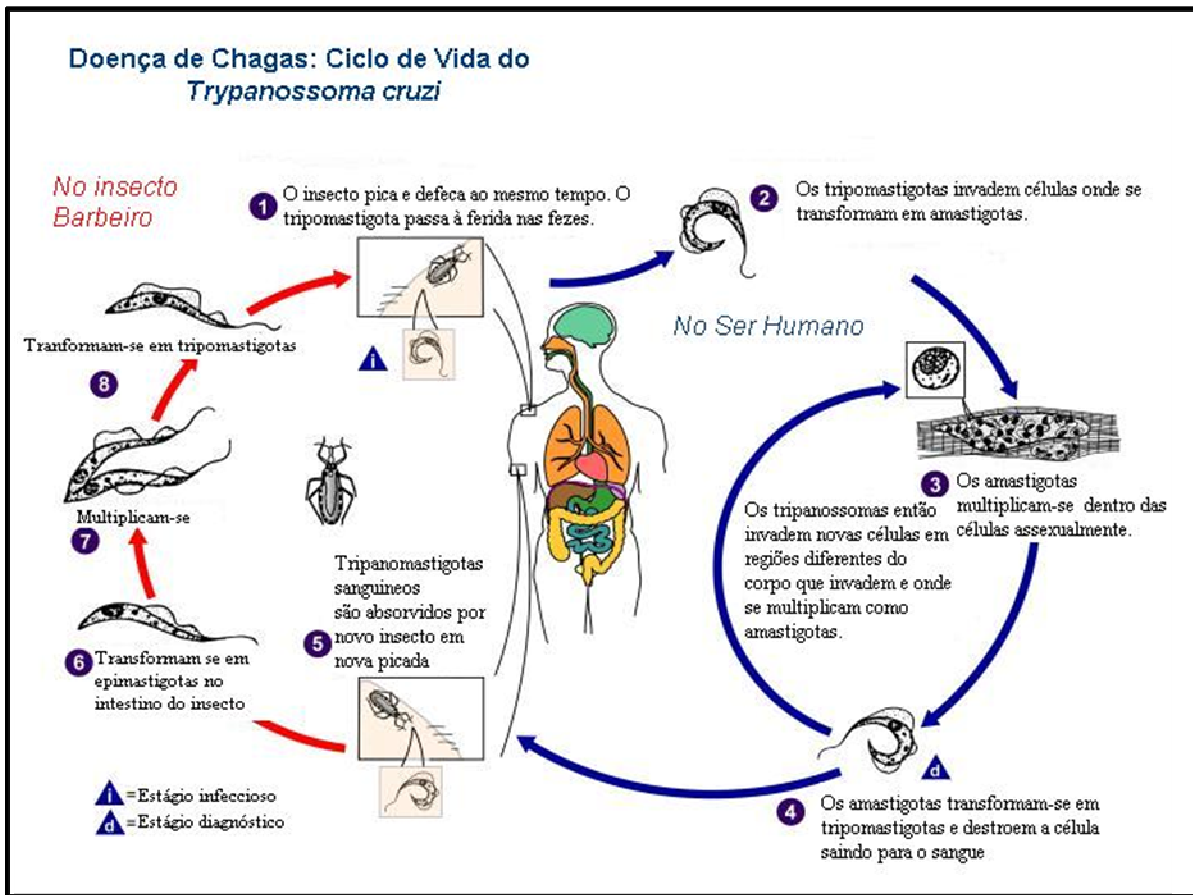


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Além da clássica transmissão vetorial, a DC pode ser também transmitida através de outros mecanismos, como transfusão sanguínea e via placentária (Rassi e cols., 2010). Além disso, há também mecanismos alternativos de transmissão (Dias & Neto, 2011), como através de transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e via oral, sendo esta última relacionada à ingestão de alimentos contaminados (Toso e cols., 2011). Outra forma de disseminação da DC ocorre por meio da migração de indivíduos infectados para áreas não endêmicas, uma vez que imigrantes infectados oferecem risco de infecção através de transfusão de sangue ou transmissão congênita (Coura e Borges-Pereira, 2010; Nagajyothi e cols, 2012). Estima-se que mais de 300.000 pessoas infectadas vivem nos Estados Unidos (Bern & Montgomery, 2009). Por isso, mesmo com o intenso controle da transmissão da DC nos últimos 20 anos por meio de estratégias de eliminação do vetor e melhora na segurança das transfusões

sanguíneas em áreas endêmicas, a DC continua sendo um importante problema de saúde pública mesmo em países não endêmicos (Nagajyothi e cols, 2012).

A infecção inicial é seguida por um período pré-latente, de tempo variável, e devido a multiplicação exponencial dos parasitas, surge uma fase aguda caracterizada por evidente parasitemia observada no exame direto do sangue. Essa fase possui duração de um a três meses e na maioria dos casos os sintomas são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico. Em casos de transmissão vetorial, é possível observar o sinal de porta de entrada do *T. cruzi* através da pele (chagoma de inoculação) ou próximo a mucosa ocular, que se manifesta como uma reação da conjuntiva com edema das pálpebras de um lado da face (sinal de Romana) (Romana, 1935). Já na fase crônica da DC normalmente não é observado parasitas circulantes e na maioria dos casos os pacientes são sorologicamente positivos anti-*Trypanosoma cruzi*, porém não desenvolvem manifestações clínicas. Estima-se que 20% a 30% dos indivíduos infectados irão desenvolver os sintomas clínicos crônicos da patologia chagásica, podendo apresentar manifestações cardíacas ou gastrointestinais, ou ambas (Prata, 2001).

A forma digestiva é caracterizada principalmente pela ocorrência de dilatação do esôfago ou cólon, provavelmente como consequência de injúria do sistema nervoso entérico (Matsuda e cols., 2009). Por sua vez, a forma cardíaca da DC pode se apresentar com uma série de distúrbios no coração, como arritmias, insuficiência cardíaca, cardiomegalia, disautonomia, danos na vasculatura (Gutierrez e cols., 2009; Machado e cols., 2012). Alterações na condução do estímulo elétrico, eventos de cardioembolismo, bem como aneurisma apical do ventrículo esquerdo são outros sinais comuns na cardiomiopatia chagásica crônica. Além disso, análises histopatológicas do coração podem revelar a ocorrência de hipertrofia dos cardiomiócitos, inflamação crônica e fibrose (Rossi e cols., 2010; Machado e cols., 2012).

A cardiomiopatia é a principal forma clínica da DC e a responsável pela grande mortalidade causada por essa patologia (Prata, 2001). Alguns estudos vêm tentando elucidar a patogênese e etiologia da cardiomiopatia chagásica crônica. Dentre as hipóteses, está a persistência do parasito no tecido, o desencadeamento de processos

autoimunes e a permanência de um processo inflamatório, além de mecanismos neurogênicos (Marin-Neto e cols., 2007; Gutierrez e cols., 2009; Nagajyothi e cols., 2012). Além disso, para o desenvolvimento da doença chagásica cardíaca são importantes tanto fatores genéticos do parasito, relacionados com as estratégias de evasão e estimulação do sistema imune do próprio *T. cruzi*, quanto fatores do hospedeiro, tais como a deficiência na homeostase imunológica (Gutierrez e cols., 2009).

4.2. RESPOSTA IMUNE NA DC

O Sistema Imune inato é ativado rapidamente e principalmente quando células dendríticas e macrófagos residentes no tecido infectado reconhecem moléculas produzidas pelo *T. cruzi* ou seu próprio DNA (Almeida e Gazzinelli, 2001, Shoda e cols., 2001). Em resposta essas células começam a produzir e liberar IL-12 e TNF- α (Camargos e cols., 1997). Uma vez liberada, a IL-12 estimula as células Natural Killer (NK) a produzirem IFN- γ , enquanto o TNF- α estimula o próprio macrófago a produzir IL-12 o que resultará em aumento na produção de IFN- γ . Essa duas vias se retroalimentam aumentando a produção dessas citocinas, que são as responsáveis por ativar o sistema imune adaptativo, gerando células T CD4⁺ e CD8⁺ que continuam a produzir IFN- γ , que é a principal citocina envolvida no controle da infecção pelo *T. cruzi* (Cardillo e cols., 1996) (Figura 2). Citocinas antiinflamatórias como a IL-10 e, modulatórias como o TGF- β , controlam o nível de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , para que os tecidos não sejam danificados pelo excesso de inflamação. Assim, a resistência a infecção por *T. cruzi* é resultado do balanço entre os níveis de IFN- γ e IL-10 produzidos pelo hospedeiro (Cardillo e cols., 1996, Silva e cols., 1991). A resposta imune gerada é muito efetiva no controle, mas não na eliminação do *T. cruzi* (Dutra e cols., 2005; Grupta e cols., 2011).

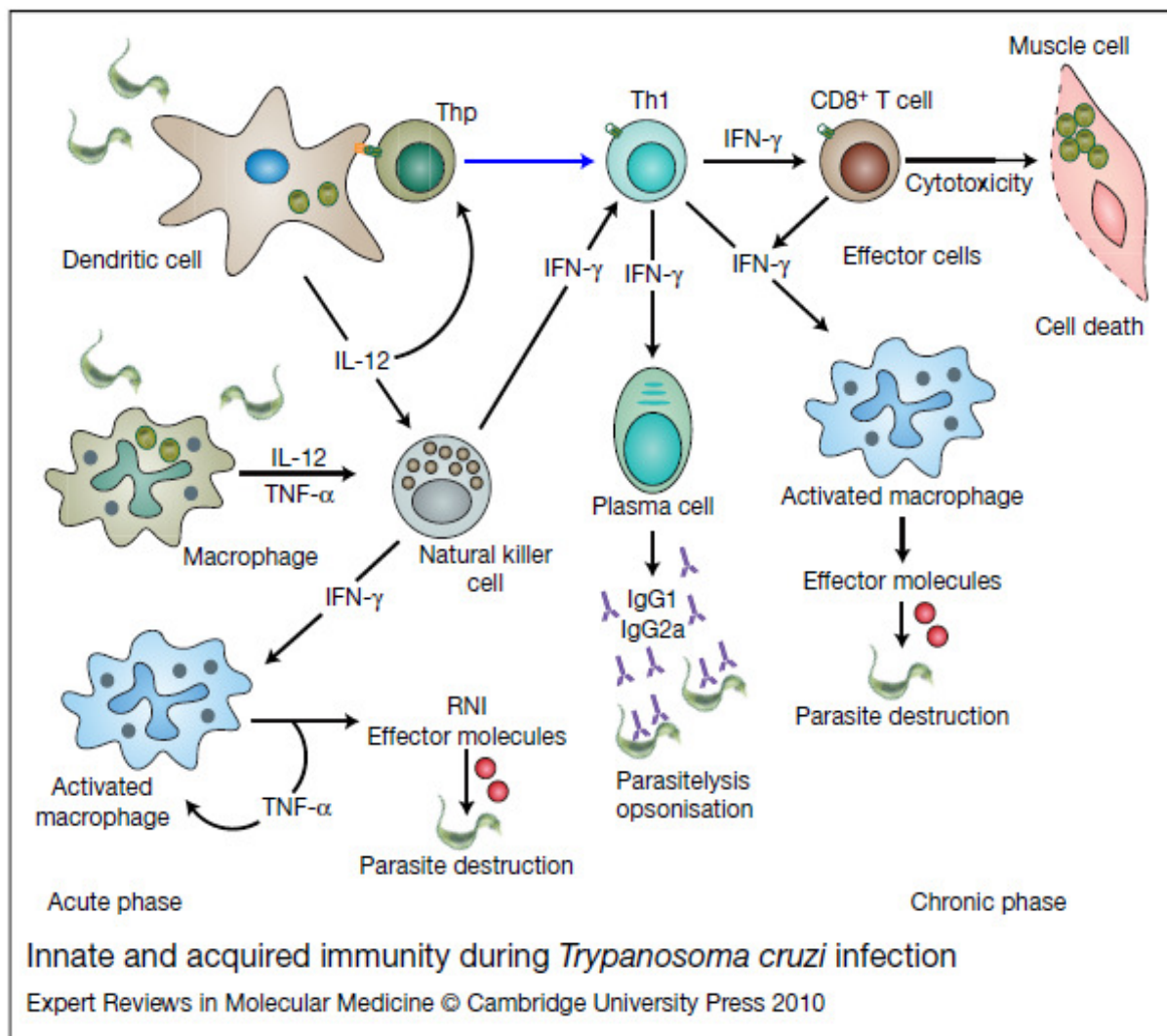


Figura 2: Eventos celulares envolvidos na resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *T.cruzi*.

4.2.1. CITOCINAS

Citocinas são proteínas secretadas por diversas células e agem de forma autocrina, paracrina e justácrina coordenando respostas, incluindo imunes, apropriadas. Portanto as citocinas são mensageiros químicos utilizados pelas células para sua comunicação. Elas incluem uma diversidade de interleucinas (IL), interferons e fatores de crescimento. Sabe-se também que outros tipos celulares também são capazes de sintetizar citocinas, como por exemplo as células epiteliais (Nagarkar e

cols., 2012), fibroblastos (Fredriksson e cols., 2003) e os cardiomiócitos (Machado e cols.; 2000).

a) IL-12

A IL-12 foi primeiramente descrita como fator de estimulação de células NK. É uma glicoproteína heterodímera formada pelas subunidades p35 e p40 que são independentemente reguladas. Mas apesar da p35 ser expressa constitutivamente em vários tipos celulares e a p40 ser expressa somente em células secretoras de IL-12, a co-expressão é necessária para a atividade biológica da IL-12 (Jalah e cols., 2013). Ela é produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, micróglia, células dendríticas ativadas entre outras. A IL-12 medeia o desenvolvimento e a manutenção de células Th1 por induzir a produção de IFN- γ , sendo seus receptores expressos principalmente em células T e NK (Hsieh e cols, 1993). A redução de IL-12 conseqüentemente piora a resposta Th1 e aumenta a susceptibilidade a infecções por patógenos intracelulares (Akdis e cols., 2011).

Camundongos *Knockout* (KO) para a subunidade p40 da IL-12 (IL-12p40KO) quando infectados com a cepa clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e comparados aos WT também infectados apresentaram aumento do parasitismo na medula vertebral com conseqüente disfunção motora (Bombeiro e cols, 2012). Adicionalmente, cultura *in vitro* de macrófagos peritoneais desses camundongos apresentaram menor atividade tripanocida quando estimulados com IFN- γ , corroborando os dados de maior número de macrófagos invadidos pelo parasita no infiltrado inflamatório medular. Além disso, a cinética da expressão de RNAm para os genes que codificam CD3, TNF- α , IFN- γ , iNOS, IL-10 e arginase I manteve-se similar entre os dois grupos até a quarta semana pós infecção. Da quarta para a quinta semana ocorreu uma mudança na expressão desses genes, sendo maior na medula dos camundongos IL-12p40KO e permanecendo elevada até a sexta semana. Os dados mostram que apesar da IL-12p40 não ser a única responsável pela estimulação de IFN- γ na infecção por *T. cruzi*,

ela é essencial para o orquestramento da resposta inflamatória no controle do parasita (Bombeiros e cols., 2012).

b) IL-6

A IL-6 é multifuncional, pleiotrópica envolvida na regulação da resposta imune, hematopoiese e inflamação. A família da IL-6 ativa cascatas de sinalização envolvidas com diferenciação, proliferação, apoptose e sobrevivência celular. É produzida por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos em resposta a diferentes estímulos (IL1, IL-17 a TNF- α). A IL-6 direciona o tráfego de leucócitos, promove a proliferação de células T, diferenciação e sobrevivência de células B e a produção de anticorpos (Hirano e cols., 1985). A IL-6 age via gp130 ativando a via JAK/STAT3. Quando STAT3 está fosforilada ela é conduzida para o núcleo, onde ativa a transcrição de IL-6, a qual está envolvida na defesa, inflamação e citoproteção. Outras vias que também podem ser ativadas são Ras-Erk1/2/MAPK e PI3K/AKT (Takahashi-Tezuka e cols, 1998).

No coração diversos estudos tem mostrado que a IL-6 tem ação cardioprotetora. Jia e colaboradores (2012) mostraram que o pré-tratamento com IL-6 foi capaz de aumentar a viabilidade de cardiomiócitos incubados com H₂O₂ (200 μ M) durante três horas. Já Ponce e colaboradores (2012) observaram que cultura de cardiomiócitos de camundongos BALB/c neonatais quando infectados com *T.cruzi* apresentam aumento da secreção de IL-6, a qual agiu essencialmente como um fator anti-apoptótico. Por outro lado, altas taxas de IL-6 circulantes e no tecido cardíaco após infarto do miocárdio tem relação com aumento de morbidade-mortalidade (Frangogiannis e cols., 2002). Além disso, foi observado fibrose, hipertrofia e disfunção diastólica em ratos infundidos com IL-6 durante 7 dias com bombas osmóticas (Meléndez e cols., 2010).

c) IL-10

A IL-10 é um fator antiinflamatório e um importante regulador de vários aspectos da resposta imune. A IL-10 é produzida por células T regulatórias, monócitos, células B, NK, macrófagos e células dendríticas. A IL-10, por exemplo, inibe a ação de células apresentadoras de antígeno por reduzir a produção de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) da classe II, além de diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de macrófagos e monócitos (Akdis e cols., 2009) e de reduzir a expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocinas (De Waal e cols., 1991). Em contraste com seus efeitos inibitórios sobre os linfócitos T, a IL-10 promove sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B em humanos (Akdis e cols., 2009). Camundongos deficientes em IL-10 têm prejuízo no crescimento, são anêmicos e espontaneamente desenvolvem colite crônica (Kuhn e cols., 1993).

Roffê e colaboradores (2012) infectaram duas linhagens de camundongos de susceptibilidade distintas com a cepa Colombiana de *T.cruzi* para averiguar os possíveis fatores inflamatórios que pudessem justificar a diferença na resistência à infecção. A linhagem mais susceptível, C3H/HeSnJ, apresentou maior infiltrado inflamatório cardíaco, tendo prevalência de monócitos e macrófagos, diferente dos camundongos C57BL/6J, resistentes a infecção, que tiveram maior concentração de linfócitos T CD8⁺ aos 30 dpi. Dentre uma variedade de fatores imunomodulatórios, inflamatórios e antimicrobiais, a expressão de IL-10 no coração foi aproximadamente dez vezes maior nos camundongos C57BL/6J quando comparados aos camundongos C3H/HeSnJ. Porém, a população de células T reg no coração de ambos os grupos não foi diferente. Mas, o infiltrado inflamatório cardíaco de camundongos C57BL/6J teve uma porcentagem de linfócitos T CD8⁺IL-10⁺ e também de CD8⁺IFN- γ ⁺IL-10⁺ aproximadamente dez vezes maior quando comparado a camundongos C3H/HeSnJ. Comprovando a ação cardioprotetora da IL-10 em camundongos C57BL/6J, camundongos deficientes em IL-10 de mesmo *background* foram infectados com *T. cruzi* e apresentaram as mesmas características que os camundongos C3H/HeSnJ. Esse e outros trabalhos (Hunter e cols, 1997; Ho"lscher e cols., 2000) indicam que a IL-10 protege os camundongos infectados com *T. cruzi* e com miocardite aguda da morte.

Além disso, estudos mostram que pacientes chagásicos indeterminados, aqueles que são soropositivos anti-*T.cruzi* mas não apresentam manifestações clínicas, têm aumento nos níveis de IL-10 (Gomes e cols., 2003). Ou ainda, quando não é encontrado diferença na produção de IL-10 entre indivíduos chagásicos indeterminados e indivíduos chagásicos com cardiomiopatia, é detectado um desbalanço da produção de IL10 e IFN- γ , sugerindo que a IL-10 tem papel importante no controle da inflamação, o que protege o músculo cardíaco (D`Ávila e cols., 2009).

d) TNF- α

Na DC o fator de necrose tumoral, TNF- α , é uma citocina considerada importante para a resistência à infecção, uma vez que um maior controle da replicação parasitária requer produção de TNF- α (Montalvão e cols., 2013), mas também é vista como causadora de lesões teciduais. O TNF- α e outras citocinas como o IFN- γ , IL-1 α , IL-6 tem mostrado modular a expressão de moléculas de adesão que participam do processo de recrutamento de linfócitos para os sítios inflamatórios, contribuindo para a progressão da inflamação local na cardiomiopatia chagásica (Laucella e cols., 1999).

Ferreira e colaboradores (2003) demonstraram que os níveis séricos de TNF- α são maiores em indivíduos chagásicos indeterminados quando comparados a indivíduos saudáveis. Porém os níveis séricos de TNF- α são similares entre indivíduos chagásicos indeterminados e com cardiomiopatia chagásica crônica com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEVE) maior ou igual a 50%. No entanto, indivíduos chagásicos com cardiomiopatia chagásica crônica com FEVE menor que 50% têm níveis séricos de TNF- α ainda maiores que os acima citados. Porém, os níveis séricos de TNF- α são similares entre os indivíduos chagásicos com cardiomiopatia chagásica crônica com FEVE menor que 50% e com cardiomiopatia dilatada idiopática. Esses dados mostram a relação direta da produção aumentada de TNF- α com a perda da função cardíaca.

Em autópsia de ventrículo esquerdo de pacientes com DC foram encontradas as seguintes correlações: 1- indivíduos com disfunção cardíaca apresentam aumento de

infiltrado inflamatório quando comparados aos indivíduos chagásicos assintomáticos; 2-dos 11 pacientes com disfunção cardíaca 10 apresentaram associação positiva de células inflamatórias e TNF- α , e em indivíduos assintomáticos 4 em 10 (Rodrigues e cols., 2012). Esses e outros trabalhos demonstram a associação do TNF- α com a insuficiência cardíaca de pacientes infectados com *T. cruzi* (Reis e cols., 1993; Lima e cols., 2001).

A produção excessiva de TNF- α não está associada somente a cardiopatia chagásica, mas também está envolvida com uma série de outras patologias cardíacas, como a redução na contratilidade do miocárdio (Finkel e cols., 1992; Yokoyama e cols., 1993; Naghshin e cols., 2012; Büyükkakilli e cols., 2012), hipertrofia cardíaca (Yokoyama e cols., 1997; Nakamura e cols., 1998; Yu e cols., 2013) e apoptose de cardiomiócitos (Krown e cols., 1996; Wu e cols., 2013). Kubota e colaboradores (1997) mostraram que camundongos que superexpressam TNF- α especificamente no coração apresentaram inflamação no miocárdio, dilatação ventricular e falência congestiva. Esses sintomas foram todos regredidos após o tratamento com receptor solúvel de TNF- α . O que sugere que o TNF- α produzido pelo coração pode ter um papel importante no desenvolvimento de patologias cardíacas.

e) TGF- β

O TGF- β (fator de transformação do crescimento) é um membro da família de fatores de crescimento e diferenciação que tem uma grande variedade de papéis biológicos em processos inflamatórios, fibrose, supressão imune, proliferação, diferenciação e morte celular (Roberts e cols., 1990; Massague e Gomis, 2006).

O TGF- β é um importante regulador da inflamação por mediar efeitos pró-inflamatórios em baixas concentrações e efeitos antiinflamatórios em altas concentrações. Portanto, o TGF- β faz um balanço entre o controle e clearance do organismo infeccioso e a prevenção da patologia causada pela inflamação (Omer e cols., 2000; Savino e cols., 2007). TGF- β estimula a produção de IL-10 em linfócitos T,

ativando diretamente o promotor de IL-10 via co-Smad4 (Kitani e cols., 2003). No coração a principal fonte de TGF- β é o fibroblasto, seguido pelo cardiomiócito em menor escala. Além disso, em processo fibrótico e hipertrófico cardíaco, macrófagos também secretam TGF- β (Araújo-Jorge e cols., 2008).

Na DC o TGF- β está associado a fibrose e a disfunção cardíaca. Para avaliar a influência do TGF- β na cardiomiopatia chagásica, Araújo-Jorge e colaboradores (2002) avaliaram os níveis séricos dessa citocina em quatro grupos de indivíduos: 1- saudáveis; 2- chagásicos indeterminados; 3- chagásicos com cardiomiopatia sem ou com pouca disfunção cardíaca; 4- chagásicos com cardiomiopatia com disfunção cardíaca moderada ou severa. Os resultados mostraram que indivíduos indeterminados tem níveis aumentados de TGF- β quando comparado aos indivíduos normais. O grupo 3 tem mais TGF- β que o grupo 2, e o grupo 4 foi o que teve os níveis mais altos de TGF- β . Esses dados apontam uma relação direta entre a produção de TGF- β e a gravidade da disfunção cardíaca em indivíduos chagásicos. Corroborando esses dados, Oliveira e colaboradores (2012) infectaram camundongos Swiss com a cepa Y de *T.cruzi* e trataram parte desses animais com um inibidor de receptores I e II de TGF- β . Os dados mostraram que o tratamento com o inibidor de TGF- β diminuiu a parasitemia, a mortalidade, melhorou a condução elétrica, além de restaurar a expressão da conexina-43. Com relação a fibrose, foi encontrado menos fibronectina e colagênio I em tecido cardíaco de camundongos chagásicos tratados com inibidor de TGF- β . E de forma interessante, o tratamento com inibidor de TGF- β aos 20 dpi também mostrou ser eficiente na redução da fibrose cardíaca dos camundongos infectados com *T.cruzi*.

Por outro lado, na homeostase inflamatória ou resolução da inflamação, experimentos tem demonstrado que neutrófilos e linfócitos apoptóticos estimulam macrófagos a diminuir a secreção de TNF- α e aumentar a produção de TGF- β e IL-10, providenciando o controle da inflamação, o que resguarda o tecido de lesões (Voll e cols.,1997). Camundongos deficientes em TGF- β apresentam crescimento normal até as 2 primeiras semanas de vida, depois eles desenvolvem uma síndrome inflamatória causando a mortalidade entre a terceira e quarta semana de idade. Esses

camundongos apresentaram intenso infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos em muitos órgãos, mas primariamente no coração e no pulmão. Esse fenótipo sugere um papel de destaque para o TGF- β na regulação homeostática da proliferação de células imunes e de extravasamento nos tecidos (Kulkarni e cols., 1993).

f) IFN- γ

O IFN- γ é produzido por NKs, macrófagos, monócitos, células Th1 e linfócitos B (Levick e Goldspink, 2013). O IFN- γ tem múltiplas funções como: atividade antiviral, citotoxicidade, diferenciação de células Th1, regulação positiva de MHC da classe I e II, inibição do crescimento celular, pró-apoptótico, regula a interação leucócitos-endotélio, aumenta a capacidade microbicida de outros tipos celulares (Akdís e cols., 2011). O IFN- γ é um mediador chave na imunidade inata e adquirida contra patógenos. Em células fagocitárias essa citocina promove a morte intracelular de micróbios através da indução de metabólitos tóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (NO) (Santiago e cols., 2005).

O IFN- γ eleva a atividade anti-parasitária de macrófagos por meio de aumento da produção de NO. Esse efeito do IFN- γ sob os macrófagos é modulado negativamente pela ação de IL-10 e de TGF- β , com consequente aumento no número de parasitas (Gazzinelli e cols., 1992). Assim, camundongos IL-10KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tiveram células imunes no baço produzindo mais IFN- γ e NO, enquanto apresentaram baixa parasitemia e parasitismo tecidual (Abrahamsohn e Coffman, 1996).

A associação entre a produção de IFN- γ e a função cardíaca em indivíduos chagásicos não está bem esclarecida. Tanto pacientes chagásicos com disfunção cardíaca, quanto pacientes chagásicos assintomáticos apresentaram células do infiltrado inflamatório cardíaco produzindo IFN- γ (Reis e cols., 1993; Lima e cols., 2001). Na revisão feita por Levick e Goldspink (2013) dentre estudos experimentais utilizando camundongos, ratos e cães, existem referências relacionando o aumento de IFN- γ com hipertrofia e fibrose cardíaca. Porém, há outros trabalhos que relatam

benefícios do IFN- γ no coração. Por exemplo, camundongos com deleção do gene que codifica IFN- γ apresentaram hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica. Além disso, ratos infundidos com IFN- γ tiveram atenuação da hipertrofia causada por sobrecarga de pressão aórtica. Vê-se assim que o papel do IFN- γ na função cardíaca é controverso.

4.3. LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS

Linfócitos T regulatórios (Treg) são uma subclasse de linfócitos T CD4 que expressam receptores de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição FOXP-3. Essas células são essenciais para preservar a homeostase imune, a sua ausência pode causar rapidamente o desenvolvimento de doenças autoimunes (Sakaguchi e cols., 2010). Existem duas classes de linfócitos Treg, as naturais que são geradas no timo e as induzidas que são oriundas de células T convencionais que passaram a expressar FOXP-3 devido a estímulos do meio, como por exemplo, estímulo antigênico e TGF- β (Horwitz e cols., 2008; Curotto de Lafaille e Lafaille, 2009; Geiger e Tauro, 2012). Apesar de poderem ser consideradas linhagens diferentes, ambas as Treg, natural e induzida, são altamente funcionais na imunoterapia de uma variedade de doenças autoimunes (Mekala e cols., 2005; Zheng e cols., 2006).

No coração, as células Treg parecem ter um papel protetor, como demonstrado por Kvakán e colaboradores (2009) quando trataram camundongos hipertensos induzidos por angiotensina II e observaram redução na hipertrofia e fibrose cardíaca, além de melhora no remodelamento elétrico arritmogênico com distribuição normal da conexina 43.

Adicionalmente, Tang e colaboradores (2012) ao investigar a ocorrência de migração de células Treg para o miocárdio de ratos *sham* e infartados, com ou sem infusão de células Treg, observaram por meio de análises de cortes histológicos e citometria de fluxo que corações de ratos infartados apresentavam maior infiltrado de células Treg quando comparados aos ratos *sham*. Além disso, o aumento de linfócitos Treg no coração de ratos pós infarto do miocárdio mostrou diminuir a apoptose de

cardiomiócitos, reduziu o infiltrado inflamatório de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, suprimiu a expressão gênica de TNF- α e IL-1 β . Corações de ratos *sham* e infartados apresentaram níveis similares de TGF- β , mas corações de ratos infartados apresentaram níveis aumentados de IL-10 quando comparados ao ratos infartados sem infusão de Treg. E por fim, esse mesmo grupo testou o papel da células Treg em cultura de cardiomiócitos neonatais estimulados com LPS. Os dados mostraram que o LPS aumenta os eventos apoptóticos em cardiomiócitos e que isso era revertido com a co-cultura de células Treg, essa proteção se deu através de contato célula-célula (cardiomiócito-Treg) e pela IL-10. Uma vez que ao se bloquear os efeitos das citocinas IL-10 e TGF- β , dois dos principais efetores dos linfócitos Treg, com anticorpos específicos, a ação antiapoptótica exercida pela presença das células Treg na cultura de cardiomiócitos foi abolida com adição do anticorpo anti-IL-10, enquanto que o bloqueio de TGF- β não mostrou alterar a apoptose nessas células.

Embora não exista uma evidencia do real papel das células Treg na DC, estudos prévios já demonstraram a presença de células Treg em sangue periférico de humanos chagásicos indeterminados, além de aumento significativo da presença de Treg no tecido cardíaco (de Araújo e cols., 2011). Ao avaliar a presença de células Treg no sangue periférico de indivíduos chagásicos indeterminados e cardíacos, de Araújo e colaboradores (2012) verificaram que a piora na função cardíaca estava relacionada com a redução na população de células Treg encontradas no grupo de pacientes chagásicos cardíacos quando comparados aos pacientes assintomáticos, sugerindo um papel protetor dessa células na manutenção da função cardíaca nesses pacientes. Além disso, indivíduos chagásicos cardíacos apresentaram níveis aumentados de TNF- α , IFN- γ , IL-6 quando comparados aos pacientes assintomáticos. Porém os níveis de IL-10 e TGF- β foram similares entre os grupos, no entanto o grupo de pacientes assintomáticos apresentou níveis elevados de IL-10 quando comparados a indivíduos não infectados.

Na infecção por *T. cruzi* experimental, camundongos infectados com foram tratados com uma citocina pleiotrópica que estimula a expressão de células Treg, a G-CSF (fator estimulante de colônia de granulócitos). Esses camudongos apresentaram

aumento na população de Treg no coração e mostraram redução no parasitismo, na inflamação e fibrose quando comparados aos camundongos que receberam apenas substância veículo. Além disso, foi verificada redução nos níveis de IFN- γ e TNF- α e níveis elevados de IL-10 e TGF- β nos corações de camundongos que receberam G-CSF quando comparados aos controles, mostrando mais uma vez o papel imunossupressor das células Treg na miocardite chagásica (Vasconcelos e cols., 2013).

Interessantemente, as células Treg expressam receptores $\alpha 7$ nicotínicos ($\alpha 7nAChR$). Wang e colaboradores (2010) mostraram que linfócitos Treg isolados de baço de camundongos C57BL/6J expressam $\alpha 7nAChR$ e que a nicotina aumenta a capacidade supressora das células Treg via $\alpha 7nAChR$. Esse grupo tratou células Treg com diferentes doses de nicotina por tempos variados e encontrou que a nicotina aumenta a expressão de FOXP-3 nessas células e que a α -bungarotoxina, um bloqueador de $\alpha 7nAChR$, inibiu esse aumento. Células Treg tratadas com nicotina foram co-cultivadas com linfócitos T CD4⁺CD25⁻ pré-incubados com anti-CD3/CD28. Após 24 horas a dosagem do sobrenante dessa cultura apresentou níveis reduzidos de IL-2 e aumento da razão IL-4/IFN- γ quando comparada a co-cultura de Treg estimuladas com PBS.

4.4. VIA ANTIINFLAMATÓRIA COLINÉRGICA

Na década de 1990, Linda Watkins mostrou que a febre em roedores devido a administração via intraabdominal de IL-1 β era dependente de uma via vagal intacta (Watkins e cols., 1995). Ainda nessa mesma década, Niiijima e colaboradores traçaram a via de potenciais de ação do nervo vago do fígado para o troncocerebral e mostraram que esses sinais ativavam neurotransmissão descendente para o baço, timo e outros órgãos (Niiijima e cols., 1991; Niiijima e cols., 1995; Niiijima, 1996). Em 2000, Borovikova e colaboradores estimularam eletricamente o nervo vago e observaram redução na produção de citocinas pró-inflamatórias em órgãos reticuloendoteliais

(Borovikova e cols., 2000). Com tais considerações Tracey propôs que as transmissões de sinais aferente e eferente do nervo vago eram constituintes do reflexo inflamatório, um circuito neural que modula a resposta imune inata (Tracey, 2002). Desde então, um grande número de trabalhos têm sido feitos para melhor entender como o reflexo inflamatório ou via antiinflamatória colinérgica participa da homeostase do sistema imune, modulando a resposta inflamatória local e sistêmica. Resultados desses trabalhos comprovaram a eficiência da estimulação elétrica do nervo vago na redução dos níveis de TNF- α (soro, coração, fígado, intestino e/ou baço), ou aumento dos mesmos em caso de vagotomia em vários modelos de inflamação, dentre eles, endotoxina (Borovikova e cols., 2000; Wang e cols., 2004, Pavlov e cols., 2006) sepse (Wang e cols., 2004; Huston e cols., 2006), choque hemorrágico (Guarini e cols., 2003; Luyer e cols., 2005), isquemia e reperfusão (Bernik e cols., 2002), inflamação subcutânea (Saeed e cols., 2005) e doenças inflamatórias do intestino (Ghia e cols., 2006). Interessantemente, a estimulação do nervo vago não altera os níveis sistêmicos de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 (Borovikova e cols., 2000).

Atualmente, sabe-se que o reflexo inflamatório ocorre mediante estímulo inflamatório, que pode ser ocasionado em resposta a uma infecção ou a um dano tissular, quando fibras aferentes do nervo vago são capazes de conduzir esses sinais inflamatórios periféricos para o núcleo do trato solitário e daí para o núcleo motor dorsal. O sistema nervoso autônomo reúne informações de respostas inflamatórias periféricas e responde em tempo real por meio de fibras eferentes do nervo vago, modulando a resposta inflamatória local (Pavlov e Tracey, 2004; Gallowitsch-Puerta e Pavlov, 2007). As fibras eferentes do nervo vago atingem o gânglio celíaco, onde estimulam o nervo esplênico que inerva o baço. O nervo esplênico é adrenérgico, liberando noradrenalina (NE) na polpa branca do baço, onde é encontrada uma grande massa de linfócitos T. Uma porcentagem dessas células são estimuladas pela NE através da ligação com receptores β 2-adrenérgicos, respondendo com a produção de ACh. Essa ACh sintetizada e liberada por linfócitos T vai atuar em receptores α 7 nicotínicos (α 7nAChR) em macrófagos, inibindo a produção de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, e também HMGB1, através da inibição de

NF- κ B (fator nuclear-kappa B) (Tracey, 2002; Pavlov e Tracey, 2004; Pavlov e cols., 2009) (Figura 3).

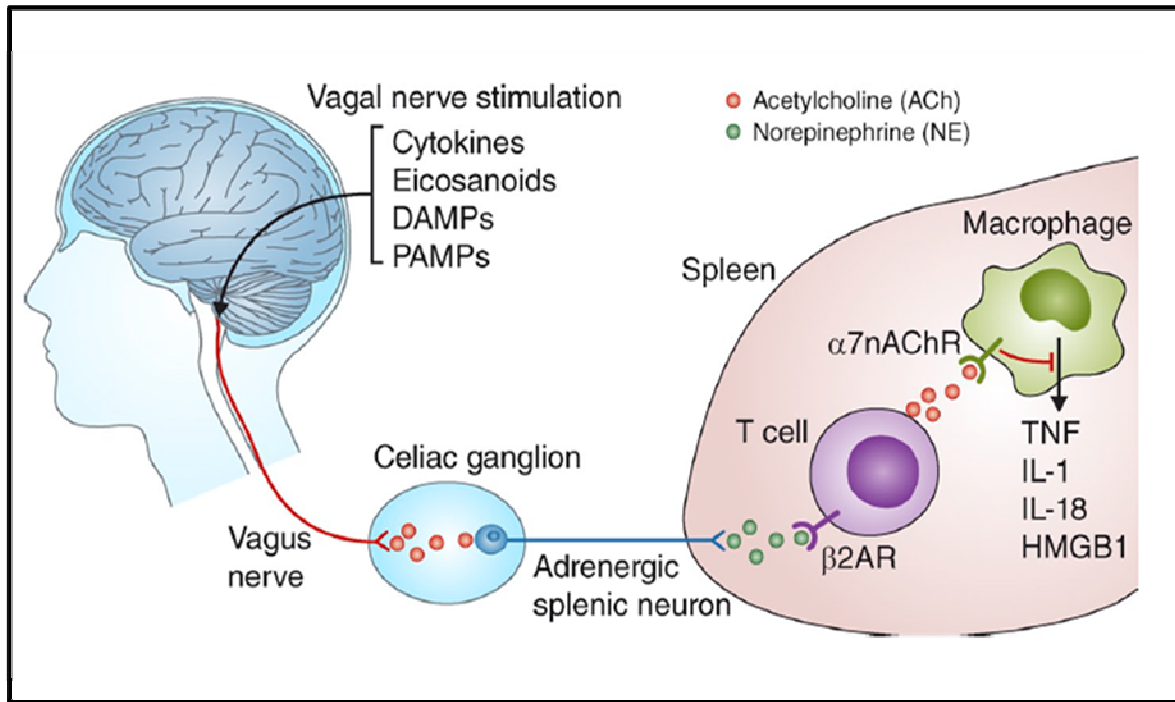


Figura 3: Representação esquemática da via antiinflamatória colinérgica ou reflexo inflamatório (Andersson & Tracey, 2012a).

Como mostrado na figura 4, tem sido descritas múltiplas vias de sinalização implicadas nas ações antiinflamatórias do receptor $\alpha 7$ nAChR. Em micróglia a via da MAPK p44/42 e p38 é requerida para o efeito antiinflamatório colinérgico. Já em macrófagos e monócitos, a tirosina cinase JaK2 interage diretamente com a nicotina ativada do $\alpha 7$ nAChR e então fosforila STAT3 (sinal transdutor e ativador da transcrição gênica). STAT3 fosforilado inibe NF- κ B no núcleo, ou ainda, no citosol inibe a fosforilação de I κ B (inibidor de NF- κ B), impedindo a translocação de NF- κ B para o núcleo (Cui e Li, 2010).

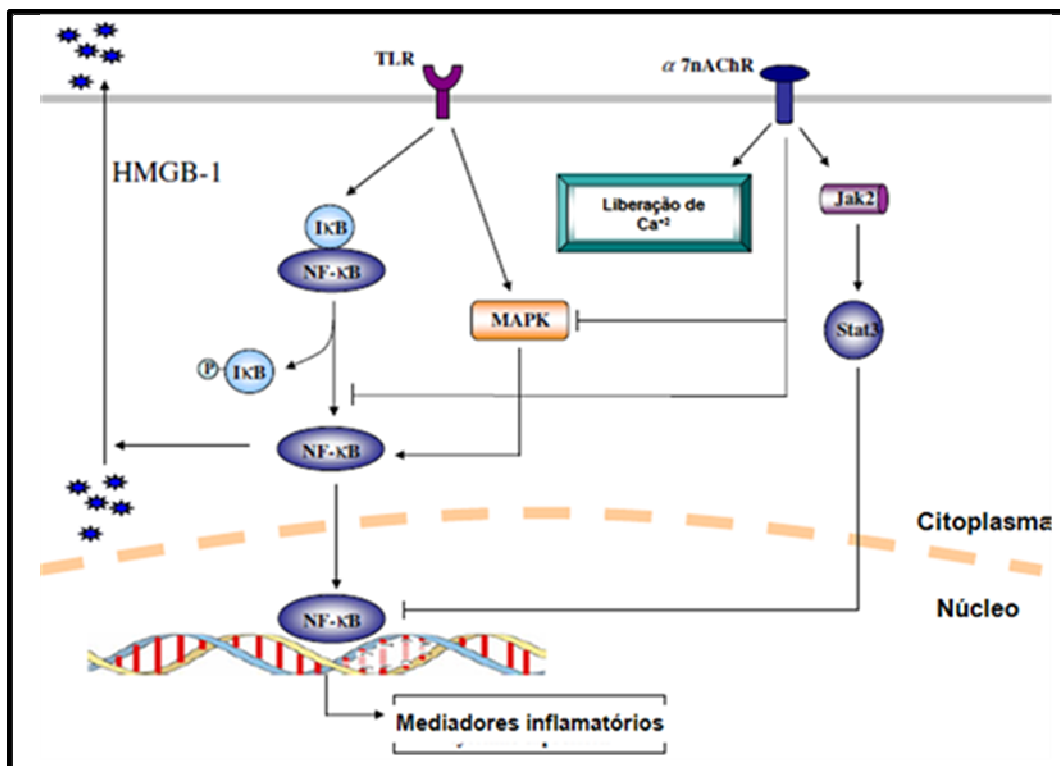


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias através do receptor $\alpha 7$ -nicotínico com ativação da via JAK2/STAT3, MAPK e I- κ B (modificado de Cui e Li, 2010).

Uma outra via de inibição de NF- κ B descrita em macrófagos de baço ocorre via interação física do $\alpha 7$ nAChR e adenilato ciclase 6, gerando aumento de AMPc, que por sua vez ativa fosforilação de CREB, aumentando a expressão de *c-fos*, que termina por inibir NF- κ B, reduzindo a transcrição de genes inflamatórios (Andersson e Tracey, 2012b) (Figura 5).

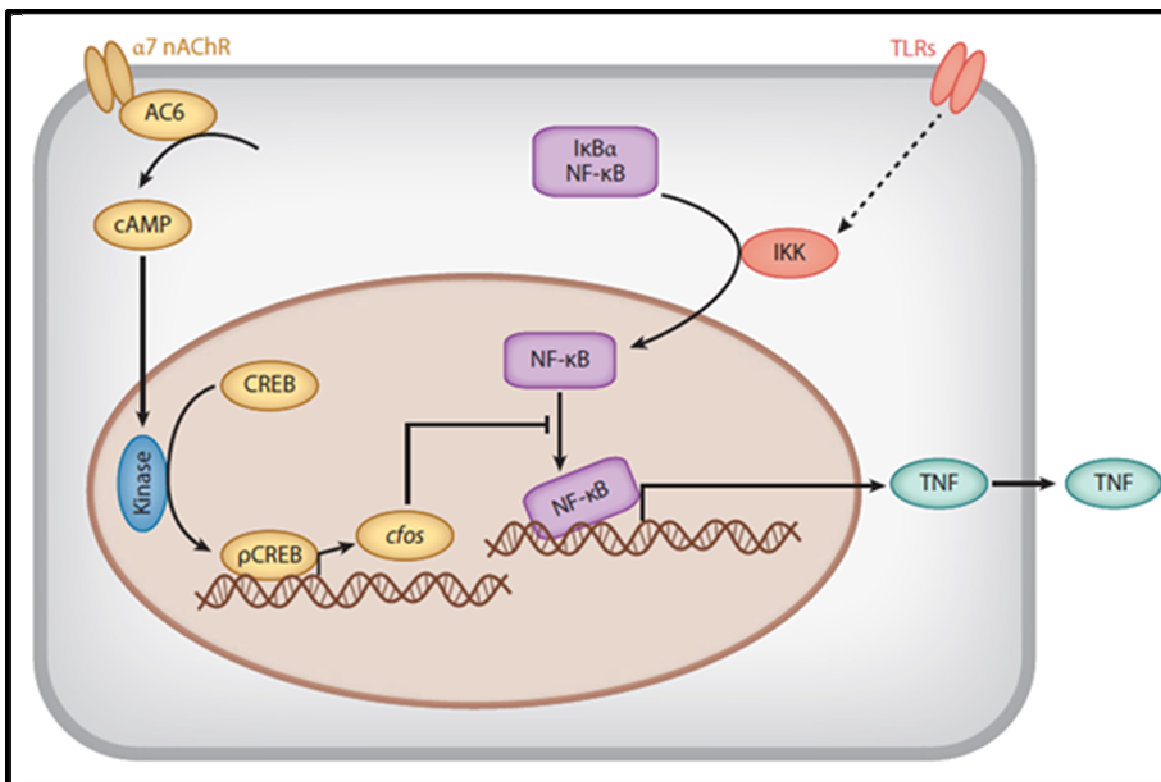


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias através do receptor $\alpha 7$ -nicotínico pela ativação da via CREB/*cfos* (Anderson e Tracey, 2012b).

Adicionalmente, sabe-se que outros tipos celulares, como células dendríticas (Aicher e cols., 2003; Nouri-Shirazi e Guinet, 2003), micróglia (Suzuki e cols., 2006; De Simone e cols., 2005), queratinócitos, além de células endoteliais, são capazes de sintetizar citocinas pró-inflamatórias e possuem receptores $\alpha 7$ nAChR. Essas células podem ser reguladas negativamente através de receptores $\alpha 7$ nAChR em resposta aos estímulos de ACh ou nicotina (Cui e Li, 2010; Rosas-Balinas e cols., 2009). Cardiomiócitos também são sintetizadores de citocinas (Machado e cols., 2000), além disso, nosso grupo e outros demonstraram que cardiomiócitos possuem maquinaria de síntese de ACh (Kakinuma e cols., 2009; Rana e cols., 2010; Rocha-Resende e cols., 2012) e vimos através de qPCR que cardiomiócitos expressam RNA para receptores $\alpha 7$ nACh (dados não publicados). Tendo, portanto, essa célula potencial para participar da via antiinflamatória colinérgica.

4.5. MODELO MURINO DE DISFUNÇÃO COLINÉRGICA – VACHT KD^{HOM}

O uso de antagonistas colinérgicos, muscarínicos e nicotínicos, foram de extrema importância para elucidar a contribuição da neurotransmissão colinérgica em diferentes funções fisiológicas, entretanto as limitações geradas pela falta de seletividade e reprodutibilidade de parâmetros farmacocinéticos trouxeram dados contraditórios (McGaughy e Sarter, 1998; Kitabatake e cols., 2003). Recentemente, com os avanços da biologia molecular, tornou-se possível explorar os danos causados pela redução da atividade colinérgica por meio de modelos animais geneticamente modificados. Um desses modelos é o camundongo VACHT KD^{HOM} que possibilitou o estudo das consequências geradas pela deleção parcial da expressão da proteína VACHT.

O desenvolvimento do camundongo VACHT KD^{HOM} se deu por meio da inserção de um cassete de 3.8 Kb, contendo o gene de resistência ao antibiótico neomicina e da enzima timidina cinase na região 5' não traduzida do gene VACHT. Camundongos VACHT mutantes foram gerados por recombinação homóloga do cruzamento 129S6/SvEvTac (129S6) x C57BL/6J, esse novo *background* foi cruzado com C57BL/6Uni (provenientes da Universidade de Campinas) por 3 gerações. Estes foram então cruzados com C57BL/6, resultando em uma linhagem infértil. Por último, camundongos heterozigotos foram cruzados dando origem ao VACHT KD^{HOM}. Este animal apresenta uma redução de 65% na expressão da proteína VACHT. Mostrou-se também, que o VACHT KD^{HOM} não apresenta alterações em outras proteínas envolvidas na síntese e liberação de ACh tão pouco na recaptação de colina. A redução na expressão do VACHT foi caracterizada por uma diminuição na liberação de ACh, com conseqüentes distúrbios neuromusculares acompanhados de alterações cognitivas (Prado e cols., 2006).

4.6. PIRIDOSTIGMINA

O brometo de piridostigmina (PIR) conduz aumento da função parassimpática por inibir periféricamente e reversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE), aumentando a disponibilidade de ACh (Androne e cols., 2003).

Uma variedade de estudos tem demonstrado o papel cardioprotetor da PIR. De La Flunte e colaboradores (2013) observaram que ratos infartados quando tratados com PIR (0.14mg/Kg/dia, na água de beber por 11 dias) apresentaram melhora da função cardíaca, redução na área infartada, restauração da pressão arterial, melhora na sensibilidade do barorreflexo e melhor balanço autonômico quando comparados aos ratos infartados.

Adicionalmente, ratos com 6 ou 7 semanas pós ligação da artéria coronária foram tratados com PIR na dose de 22mg/Kg/dia na água de beber. O tratamento foi eficiente em prevenir a falência cardíaca crônica ao passo que previniu a piora da sensibilidade do barorreflexo e a redução do tônus vagal cardíaco (Sabino e cols.,2012).

Estudos de Lara e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com PIR (1mg/Kg duas vezes ao dia, via intraperitoneal) restaura a função cardíaca, a sinalização de cálcio intracelular e a expressão de genes fetais em camundongos VACHT KD^{HOM}. Além disso, Gavioli e colaboradores (2013, dados submetidos) observaram que o tratamento com PIR previne disfunção cardíaca e a hipertrofia de cardiomiócitos em ratos tratados com isoproterenol.

Em humanos, a PIR é usada como um dos fármacos disponíveis para o tratamento da síndrome da taquicardia ortostática postural e miastenia *gravis* numa dosagem média de 60mg duas a quatro vezes ao dia (Kanjwal e cols., 2011; Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, 2010).

No presente trabalho, a piridostigmina foi usada para restaurar a disponibilidade de ACh, revertendo o fenótipo do camundongo VACHT KD^{HOM}, e assim podendo comprovar o papel da ACh na DC. Vale ressaltar, diante do exposto acima, que a

piridostigmina tem demonstrado ser capaz de restaurar a função cardíaca em modelos experimentais de cardiopatias distintas. Além disso, a piridostigmina é um fármaco utilizado para outros fins em seres humanos, o que é um fator importante para um alvo terapêutico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) e VChT KD^{HOM} a partir de 12 semanas de vida, após serem tratados com vermífugo (albendazol - Ouro Fino, Ribeirão Preto, SP, Brasil), diluído 1:200, via oral no primeiro e décimo dia. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h/12h, em ambiente com temperatura controlada a 25°C e com livre acesso a água e ração.

5.2. INFECÇÃO COM AS CEPAS DE *T. cruzi*

Os camundongos WT e VChT KD^{HOM} foram inoculados via intraperitoneal com 50 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* derivadas do sangue de camundongos Swiss previamente infectados.

Cultura de macrófagos foi incubada com a cepa Y de *T. cruzi* mantida *in vitro* em cultura de células LLCMK2 (células epiteliais de rim de macaco).

5.3. PARASITEMIA

A parasitemia foi determinada pela contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue retirado da veia caudal dos animais. Cem campos de uma lamínula de dimensões 22x22 mm foram contados e o número de parasitas encontrado foi multiplicado pelo fator de correção (fc) de cada microscópio (número total de campos da lamínula/número de campos analisados). A taxa de mortalidade foi monitorada durante 30 semanas após infecção.

5.4. CULTURA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos residentes ou inflamatórios de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram colhidos por lavagem da cavidade peritoneal três dias após a injeção com 2 mL de tioglicolato de sódio a 3%. As células foram lavadas e cultivadas (1×10^6 células/mL para replicação parasitária e dosagem de Griess ou 2×10^5 células/mL para contagem de parasitas intracelulares) em meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS), 2mM de L-glutamina e penicilina/estreptomicina (Gibco). As células aderentes foram obtidas após um período de duas a quatro horas de incubação em placas de cultura a 37°C em câmara úmida contendo 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas e, após incubação por 24 horas, as formas tripomastigotas foram adicionadas na proporção de 4:1 (parasitas/célula) e incubadas durante duas (replicação parasitária e dosagem de Griess) ou quatro horas (contagem de parasitas intracelulares - *uptake*). Após este período, os parasitas extracelulares foram removidos e as células foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂. Para o protocolo de replicação celular, após 72 horas teve início a contagem diária de formas tripomastigotas em 10µL de sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *T.cruzi*, do terceiro ao sétimo dia. Para a contagem dos parasitas intracelulares, após as quatro horas de exposição ao *T.cruzi*, culturas de macrófagos de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram lavadas, fixadas e coradas com kit de coloração hematológica (Panótico Rápido LB). Foram confeccionadas lâminas utilizando Entellan (Merck) e após secagem foram levadas ao microscópio para contagem de 300 células infectadas ou não (experimento feito em triplicata). Para dosagem de nitrito (NO₂⁻), os sobrenadantes

de cultura de macrófagos infectados com *T.cruzi* na presença de 100ng/mL de IFN- γ murino recombinante (Gibco) foram removidos após 48 horas de infecção e análises da concentração de NO₂⁻ foram realizadas combinando-se 0,1 mL do sobrenadante da cultura com 0,1 mL do reagente de Griess. As amostras foram lidas 10 minutos mais tarde em uma absorvância de 540 nm e as concentrações de NO₂⁻ foram determinadas a partir das concentrações da curva padrão de 1 a 500 μ M de NaNO₂.

5.5- DROGAS UTILIZADAS

Foi usado Brometo de Piridostigmina (PIR - Sigma) 30mg/Kg/dia na água de beber de camundongos VACHT KD^{HOM} durante 55 dias de infecção por *T.cruzi*. A água contendo PIR era trocada todos os dias. A concentração de PIR foi diluída em 5 mL de água, sendo este o volume médio ingerido pelos camundongos utilizados nesse experimento.

O vesamicol (Sigma) foi utilizado em cultura de macrófagos a 5 μ M por 30 minutos antes da incubação, durante e após a incubação com *T.cruzi*.

5.6. DOSAGENS DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 e TGF- β foram medidos no homogenato de tecido cardíaco de camundongos controles e infectados nos pontos de 20, 35, 40 e 55 dias pós infecção (dpi). Foram usados Kits de ELISA comercialmente disponíveis (R&D Systems). O ensaio foi feito de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Resumidamente, adicionou-se o anticorpo de captura específico, que foi incubado por 18h a 4°C. Após esse tempo a placa foi lavada e bloqueada por 2h. As amostras diluídas (3X) e os padrões de citocinas foram incubadas por mais 18h a 4°C. O

anticorpo de detecção foi adicionado em cada placa, e incubado por 2h. A placa foi novamente lavada e uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen) foi adicionada. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois foi adicionado o tampão de substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (450 nm) (Molecular Devices, USA).

5.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Amostras de ventrículos cardíacos de camundongos controles e infectados com 20, 35, 40, 55 e 210 dpi foram fixados por imersão, em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por 48h, desidratados e incluídos em paraplast (Sigma). Três secções (5µm de espessura) por amostra, a intervalos de 25µm foram obtidas e coradas com hematoxilina-eosina. Aproximadamente 30 imagens por animal, em aumento de 400X, foram captadas com o auxílio de microscópio óptico de campo claro (Zeiss, Germany) e com auxílio do programa AxioVision da Zeiss. Foi então determinada a proporção volumétrica de infiltrado inflamatório cardíaco, através do programa ImageJ. Os valores foram expressos como média das porcentagens de infiltrado inflamatório encontrado no coração de cada camundongo.

5.8. ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS E CITOMETRIA DE FLUXO

O timo e o baço foram retirados de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} controles e infectados com *T.cruzi*. Esses órgãos foram macerados e filtrados em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino. O lisado foi centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em solução de ACK para lise das hemácias. Após nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado em RPMI completo para contagem das células (com corante azul de Tripán e na câmara de

Neubauer). As células foram divididas em vários tubos de 1.5 mL na concentração de 2×10^6 células/mL. As células foram lavadas em PBS+1%BSA e posteriormente incubadas por 30 minutos com FC-block (CD16-CD32, 1:50) e então adicionados os anticorpos de superfície de interesse por mais 30 minutos. Os anticorpos foram: anti-CD4 (Pe-Cy7, 1:200), anti-CD25 (Percp-CY5.5, 1:100), anti-CD3 (PE, 1:200), anti-CD8 (Percp, 1:100). As células foram lavadas e centrifugadas por 3 vezes e então incubadas com solução permeabilizante (*Permeabilization Solution* – BD Biosciences) por 20 minutos. As células foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos intracelulares anti-FOXP-3 (PE, 1:100) e anti-IFN- γ (APC ou Alexa 647, 1:100). Para a marcação de IFN- γ primeiramente foi necessário incubar as células por quatro horas com Brefeldina A (1 μ g/mL) (Invitrogen), a fim de interromper a secreção celular. As células foram novamente lavadas após a incubação com os anticorpos intracelulares e fixadas em formaldeído 2%. Células viáveis foram analisadas por Citometria de Fluxo usando o citômetro FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e o *software* Flowjo através da delimitação de *gates* onde as populações celulares em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade e com os marcadores específicos de cada população. Para todas as marcações foram feitos vários controles: células sem terem sido incubadas com os anticorpos; uma marcação referente ao comprimento de onda de cada filtro utilizado; e por último, uma marcação com controles isotípicos, ou seja, anticorpo marcado com o mesmo corante, mas que não é específico aos sítios antigênicos da amostra em análise. Todos dos anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

5.9. ECOCARDIOGRAFIA

Exames ecocardiográficos foram realizados em animais anestesiados com isoflurano a 1,5% (Visual Sonics, Toronto, Canadá) com intuito de avaliar a função cardíaca. A morfologia do coração foi acessada usando a configuração modo-M. As medidas de fração de encurtamento foram realizadas pelo modo-B bidimensional de acordo com a metodologia de Simpson's. Todos os parâmetros foram avaliados

seguindo os protocolos da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang e cols., 2006).

5.10. EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total do coração de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} controles e infectados com *T. cruzi* foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). No homogenato formado foi adicionado clorofórmio, esse complexo foi incubado por 5 minutos a 37°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C e 16.100g. A fase superior foi coletada e o RNA precipitado com álcool isopropílico por 15 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada e o precipitado de RNA foi lavado com etanol 70% e posteriormente ressuspendido em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C. Contaminantes de DNA foram removidos com adição de DNase I (Promega) e a integridade do RNA total foi verificada através de um gel de agarose corado com 0.01% de SYBR safe.

5.11. TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR EM TEMPO REAL

Dois µg de RNA total foram utilizados como moldes para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores randômicos (*random primers*), 200 U de M-MLV RT (RevertAidTM H *Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 200 U µl Rnase Out (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1 X de tampão da M-MLV RT em um volume final de 20 µl.

Depois da transcrição reversa, o cDNA foi submetido ao Rotor-Gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer (Corbett Robotics Inc., San Francisco, USA) usando *Power SYBR Green Master Mix* (Biosystems, CA, USA). Para a reação foi usado um volume

final de 20µl, contendo 0.5 µM de iniciador (*primer*), 10µl of *Power SYBR Green Master Mix 2X* e 1µl de cDNA. As reações passaram por 45 ciclos com os seguintes parâmetros: 10 minutos - 25°C; 60 minutos - 42°C; 10 minutos - 70°C e refrigeração a 4°C. Para cada experimento foi usado uma reação sem cDNA como controle negativo. A quantificação da amplificação gênica foi realizada pela determinação do limiar de ciclos (*cycle threshold*, CT) baseado na fluorescência detectada dentro da região geométrica da curva semi-log do perfil de amplificação. As mudanças na expressão gênica do gene de interesse foram equivalentes a $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os dados foram normalizados pela expressão gênica de GAPDH.

Foram utilizados os *primers* listados na tabela abaixo para a avaliação da expressão de genes de interesse.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados em qPCR.

	FORWARD	REVERSE
iNOS	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
FOXP3	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	TCCTCACAACCAGGCCACTTG
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
18S <i>T.cruzi</i>	TTGTTTGGTTGATTCCGTCA	CCCAGAACATTGAGGAGCAT

5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média. As análises foram realizadas através do teste t de Student ou ANOVA one ou two-way seguido do pós-teste de Bonferroni. A significância foi estabelecida para um $p < 0.05$.

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram que a ACh tem papel determinante na resposta imune e na miocardite frente a infecção por *T. cruzi*, atuando na quantidade e fenótipo do infiltrado inflamatório. Além disso, o aumento da expressão de células Treg identificado em camundongos VACHT KD^{HOM} pode estar relacionado com a produção tardia de citocinas pró-inflamatórias e conseqüentemente com o menor remodelamento cardíaco presente nesse modelo. E por último, a ACh é capaz de modular a expressão de linfócitos T regulatórios, o que sugere um importante mecanismo de tolerância e de resolução da inflamação durante a infecção por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- Abrahamsohn IA, Coffman RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. Nov;84(2):231-44, 1996.
- Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation*, 107 (4):604-11, 2003.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Quaked N, Schaffartzik A, Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis C. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 2011.
- Almeida IC, Gazzinelli RT Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol*, v.70:467-477, 2001.
- Andersson U, Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J. Exp. Med.* 209, No. 6, 2012a.
- Andersson U, Tracey K. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 30:313-35, 2012b.
- Andrade V, Andrade SG, Barrai Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 18(3): 143-154, Jul-Set, 1985.
- Androne AS, Hryniewicz K, Goldsmith R, Arwady A, Katz SD. Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. *Heart* 89, 854–858, 2003.
- Araujo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Md Mde L, et al. Implication Of Transforming Growth Factor-beta1 In: Chagas Disease Myocardopathy. *J Infect Dis* 186: 1823–1828, 2002.
- Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of Trypanosoma cruzi infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19(5-6):405-13.2008.
- Bern C, Montgomery SP. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 49:000–000, 2009.

Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, Diraimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *Journal of Vascular Surgery*, v.36, p.1231-1236, 2002.

Bombeiro AL, Gonçalves LA, Penha- Gonçalves C, Marinho CRF, Lima MRD, Chadi G, Álvarez JM. IL-12p40 Deficiency Leads to Uncontrolled *Trypanosoma cruzi* Dissemination in the Spinal Cord Resulting in Neuronal Death and Motor Dysfunction. *Plos One* 7; 11, 2012.

Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Chica JEL. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 138, 145–156, 2012.

Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, v.405, p.458-462, 2000.

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

Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol* 1:1457–1467, 2001.

Büyükkakilli B, Atici A, Özkan A, Balli E, Güneş S, Turhan AH, Hallioglu O, Kanik A. The effect of tumor necrosis factor- α soon after hypoxia-ischemia on heart in neonatal rats. *Life Sci*. 90(21-22):838-45, 2012.

Camargo, M.M., Almeida, I.C., Pereira, M.E., Ferguson, M.A., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 158:5890-5901, 1997.

Cardillo, F., Voltarelli, J.C., Reed, S.G., Silva, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*. 64:128-134, 1996.

Chagas, C. Nova tripanossomíase humana. *Mem Ins Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 1:159-218, 1909.

Chandra M, Tanowitz HB, Petkova SB, Huang H, Weiss LM, et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol* 32: 897–905, 2002.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol*. 10, 826–837, 2010.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156-59, 1987.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115(1-2):5-13, 2010.

Cui W-Y, Li MD. Nicotinic modulation of innate immune pathways via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 5(4):479-88, 2010.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive FOXP3 regulatory T cells: more of the same ou a division of labor? *Immunity* 30:626–35, 2009.

D'Ávila DA, Guedes PMM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvão LMC. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.1, p.100-105, 2009.

de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PRZ, Gomes, JAS, Sathler-Avelar R, Rocha MOC, Eloi-Santos SM, Pinho, RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 992–999. 2011.

de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RCG, Ferreira KS, Nunes MCP, Keesen TS, Damasio MPS, Teixeira-Carvalho A, Gomes JAS. Foxp3+CD25high 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*. 217:768– 777, 2012.

de La Fuente RN, Rodrigues B, Moraes-Silva IC, Souza LE, Sirvente R, Mostarda C, De Angelis K, Soares PP, Lacchini S, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 40(9):610-6, 2013.

de Jonge, W.J., Van Der Zanden, E.P., The, F.O., Bijlsma, M.F., Van Westerloo, D.J., Bennink, R.J., Berthoud, H., Uematsu, S., Akira, S., Van Den Wijngaard, R.M., Boeckxstaens, G.E. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature Immunology*, v.6, p.844-851, 2005.

de Simone R, Ajmone-Cat M, Carnevale D, Minghetti L. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial culture. *Journal of Neuroinflammation*, 2(1):4, 2005.

de Waal M R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991.174:915-24, 1991.

Dias JCP, Neto VA. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. *História sobre a Doença de Chagas no Brasil*, v. 44, supl. II, 2011.

Dutra, WO, Rocha, MOC, Teixeira, MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*, v.21, p.581-587, 2005.

Esper, L., Romam-Campos, D., Lara, A., Brant, F., Castro, L.L., Barroso, A., Araujo, R.R.S., Vieira, L.Q., Mukherjee, S., Gomes, E.R.M., Rocha, N.N., Ramos, I.P.R., Lisanti, M.P., Campos, C.F., Arantes, R.M.E., Guatimosim, S., Weiss, L.M., Cruz, J.S., Tanowitz, H.B., Teixeira, M.M., Machado, F.S. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. *The American Journal of Pathology*, 2012.

Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 126: 283–291, 2010.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α in Asymptomatic/“Indeterminate” and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98(3): 407-411, 2003.

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 257:387-9, 1992.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 53: 31–47, 2002.

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 6; 110(1): 159–173, 2012.

Fredriksson K, Lundahl J, Palmberg L, Romberger DJ, Liu XD, Rennard SI, et al. Red blood cells stimulate human lung fibroblasts to secrete interleukin-8. *Inflammation*. 27:71-8, 2003.

Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sciences*, v.80, p.2325-2329, 2007.

Gavioli M, Lara A, Almeida PWM, Lima AM, Damasceno DD, Rocha-Resende C, Ladeira M, Resende RR, Martinelli PM, Melo MB, Brum PC, Fontes MAP, Santos RAS, Prado MAM, Guatimosim S. Two axes of cholinergic signaling exert protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *Submetido*, 2013.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* Oct;22(10):2501-6, 1992.

Geiger TL, Tauro S. Nature and nurture in Foxp3+ regulatory T cell development, stability, and function. *Human Immunology* 73, 232-239, 2012.

Ghia JE, Blennerhassett P, Kumar-Ondiveeran H, et al. The vagus nerve: a tonic inhibitory influence associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology.* v.131(4), p.1122-1130, 2006.

Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71:1185-93, 2003.

Grupta, S., Dhiman, M., Wen, J., Garg, N.J. ROS Signalling of Inflammatory Cytokines During *Trypanosoma cruzi* Infection. *Advances in Parasitology*, v.76, p.153-170, 2011.

Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F. Efferent Vagal Fibre Stimulation Blunts Nuclear Factor- κ B Activation and Protects Against Hypovolemic Hemorrhagic Shock. *Circulation*, v.107, p.1189-1194, 2003.

Guiñazú N, Carrera-Silva EA, Becerra MC, Pellegrini A, Albesa I, Gea S. Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. *International Journal for Parasitology.* 40:1531-1538, 2010.

Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, v.31, p.673-685, 2009.

Hecker A, Lips KS, Pfeil U, Kummer W, Padberg W, Grau V. Peripheral Choline Acetyltransferase is Expressed by Monocytes and Upregulated During Renal Allograft Rejection in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience.* 30, 23-30, 2006.

Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5490-4, 1985.

Hoare, CA, Wallace, FG. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212:1385-1386.

Ho"lscher C, Mohrs M, Dai WJ, Ko"hler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect. Immun.* 68: 4075-4083, 2000.

Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 29:429–35, 2008.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD41 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 260:547-9, 1993.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Gru'nig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. 1997. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 158: 3311–3316, 1997.

Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ, Ulloa L. Splenectomy inactivates the cholinergic anti-inflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* v.203, p.1623–1628, 2006.

Jalah R, Rosati M, Ganneru B, Pilkington GR, Kulkarni AV, Bergamaschi C, Chowdhury B, Zhang GM, Beach RK, Alicea C, Broderick KE, Sardesai NY, Pavlakis GN, Felber BK. The p40 subunit for interleukin (IL)-12 promotes stabilization and sport of the p 35 subunit. Implications For Improved IL-12 Cytokine Production. *J Biol Chem.* 1; 288(9): 6763–6776, 2013.

Jia Y, Zhou F, Deng P, Fan Q, Li C, Liu Y, Fu X, Zhou Y, Xu X, Sun X. Interleukin 6 protects H₂O₂-induced cardiomyocytes injury through upregulation of prohibitin via STAT3 phosphorylation. *Cell Biochem Funct.* 30: 426–431, 2012.

Kakinuma Y, Akiyana T, Sato T. Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS journal.* 276:5111-25, 2009.

Kanjwal KK, Sheikh M, Elmer L, Kanjwal Y, Saeed B, Grubb BP. Pyridostigmine in the Treatment of Postural Orthostatic Tachycardia: A Single-Center Experience. *PACE* vol34, 750-5, 2011.

Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci.* 30;80(24-25):2314-9, 2007.

Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S. Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100(13):7965-70, 2003.

Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med.*198:1179–88, 2003.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* 98:2854-65, 1996.

Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Demetris AJ, Feldman AM. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail.* 3(2):117-24, 1997.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W, Cell. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75:263-74, 1993.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geisert A, Lyght M, Flanderst KC, Robertst AB, Sporn MB, Wardt JM, Karlsson S. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, pp. 770-774, January 1993.

Kvakan H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz I, Rahn HP, Plehm R, Wellner M, Elitok S, Grätze P, Dechend R, Luft FC, Müller DM. Regulatory T Cells Ameliorate Angiotensin II-Induced Cardiac Damage. *Circulation.* 119:2904-2912, 2009.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* v.7, p.79-108, 2006.

Lara A, Damasceno DD, Pires R, Gros R, Gomes ER, Gavioli M, et al. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Mol Cell Biol.* 30:1746–56, 2010.

Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. *Medicina (B Aires).* 59 Suppl 2:57-62, 1999.

Leite, HR. *Participação do sistema colinérgico na inflamação e no comportamento doentio em animais deficientes para o transportador vesicular de acetilcolina (VAChT).* 2013.137f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Levick SP, Goldspink PH. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev.* 2013.

Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG, "TNF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*," *International Journal of Experimental Pathology*, 82, no. 6, p. 327–336, 2001.

Luyer, Greve JW, Hadfoune M, et al. Nutritional stimulation of cholecystikinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J Exp Med*. v.202(8), p.1023-1029, 2005.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JCS, Mestriner FLAC, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation*. 102: 3003-08, 2000.

Machado, F.S., Jelicks, L.A., Kirchhoff, L.V., Shirani, J., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., Nelson, R., Coyle, C.M., Spray, D.C., Carvalho, A.C.C. de, Guan, F., Prado, C.M., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Montgomery, S.P., Tanowitz, H.B. Chagas Heart Disease – Report on Recent Developments. *Cardiology in Review*, v. 20, p. 53-65, 2012.

Machado MPR, Rocha AM, Oliveira LF, Cuba MB, Loss IO, Castellano LR et al. Autonomic Nervous System Modulation Affects The Inflammatory Immune Response In Mice With Acute Chagas Disease. *Exp Physiol*. 97(11):1186-202, 2012.

Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simões, M.V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*, v.115, p.1109-1123, 2007.

Marinho CRF L, Nunñez-Apaza NR, Martins-Santos KRB, Bastos AL, Bombeiro DZ, Bucci LR, Sardinha MRD, Álvarez JML. IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scandinavian Journal of Immunology* 66, 297–308, 2007.

Massague J, Gomis RR. The logic of TGF β signaling. *FEBS Lett* 580: 2811-20, 2006.

Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics*, v. 64, p. 1219-1224, 2009.

Mayer MRLH. 1914. Zum verhalten von *Schizotripamum cruzi* in wamb lutern und arthropoden. *Ach Schiffs-u TROPEN-Hyg* 18:101

McGaughy J, Sarter M. Sustained attention performance in rats with intracortical infusions of 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation: effects of physostigmine and FG 7142. *Behavioral neuroscience*. 112(6):1519, 1998.

Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 140:19, 2010.

Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11817–22, 2005.

Meléendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension*. 56(2):225-31, 2010.

Michailowsky, V., Silva, N.M., Rocha, C.D., Vieira, L.Q., Lannes-Vieira, J., Gazzinelli, R.T. Pivotal Role of Interleukin-12 and Interferon- γ Axis in Controlling Tissue Parasitism and Inflammation in the Heart and Central Nervous System during *Trypanosoma cruzi* Infection. *The American Journal of Pathology*, v.159(5), p.1723-1733,2001.

Montalvão F, Almeida GM, Silva EM, Borges VM, Vasconcellos R, Takiya CM, Lopes MF, Nunes MP, Dos Reis GA. Apoptotic lymphocytes treated with IgG from *Trypanosoma cruzi* infection increase TNF-alpha secretion and reduce parasite replication in macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 40(9):610-6, 2013.

Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Mukherjee, S., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Garg, N.J., Tanowitz, H.B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Persistence in Chagas Disease. *Cellular Microbiology*, 2012.

Nagarkar DR, Poposki JA, Comeau MR, Biyasheva A, Avila PC, Schleimer RP, Kato A. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. *J Allergy Clin Immunol*. Jul;130(1):225-32.e4, 2012.

Naghshin J, Rodriguez RH, Davis EM, Romano LC, McGaffin KR, O'Donnell CP. Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure. *J Appl Physiol*. 113(5):791-8, 2012.

Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*. 98:794-9, 1998.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 23;78(6):915-8, 1994.

Nijijima, A., T. Hori, S. Aou, and Y. Oomura. 1991. The effects of interleukin-1 beta on the activity of adrenal, splenic and renal sympathetic nerves in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 36:183–192, 1991.

Nijijima, A., T. Hori, T. Katafuchi, and T. Ichijo. 1995. The effect of interleukin-1 beta on the efferent activity of the vagus nerve to the thymus. *J. Auton. Nerv. Syst.* 54:137–144, 1995.

Nijijima, A. The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 61:287–291, 1996.

Nouri-Shirazi M, Guinet E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology*, 109(3):365-73, 2003.

Oliveira FL, Araujo-Jorge TC, Souza EM, Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, Bailly S, Waghabi MC. Oral Administration of GW788388, an Inhibitor of Transforming Growth Factor Beta Signaling, Prevents Heart Fibrosis in Chagas Disease. *Plosntds*. Vol. 6, 2012.

Oliveira PAG. *Expressão de Factores Colinérgicos em Monócitos/Macrófagos na Inflamação*. 2009. 43f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular Humana) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2009.

Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol Today* 16:18–23, 2000.

Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, Mesquita J, Fortes GB, Figueiredo RT, Souza HSP, Fantappiè MR, Lannes-Vieira J, Bozza MT. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest*. 122(7):2531–2542, 2012.

Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 61, p. 2322–2331, 2004.

Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, Abed Y, Tracey KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.103, p. 5219–5223, 2006.

Pavlov, V.A., Parrish, W.R., Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Puetra, M., Ochani, K., Chavan, S., Al-Abed, Y., Tracey, K.J. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*. v.23, p.41–45, 2009.

Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP. Toll-like receptor 2 and interleukin 6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Med Microbiol Immunol*. 201(2):145-55, 2012.

Prado, V.F., Martins-Silva, C., Castro, B.M., Lima, R.F., Barros, D.M., Amaral, E., Ramsey, A.J., Sotnikova, T.D., Ramirez, M.R., Kim, H., Rossato, J.I., Koenen, J., Quan, H., Cota, V.R., Moraes, M.F.D., Gomez, M.V., Guatimosim, C., Wetsel, W.C., Kushmerick, C., Pereira, G.S., Gainetdinov, R.R., Izquierdo, I., Caron, M.G., Prado, M.A.M. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. *Neuron*, v.51, p.601-612, 2006.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infectious Disease*, v.1, p.92-100, 2001.

Protocolo Clínico e Diretrizes. Terapêuticas Miastenia Gravis .Portaria SAS/MS no229 de 10 de maio de 2010. (Retificada em 27.08.10).

Rana OR, Schauerte P, Kluttig R, Schroder JW, Koenen RR, Weber C, et al. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Autonomic Neuroscience: Basis and Clinical*. 2010.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 104:48–56. 1994.

Reis DD, Jones EM, Tostes Jr S. et al. "Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, no. 5, p.637–644, 1993.

Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, et al. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327: 145–154, 1990.

Rocha-Resende C, Roy A, Resende R, Ladeira M, Lara A, Gomes ERM, Prado VF, Gros R, Guatimosim C, Prado MAM, Guatimosim S. Non-neural cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 53:206-216, 2012.

Rodrigues DBR, Reis MA, Romano A, Pereira SAL, Teixeira VPA, Tostes Jr S, Rodrigues Jr V. In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.

Rodríguez-Anguloa H, Thomas LE, V E, Cárdenas E, Mogollón F, Mijares A. Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease. *Experimental Parasitology* 134:422–429, 2013.

Roffê E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino APM, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, Antonelli LRV, Murphy PM. IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of Trypanosoma cruzi Infection. *The Journal of Immunology*. 188:649-660, 2012.

Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Jr., Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS: Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol.* 104:238-246, 2009.

Romaña C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis schizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) *Mision de Estudios de Patologia Regional Argentina* (MEPRA), 22:16-25, 1935.

Rosas-Balinas M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *PNAS.* 105(31):11008-13, 2009.

Rossi MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, Celes MR, Campos EC, Blefari V, Prado CM. Coronary Microvascular Disease in Chronic Chagas Cardiomyopathy Including an Overview on History, Pathology, and Other Proposed Pathogenic Mechanisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p.12, 2010.

Sabino JPJ, Silva CAA, Melo RF, Fazan Jr R, Salgado, HC. The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 173, 58–64, 2013.

Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med.* v. 201(7), p.1113-1123, 2005.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 10:490–500, 2010.

Santiago HC, Feng CG, Bafica A, Roffe E, Arantes RM, Cheever A, Taylor G, Vierira LQ, Aliberti J, Gazzinelli RT, Sher A. Mice Deficient in LRG-47 Display Enhanced Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection Associated with Defective Hemopoiesis and Intracellular Control of Parasite Growth. *J Immunol* 175:8165-8172, 2005.

Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:107–24, 2007.

Shoda, L.K., Kegerreis, K.A., Suarez, C.E., Roditi, I., Corral, R.S., Bertot, G.M., Norimine, J., Brown, W.C. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun.* 69:2162-2171, 2001.

Silva, JS, Twardzik, DR, Reed, SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 174:539-545, 1991.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- activated macrophages. *Infect Immun* 63:4862-4867, 1995.

Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, et al. Microglial $\alpha 7$ acetylcholine receptors drive a phospholipaseC/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *Journal of Neurosciense Research.* 83(8):1461-70, 2006.

Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4109–4117, 1998.

Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, Teixeira MM. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infection and Immunity* 8:4247-4253, 2002.

Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 107:232, 2012.

Tonelli RR, Torrecilhas AC, Jacysyn JF, Juliano MA, Colli W, Alves MJ. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology.* 138(4):481-92, 2011.

Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *RevMed Chile*, v.139, p.258-266, 2011.

Tracey, K.J. The inflammatory reflex. *Nature.* v. 420, p. 853–859, 2002.

Vasconcelos JF, Souza BSF, Lins TFS, Garcia LMS, Kaneto CM, Sampaio GP, Alcântara AC, Meira CS, Macambira SG, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *The FASEB Journal article*, 2013.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 8(7): 523–532, 2008.

Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351, 1997.

Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. 92:2012-303, 1993.

Yokoyama T, Nakano M, Bendnarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor necrosis factor- α provokes a hyperrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation*. 95:1247-52, 1997.

Yu L, She T, Li M, Shi C, Han L, Cheng M. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and tumor necrosis factor- α secretion through an NF- κ B-dependent mechanism. *Int J Mol Med*. 32(3):717-22. 2013.

Wang H, Liao H, Ochani M, *et al.* Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. v.10(11), p.1216-1221, 2004.

Wang DW, Zhou RB, Yao YM, Zhu XM, Yin YM, Zhao GJ, Dong N, Sheng ZY. Stimulation of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Increases Suppressive Capacity of Naturally Occurring CD4+CD25+Regulatory T Cells in Mice In Vitro. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 335, No. 3, 2010.

Watkins, L.R., L.E. Goehler, J.K. Relton, N. Tartaglia, L. Silbert, D. Martin, and S.F. Maier. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci. Lett*. 183:27–31, 1995.

World Health Organization (WHO), 2010. Chagas Disease: Control and Elimination. UNDP/World Bank/WHO.

Wu WY, Wang WY, Ma YL, Yan H, Wang XB, Qin YL, Su M, Chen T, Wang YP. Sodium tanshinone IIA silate inhibits oxygen-glucose deprivation/recovery-induced cardiomyocyte apoptosis via suppression of the NF- κ B/TNF- α pathway. *Br J Pharmacol*. 169(5):1058-71, 2013.

Zheng SG, Meng L, Wang JH, Watanabe M, Barr ML, Cramer DV, *et al.* Transfer of regulatory T cells generated *ex vivo* modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4+CD25+ cells in the recipient. *Int Immunol* 18:279–89, 2006.