

Janete Soares Coelho dos Santos

**Papel dos receptores B₁ e B₂ de bradicinina e de
captopril nas interações célula hospedeira-
Trypanosoma cruzi e na resposta imune frente a
estimulação pelo parasita**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

Co-orientador: Dr. Kenneth John Gollob, Santa Casa de Misericórdia, BH e SRI International, Menlo Park, CA, USA

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2010

Esta Tese foi desenvolvida nos Laboratórios de Biologia das Interações Celulares e de Biologia dos Linfócitos sob a orientação dos professores Walderez Ornelas Dutra e Kenneth John Gollob.

O trabalho conta, ainda, com a colaboração de:

Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, Centro de Tratamento de Doenças Infecto-Parasitárias da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG.

Dr. Júlio Scharfstein, Departamento de Biofísica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

Dra. Cristiane Alves e Silva Menezes

Agências financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Organização Mundial de Saúde - OMS

Agradeço a Deus por tudo,
pelas maravilhas e superações.

Agradeço à minha família:
aos meus pais João e Terezinha,
por tudo que fizeram e fazem por mim,
ao meu marido Christiano
pelo amor e compreensão,
e aos meus irmãos Jucélia e Rogério,
pelo carinho.

Agradeço à minha orientadora,
Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra,
por me ensinar a arte da pesquisa.

Agradeço ao meu co-orientador,
Prof. Dr. Kenneth John Gollob,
por todo ensinamento.

Agradeço à Cristiane, Fernanda
e Luísa pela
amizade e pela colaboração.

Agradeço aos amigos e
companheiros de laboratório
pela disponibilidade em contribuir
com este trabalho.

Por fim um agradecimento muito especial
às minhas maravilhosas gêmeas
Júlia e Giovanna que tornaram minha
vida infinitamente mais feliz.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 6 |
| LISTA DE TABELAS..... | 8 |
| LISTA DE ESQUEMAS..... | 8 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| RESUMO..... | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS:..... | 14 |
| 1.2. MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR PELO TRYPANOSOMA CRUZI: IMPORTÂNCIA DA VIA DAS CININAS..... | 18 |
| 1.3. A RESPOSTA IMUNE CELULAR NA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA..... | 23 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 28 |
| 3. OBJETIVO GERAL..... | 30 |
| 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1. PACIENTES..... | 32 |
| 4.2. LINHAGENS CELULARES PARA CULTURA DE T. CRUZI..... | 33 |
| 4.3. OBTENÇÃO DOS PARASITOS..... | 33 |
| 4.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO..... | 34 |
| 4.5. INFECÇÃO DAS CÉLULAS PARA ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE CININA E DE CAPTOPRIL NA INVASÃO DOS MONÓCITOS POR TRIPOMASTIGOTAS DE T. CRUZI E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE E CITOCINAS..... | 35 |
| 4.7. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISE DO PAPEL DE CAPTOPRIL NA ATIVAÇÃO E FUNÇÃO IMUNOREGULATÓRIA DOS LINFÓCITOS T..... | 39 |
| 4.8. ANÁLISES CITOMÉTRICAS..... | 40 |
| 4.9. COLORAÇÃO COM GIEMSA..... | 42 |
| 4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 42 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |
| 5.1 O TRATAMENTO DE MONÓCITOS HUMANOS CD14 ⁺ COM ANTAGONISTAS DO RECEPTOR B ₁ E B ₂ DE CININAS OU COM O FÁRMACO CAPTOPRIL ALTERA A EXPRESSÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (CD143) EM INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA..... | 43 |
| 5.2 O TRATAMENTO DE MONÓCITOS HUMANOS COM ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES B ₁ E B ₂ DE CININAS REDUZ O NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS PELO PARASITO TRYPANOSOMA CRUZI DA CEPA Y..... | 46 |

| | |
|--|------------|
| 5.3 O TRATAMENTO DE MONÓCITOS HUMANOS CD14 ⁺ COM ANTAGONISTAS DO RECEPTOR B ₁ E B ₂ DE CININAS OU COM O FÁRMACO CAPTOPRIL NÃO ALTERA A EXPRESSÃO DA ENZIMA iNOS EM INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA. | 50 |
| 5.4 O TRATAMENTO DE MONÓCITOS HUMANOS CD14 ⁺ COM ANTAGONISTAS DO RECEPTOR B ₁ E B ₂ DE CININAS OU COM O FÁRMACO CAPTOPRIL INDUZ ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS IMPORTANTES PARA A ATIVAÇÃO E FUNÇÃO EFETORA DESTAS CÉLULAS EM INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA E EM INDIVÍDUOS NÃO CHAGÁSICOS. | 53 |
| 5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS IMPORTANTES PARA A ATIVAÇÃO E PARA A FUNÇÃO EFETORA DE MONÓCITOS ENTRE INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA E ENTRE INDIVÍDUOS NÃO CHAGÁSICOS. | 61 |
| 5.6 O TRATAMENTO DE LINFÓCITOS HUMANOS CD4 ⁺ E CD8 ⁺ COM O FÁRMACO CAPTOPRIL ALTERA A EXPRESSÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (CD143) | 75 |
| 5.7 O TRATAMENTO DE LINFÓCITOS HUMANOS CD4 ⁺ E CD8 ⁺ COM O FÁRMACO CAPTOPRIL ALTERA A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DE ATIVAÇÃO HLA-DR..... | 76 |
| 5.8 ANÁLISE DO PAPEL DE CAPTOPRIL E DO RECEPTOR B ₂ DE BRADICININA NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS HUMANOS CD4 ⁺ E CD8 ⁺ | 78 |
| TAMBÉM FOI AVALIADA A EXPRESSÃO DAS CITOCINAS TNF-A E IL-10 PELOS SUBTIPOS DE LINFÓCITO T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ , NO ENTANTO, A EXPRESSÃO DESTAS CITOCINAS NÃO FOI ALTERADA PELOS TRATAMENTOS NEM PELA PRESENÇA DO PARASITO (DADO NÃO MOSTRADO)..... | 80 |
| 6. DISCUSSÃO | 81 |
| 7. RESUMO DOS RESULTADOS..... | 103 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 105 |

Lista de Abreviaturas

Ang II- Angiotensina II

APC- Célula apresentadora de antígeno

B₁R- Receptor do tipo 1 de bradicinina

B₂R- Receptor do tipo 2 de bradicinina

B9430- Antagonista de B₁R e B₂R

B9958- Antagonista de B₁R

BK- Bradicininina

CAP - Captopril

CD- *Cluster of differentiation* (grupos de diferenciação)

CD- Cardiopata dilatado

CHO- Ovário de Hamster Chinês

CMSP- Células mononucleares do sangue periférico

CND- Cardiopata não dilatado

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

CTLA-4- Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico

Cy- Cy-chrome

DMSO- Dimetilsulfóxido

ECA (ACE)- Enzima conversora de angiotensina

FCI- Forma clínica indeterminada

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

GPI- Glicosilfosfatidilinositol

HLA- Antígeno leucocitário humano

HOE-140- Hoechst Icatibant (antagonista de B₂R)

HUVECs- Células endoteliais de veia umbilical humana

IFN γ - Interferon gama

IgG- Imunoglobulina G

IL- Interleucina

iNOS- Óxido nítrico sintase indutível

LPS- Lipopolissacarídeo

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

NC- Não chagásico

NK- Natural Killer

NO- Óxido nítrico

PE- Ficoeritrina

SBF- Soro Bovino Fetal

TCR- Receptor de célula T

TGF β - Fator de crescimento transformante-beta

Th- Linfócito T helper

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TS- Trans-sialidase

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14 ⁺ de indivíduos não chagásicos..... | 52 |
| TABELA 2: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14 ⁺ de pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada..... | 53 |
| TABELA 3: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14 ⁺ de pacientes chagásicos com a forma clínica cardíaca não dilatada..... | 55 |
| TABELA 4: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14 ⁺ de pacientes chagásicos com a forma clínica cardíaca dilatada..... | 56 |

Lista de Esquemas

| | |
|---|-----|
| ESQUEMA 1: Esquema da placa mostrando o protocolo de incubação com os diferentes tratamentos..... | 33 |
| ESQUEMA 2: Perfil puntual representativo de CMSP..... | 38 |
| ESQUEMA 3: Representação esquemática dos resultados..... | 101 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1: Expressão da molécula ECA por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 42 |
| FIGURA 2: Expressão da molécula ECA por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> entre os diferentes grupos de pacientes chagásicos..... | 43 |
| FIGURA 3: Análise da infecção de monócitos de indivíduos não chagásicos por <i>T.cruzi</i> | 44 |
| FIGURA 4: Análise da infecção de monócitos de pacientes chagásicos por <i>T.cruzi</i> | 45 |
| FIGURA 5: Análise da infecção de monócitos por <i>T.cruzi</i> nos diferentes grupos..... | 46 |
| FIGURA 6: Expressão da molécula iNOS por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 48 |
| FIGURA 7: Expressão da molécula iNOS por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> entre os diferentes grupos de pacientes chagásicos..... | 49 |
| FIGURA 8: Expressão e intensidade de expressão da molécula de ativação HLA-DR por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 60 |
| FIGURA 9: Expressão e intensidade de expressão da molécula da molécula coestimulatória CD80 por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 62 |
| FIGURA 10: Expressão e intensidade de expressão da molécula da molécula coestimulatória CD86 por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 63 |
| FIGURA 11: Frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de citocinas IL-12 infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 65 |
| FIGURA 12: Frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de citocinas IL-10 infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 67 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 13: Frequência de monócitos CD14 ⁺ produtores de citocinas TNF- α infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 68 |
| FIGURA 14: Expressão da citocina IL-12 por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 69 |
| FIGURA 15: Expressão da citocina IL-10 por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 70 |
| FIGURA 16: Expressão da citocina TNF- α por monócitos CD14 ⁺ infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 71 |
| FIGURA 17: Expressão da molécula ECA por linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na presença ou ausência do parasito <i>T.cruzi</i> | 73 |
| FIGURA 18: Expressão da molécula de ativação HLA-DR por linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na presença ou ausência do parasito <i>T.cruzi</i> | 74 |
| FIGURA 19: Expressão das citocinas IFN- γ por linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na presença ou ausência do parasito <i>T.cruzi</i> | 76 |
| FIGURA 20: Expressão da citocina IL-17 por linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na presença ou ausência do parasito <i>T.cruzi</i> | 77 |

Abstract

The infection of monocytes by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes is a crucial step for the development of Chagas disease immune response. Infection by *T. cruzi* has demonstrated to be an active process, involving diverse cellular components and different cell types. Previous studies of the interaction tissue-culture derived trypomastigotes (TCT) between cardiomyocytes or endothelial cells appointed the bradykinin receptors (B₂ or B₁ subtype) as transducers of Ca²⁺-dependent responses leading to cellular invasion. Generation of the kinin agonist, presumably occurring in host-parasite synapses, is thought to depend on cruzipain-mediated processing of cell-bound kininogens. Once released, kinins either bind to their cognate G-protein coupled receptors, or are swiftly degraded by metallopeptidases, such as the angiotensin-converting enzyme (ACE). Studies show that these receptors are also involved in activation and modulation of immune cells through the production or inhibition of cytokines. Here we checked if addition of ACE inhibitor (captopril) and/or antagonists of the kinin receptors could influence the outcome of TCT (Y strain) interaction with human monocytes. We also evaluated whether these antagonists and captopril may influence the expression of important molecules to activation and effector function of monocytes CD14⁺ and CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. These parameters were analyzed in cells from non-chagasic individuals, as well as cells from patients with indeterminate or cardiac clinical forms of Chagas disease. Our results showed that treatment with either B₂ or B₁ antagonists reduces the frequency of monocytes infected with *T. cruzi*. Interestingly, while captopril does not alter the percentage of infected cells, it increases the extent of parasite infectivity on a cell-per cell basis, while inducing a decrease in IL-10 expression. These data point to the need of better studying the effects of captopril in the immune response of Chagas patients, considering that this drug is often prescribed to hypertensive chagasic patients. Furthermore, changes were seen in the

expression of molecules by monocytes pre-treated with captopril and specific B₂ or B₁ antagonist and infected by *T. cruzi*. However, the modulation of these molecules did not follow the same pattern in different groups. Ours results showed that the pathway of kinins and captopril can act in the process of activation of CD4⁺ T cells, leading to the expression of IL-17 by these cells. In conclusion, this work shows that parasite uptake by monocytes is partially dependent on kinin receptor signaling. Moreover, captopril and kinin receptor signaling may be important in the immune response against the stimulation with the parasite *T. cruzi*.

Resumo

A infecção dos monócitos por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* é uma etapa crucial para o desenvolvimento da resposta imune na doença de Chagas. A infecção pelo parasito é um processo ativo, envolvendo diversos componentes celulares. Estudos da interação de tripomastigotas derivado de cultura com cardiomiócitos e células endoteliais apontaram os receptores de bradicinina como transdutores de respostas dependentes de Ca^{2+} que levam a invasão celular. Acredita-se que a geração de cininas, presumivelmente ocorrendo na sinapse hospedeiro-parasito, é dependente do processamento de cininogênio ligado à célula mediado pela cruzipaina. Uma vez liberadas, as cininas ligam-se a seus receptores acoplados à proteína G ou são degradados por metaloproteinases como a enzima conversora de angiotensina (ECA). Estudos mostram que estes receptores também estão envolvidos na ativação e modulação das células do sistema imunológico através da produção ou inibição de citocinas. Neste trabalho, avaliamos se a adição de inibidor de ECA (captopril) e/ou antagonistas específicos para os receptores B_1 e B_2 pode influenciar a interação de tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y com monócitos humanos. Avaliamos também se estes antagonistas e captopril podem influenciar a expressão de moléculas importantes para a ativação e função efetora de monócitos CD14^+ e linfócitos T CD4^+ e CD8^+ . Estes parâmetros foram analisados em células de indivíduos não chagásicos e em células de pacientes chagásicos com forma clínica indeterminada ou cardíaca. Nossos resultados mostram que o tratamento com os antagonistas dos receptores de bradicinina reduziu a frequência de monócitos infectados pelo *T. cruzi*. Interessantemente, enquanto captopril não altera a porcentagem de células infectadas, ele aumenta a intensidade de infecção das células e induz a redução da expressão de IL-10. Além disso, foram observadas alterações na expressão de

moléculas coestimulatórias e de ativação por monócitos pré-tratados com captopril e antagonistas específicos para os receptores B₂ ou B₁ de bradicinina e infectados pelo *T. cruzi*. Entretanto, a modulação destas moléculas não seguiu o mesmo padrão nos diferentes grupos. Nossos resultados mostraram que a via das cininas e o captopril podem agir no processo de ativação de células T CD4⁺, levando a expressão de IL-17 por estas células. Em conclusão, este trabalho mostra que a infecção de monócitos pelo parasito é parcialmente dependente da sinalização pelos receptores de cininas, e que esta via e o captopril podem ser importantes na resposta imune frente infecção com o parasito *T. cruzi*. Em conjunto, nossos dados apontam para a necessidade de mais estudos acerca dos efeitos de captopril na resposta imune de pacientes chagásicos, considerando que este fármaco é frequentemente prescrito para pacientes chagásicos com hipertensão.

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre a doença de Chagas:

A doença de Chagas, descrita há mais de cem anos por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, afeta, nos dias atuais, cerca de 15 milhões de pessoas em toda a América Latina. Estima-se que 100 milhões de pessoas estão expostas à infecção (DNDi, 2010). A distribuição geográfica da infecção que leva a doença de Chagas, incluindo seus reservatórios e vetores, estende-se desde o Sul dos Estados Unidos ao Sul da Argentina e Chile (Coura e Dias, 2009). A doença de Chagas crônica causa deficiências significativas e tem alto impacto social e econômico, incluindo desemprego e diminuição da capacidade produtiva. Somente no Brasil, mais de US\$ 1,3 bilhões em salários e produtividade industrial foram perdidos devido à doença de Chagas (DNDi, 2010).

A doença é causada pela transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* para o hospedeiro vertebrado através das fezes e/ou urina do inseto infectado conhecido vulgarmente como “barbeiro”. O vetor da doença de Chagas pertence à família *Reduviidae* e à subfamília *Triatominae*, sendo os gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* os que compreendem as principais espécies vetoras do *T. cruzi* (Buscaglia e Di Noia, 2003). Os triatomíneos são hematófagos e o protozoário, presente no seu intestino, penetra na pele do hospedeiro quando em contato com uma solução de continuidade, principalmente pela lesão causada pelo vetor durante o repasto sanguíneo. A doença de Chagas também pode ser transmitida por outros meios, como transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais, via oral (uma variação da transmissão vetorial) e de forma congênita (Moncayo, 2003; Zeledón *et al.*, 1977; Schaub *et al.*, 1988; Steindel *et al.*, 2008).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo com múltiplos estágios. O estágio epimastigota é a forma replicativa presente no intestino do hospedeiro invertebrado. No inseto, a forma epimastigota diferencia-se na forma tripomastigota metacíclica, que pode ser transmitida ao hospedeiro vertebrado. Portanto, a infecção é normalmente iniciada por esta forma extracelular e não replicativa. Após infectar as células do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas intracelulares que são as formas replicativas nos mamíferos e, após múltiplos ciclos de replicação, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, os quais rompem a célula e circulam como parasitos extracelulares, prontos para infectarem novas células, perpetuando o ciclo infeccioso (revisto por Schnapp *et al.*, 2002). Os tripomastigotas infectam diversos tipos de células do hospedeiro, sendo que o tropismo diferencial parece estar relacionado com a cepa do parasito. (Andrade *et al.*, 1999a).

A doença de Chagas apresenta duas fases sucessivas, a aguda e a crônica. Após a infecção pelo *T. cruzi*, o indivíduo desenvolve a fase aguda que dura, em média, de seis a oito semanas. Ao fim deste período, inicia-se a fase crônica, na qual os pacientes podem desenvolver quadros clínicos variados, desde brandos a muito graves (Rassi e Luquetti, 1992).

A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia no sangue e outros tecidos e, clinicamente, caracteriza-se por ocorrência de febre, fraqueza, aumento do fígado e baço, mal estar geral e algum tipo de “chagoma” de inoculação. Durante esta fase, os amastigotas proliferam-se em vários tecidos e células. A proliferação do *T. cruzi* dentro dos cardiomiócitos, causando sua ruptura e liberação de mediadores inflamatórios de vários tipos, é responsável por miocardite aguda intensa e difusa, que pode ocorrer na fase aguda (Andrade, 1999b).

Após esta fase, segue-se a fase crônica, na qual os parasitos tornam-se raros no sangue e outros tecidos. A infecção só pode ser identificada por testes sorológicos ou parasitológicos específicos. Nesta fase, a maioria dos pacientes infectados apresenta um estado aparentemente saudável, sem prejuízo aparente dos órgãos, sem alterações eletrocardiográficas nem anormalidades de raios-X do trato digestivo. Esta forma clínica da doença de Chagas é denominada indeterminada (Andrade, 1999b; Rocha *et al.*, 2003). Além da forma indeterminada, encontrada em cerca de 60% a 70% dos pacientes infectados, a fase crônica apresenta pelo menos mais três formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Aproximadamente 20% a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem distúrbios de condução e contractilidade do coração, levando ao surgimento de arritmias e insuficiência cardíaca que, freqüentemente, são fatais (Rocha *et al.*, 2003). A forma digestiva da doença é caracterizada pela denervação da musculatura lisa que reveste a parede do tubo digestivo, levando a dificuldades na deglutição e defecação, além de processos de dilatação de estruturas esofagianas e intestinais (Koberle, 1958; Macedo, 1982). A forma clínica cardiodigestiva é menos comum e está associada com alterações tanto no sistema cardiovascular como no sistema digestivo. Variações geográficas na prevalência de formas clínicas e morbidade da doença de Chagas têm sido relatadas. Patologias digestivas associadas ao *T. cruzi* predominam no Chile e na região central do Brasil não sendo, no entanto, comuns na Venezuela e América Central (OMS, 2002). Por outro lado, a infecção por *T. cruzi* na Amazônia tende a ser mais branda do que em áreas endêmicas e frequentemente leva ao desenvolvimento da forma clínica indeterminada (Zingales *et al.*, 1998 e Coura *et al.*, 2002). Estas diferenças geográficas podem ser relatadas, em parte, considerando aspectos genéticos e imunes da população humana local, mas acredita-se que elas sejam causadas principalmente pela diversidade genética do parasito (Tibayrenc e Ayala, 1999). Outro ponto a ser considerado é a via de

inoculação do parasito. Cortez *et al.*, 2006, mostraram que a infecção por via oral leva à degradação da molécula gp90 pelas pepsinas do hospedeiro. Gp90 é uma glicoproteína expressa pelo *T. cruzi* que regula negativamente a infecção da célula hospedeira, desta forma, a infecção por via oral torna as cepas, com baixa capacidade de infecção, altamente infectivas.

Acredita-se que a fase indeterminada da doença de Chagas represente um estado de equilíbrio entre hospedeiro e parasito (Andrade, 1999b). No entanto, de 2% a 5% dos pacientes apresentando a forma indeterminada da doença de Chagas evoluem para a forma clínica mais grave (Umezawa *et al.*, 2000). Os mecanismos que determinam a evolução clínica diferencial da infecção humana pelo *T. cruzi* ainda não foram totalmente esclarecidos. Enquanto alguns estudos apontam para a participação de diferentes cepas de parasito no estabelecimento de formas clínicas distintas (Vago *et al.*, 2000), acredita-se que características do próprio hospedeiro possam influenciar decisivamente o processo.

Independentemente da forma clínica, existem fortes evidências da participação do sistema imune na patogênese da doença de Chagas (revisto por Dutra *et al.*, 2005 e Dutra e Gollob, 2008). A presença do parasito parece ser fundamental para o desencadeamento do processo de surgimento das lesões e estudos correlacionam a presença do parasito, ou pelo menos de seus antígenos ou DNA, com os focos inflamatórios teciduais (Jones *et al.* 1993; Mortara *et al.*, 1999; Vago *et al.*, 2000). No entanto, a discrepância entre a baixa parasitemia e a gravidade das lesões observadas durante a fase crônica estimularam estudos que buscassem determinar a participação de mecanismos de autoimunidade na doença de Chagas. Em favor dessa hipótese, vários estudos foram realizados e demonstram que componentes auto-reativos podem, de fato, ser encontrados em pacientes chagásicos. Entre esses componentes encontram-se anticorpos autoreativos (Cossio *et al.*, 1985; Levitus *et al.*, 1991), assim como células T potencialmente autoreativas (Cunha-Neto *et al.*, 1996, Dutra *et al.*, 1994). É

consenso na literatura que as respostas antiparasito ou autoreativas não são, no entanto, excludentes na geração da patologia chagásica e que podem atuar conjuntamente.

1.2. Mecanismos de invasão celular pelo Trypanosoma cruzi: importância da via das cininas

Durante o processo de infecção, o *T. cruzi* primeiro adere à superfície da célula alvo sendo, subsequentemente, internalizado. Uma ampla variedade de receptores celulares, segundos mensageiros e fatores de transcrição de diferentes vias são explorados pelo parasito para mediar a invasão celular e a sua sobrevivência (Schenckman *et al.*, 1991; Giordano *et al.*, 1994; Ming *et al.*, 1995; revisto por Andrade e Andrews, 2005). É bem estabelecida a importância da mobilização de Ca^{2+} no processo de invasão da célula hospedeira de vertebrados pelo *T. cruzi* (Burleigh e Andrews, 1995). Estudos mostram que muitos parasitos intracelulares utilizam-se deste mecanismo para induzir sua internalização (Docampo e Moreno, 1996). A via de sinalização pelo TGF- β é mobilizada pelo *T. cruzi* para invadir células não fagocíticas do hospedeiro (Ming *et al.* 1995). Células epiteliais mutantes, sem expressão dos receptores I e II do TGF- β , são pouco infectadas. No entanto, macrófagos humanos e de camundongos ativados por TGF- β não se tornam mais susceptíveis à invasão pelo *T. cruzi*, sugerindo que esta via de sinalização pode não ser essencial para a infecção de células fagocíticas (Ming *et al.* 1995).

Após o estabelecimento do contato entre o parasito e a célula, lisosomas do hospedeiro podem se encontrar fortemente associados à membrana, formando um aglomerado no sítio de invasão. A fusão de lisosomas com a membrana plasmática da célula hospedeira é dependente de Ca^{2+} , e tem sido apontada como essencial para a entrada do parasito (Burleigh, 2002; Schenckman *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 1996). Anteriormente à invasão celular, os tripomastigotas do *T. cruzi* aderem a receptores específicos na membrana externa da célula

hospedeira. Esta adesão é mediada por ligantes do parasito que se associam a grupos de carboidratos em receptores na superfície da célula hospedeira (Pereira, 1994).

A interação do parasito com a célula hospedeira é dependente da síntese de várias moléculas. Uma dessas moléculas é a trans-sialidase, enzima ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) na superfície da membrana do parasito, e subsequentemente liberada para o meio. A trans-sialidase catalisa a transferência de ácido siálico de glicoconjugados da célula hospedeira para glicoproteínas do tipo mucina, também localizadas na superfície do parasito e parecem ser importantes no contato célula hospedeira-parasito (Schenkman *et al*, 1994; Ferguson, 1997; Agusti *et al*, 1998). O ácido siálico é um monossacarídeo expresso na superfície celular em forma de glicoconjugados e/ou polímeros. Ele é sintetizado pela maioria das células eucarióticas e em algumas bactérias, estando envolvido na interação célula-célula (Kelm e Schauer, 1997).

Outra molécula sintetizada pelo *T. cruzi*, importante para o processo de invasão da célula hospedeira pelo parasito é a cruzipaína. Ela é a principal cisteína-proteinase do *T. cruzi* (Scharfstein *et al.*, 2000). A cruzipaína é sintetizada como uma pré-proenzima com três domínios distintos, o pró-domínio, o domínio catalítico e uma extensão carboxiterminal. Ela é expressa como zimógeno e precisa sofrer maturação através de remoção catalítica do domínio N-terminal, e é acumulada em “reservosoma”, uma organela do parasito semelhante aos lisosomas (Eakin *et al*, 1992). Embora o nível de expressão de cruzipaína varie, ela é sintetizada em todos os estágios de vida e por todas as cepas de *T. cruzi* (Campetella, 1990). O nível de cruzipaína produzido pelos tripomastigotas está relacionado à capacidade do patógeno de invadir a célula. Assim, altos níveis de expressão de cruzipaína podem contribuir com a alta infectividade do parasito (Aparício *et al.*, 2004). Além disso, a invasão da célula hospedeira é reduzida por inibidores de cisteína-proteinase (Meirelles *et al*, 1992).

A cruzípaína localiza-se na superfície da membrana plasmática do parasito, o que a torna um potente alvo para resposta de anticorpos contra o parasito extracelular intacto. Sabe-se que essa proteína induz resposta imune humoral em camundongos infectados com *T. cruzi*. Camundongos infectados cronicamente apresentaram altos níveis de IgG reativa tanto à proteína nativa quanto à recombinante. Já o desafio oral de camundongos com *T. cruzi* induziu uma resposta de IgA específica para cruzípaína (Schnapp *et al.*, 2002). O estímulo de células de linfonodo de camundongos em cultura com cruzipaína recombinante induziu a produção de IFN- γ em níveis pelo menos três vezes maiores do que quando utilizada como estímulo uma proteína controle. Já a produção de IL-4, tanto em resposta à cruzipaína recombinante como à proteína controle, foi abaixo do nível de detecção do ensaio (<32 U/ml). Isto sugere que a cruzipaína, expressa durante a infecção com *T. cruzi*, induz uma resposta celular do tipo Th1 (Schnapp *et al.*, 2002). A análise por imunohistoquímica de fragmentos do miocárdio de indivíduos com cardiopatia crônica grave, utilizando anticorpos para cruzipaína, demonstrou que fibras miocárdicas infectadas apresentam forte marcação citoplasmática, o que foi observado também no interior de células fagocíticas. Além disso, foi possível visualizar a marcação do antígeno no meio extracelular, próximo ao infiltrado inflamatório, sugerindo a participação da cruzipaína na patologia da cardiomiopatia chagásica. (Morrot *et al.*, 1997).

A cruzipaína induz a liberação de cininas pela quebra do cininogênio de alto e baixo peso molecular, atuando, portanto, como uma cininogenase. As cininas são peptídeos vasoativos derivados do cininogênio e estão implicadas numa gama de respostas patofisiológicas, tais como, vasodilatação, formação de edema, dor, espasmos, estímulo para a síntese endotelial de óxido nítrico (NO) e aumento da permeabilidade vascular (Elliott *et al.*, 1959). O cininogênio em humanos pode ser de dois tipos: de alto peso molecular, que é uma α -globulina plasmática e o de baixo peso molecular, que é uma β -globulina plasmática. O

cininogênio de alto peso molecular é clivado pela ação de caliceína plasmática, liberando o nonapeptídeo bradicinina. O cininogênio extravascular, de alto e baixo peso molecular, quando clivado pela caliceína tecidual libera lisil-bradicinina, um decapeptídeo também conhecido como calidina (Cadena e Colman, 1991; Adam *et al.*, 1985). O efeito da estimulação das cininas sobre seus receptores é finamente regulado pela ação de peptidases que degradam as cininas, as cininases, tais como a enzima conversora de angiotensina (ECA), endopeptidase neutral, carboxipeptidase N e M e aminopeptidase P (Bhoola *et al.*, 1992). O captopril ([S]-1-[3-mercapto-2-methyl-1-oxo-prolyl]-L-proline) é um fármaco inibidor de ECA e, portanto, prolonga a meia vida das cininas promovendo um aumento da biodisponibilidade destes peptídeos (Godsel *et al.*, 2003a).

Captopril é prescrito para o tratamento de hipertensão, agindo pelo bloqueio da conversão de angiotensina I a angiotensina II (Ondetti *et al.*, 1977). Captopril apresenta uma estrutura contendo grupo tiol que proporciona uma ligação específica a ECA, é por esta ligação que se dá a inibição de ECA (Lapteva *et al.*, 2002). ECA é uma enzima ligada à membrana de células endoteliais e de outros tipos celulares, tais como, monócitos/macrófagos e populações de linfócito T. A atividade de ECA está presente tanto no subtipo de linfócito T CD4⁺ como em CD8⁺ (Costerousse *et al.*, 1993). Captopril apresenta propriedades anti-inflamatórias e participa da regulação imune. Os inibidores de ECA, inclusive captopril, têm se mostrado benéficos em encefalomielite autoimune experimental e em miocardites (Constantinescu *et al.*, 1995; Godsel *et al.*, 2003a). Captopril mostrou ter um forte efeito na inflamação ocular em uveíte induzida por endotoxina no rato; ele suprimiu a ativação da via NFκB na íris e em células do corpo ciliar, provavelmente bloqueando produção local de Ang II. Alta dose de captopril impediu significativamente a translocação nuclear de p65 induzida por LPS na íris e no corpo ciliar (Ilieva *et al.*, 2006). A propriedade anti-inflamatória de

captopril é confirmada pela supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IL-1 β por células mononucleares do sangue periférico (Schindler *et al.*, 1995; Constantinescu *et al.*, 1998). Entretanto, captopril inibiu a apoptose induzida por ativação em hibridomas de células T (Odaka and Mizuochi, 2000) e inibiu também a apoptose induzida por Fas em célula T periférica humana (Déas *et al.*, 1997). Além disso, captopril bloqueou a expressão de FasL induzida por anti-CD3 em células T e reduziu a expressão de Fas (Odaka and Mizuochi, 2000). Estes estudos sugerem que captopril pode modular a deleção clonal e a aquisição de autotolerância *in vivo*, possivelmente levando à autoimunidade.

A ação biológica das cininas depende da interação destas com seus receptores. Já foram descritos 2 receptores em mamíferos denominados receptor tipo 1 de bradicinina (B₁R) e receptor tipo 2 de bradicinina (B₂R). Estes receptores são proteínas contendo sete domínios transmembranas e estão acoplados à proteína G (McEachern *et al.*, 1991; Marceau *et al.*, 2002). O B₂R está presente em vários tecidos e células e é expresso constitutivamente. Ele é ativado pela bradicinina e calidina, mas não pelo metabólito da bradicinina (desArg⁹-bradicinina). Já o B₁R está ausente na maioria dos tecidos em condições normais, porém, é rapidamente expresso no processo inflamatório, lesão tecidual e em traumas, assim como após incubação *in vitro* com citocinas inflamatórias, especialmente IL-1. Este receptor responde ao metabólito da bradicinina, mas não à bradicinina (Marceau *et al.* 2002; Marceau *et al.*, 1998). Já foram descritos vários antagonistas do B₂R, Hoechst Icatibant (HOE-140) e Cortech Bradycor (CP-0597) têm sido os mais estudados e mostraram-se potentes e seletivos para B₂R (Hock *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1996). O antagonista B9958 é um decapeptídeo contendo dois resíduos de lisina que impedem a sua degradação proteolítica; ele antagoniza, especificamente, B₁R (Gobeil *et al.*, 1997). Os antagonistas B9430 e B9340 ligam tanto ao B₁R como ao B₂R, mostrando-se potentes para ambos (Stewart *et al.*, 1996).

Estudos indicam que a invasão celular por formas infectivas do *T. cruzi* é potencializada pela liberação de cinina a partir das moléculas de cininogênio presentes no hospedeiro. Desta forma, o *T. cruzi* pode ativar diretamente o sistema cinina através da atividade de suas cisteína-proteinases, como a cruzipaina (Scharfstein *et al*, 2000; Del Nery *et al*, 1997). A liberação de cininas por tripomastigotas de *T. cruzi* em cultura de células superexpressando B₂R induz aumento da concentração intracitoplasmática de cálcio (Ca²⁺). A adição de antagonista específico para B₂R ao meio de cultura leva à redução da concentração de Ca²⁺ e da taxa de invasão celular, sugerindo uma importante participação de B₂R no processo de infecção por *T. cruzi* (Scharfstein *et al*, 2000). Bradicininas e as cininas relacionadas são peptídeos pró-inflamatórios. Eles têm um importante papel em doenças inflamatórias induzindo a imunidade tipo I pela via da IL-12 (Scharfstein *et al.*, 2007). As cininas foram recentemente implicadas no desenvolvimento de imunidade contra parasito via células dendríticas (Aliberti *et al.*, 2003). Estudos mostram que camundongos deficientes no B₂R são extremamente susceptíveis à infecção intranasal com *L. monocytogenes*, e que eles são incapazes de produzir citocinas que promovem a imunidade tipo I (Kaman *et al.*, 2009).

1.3. A resposta imune celular na doença de Chagas humana

Com a complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi* no mamífero, o controle da infecção envolve uma combinação de respostas imunes do hospedeiro que operam em vários níveis. Na doença humana, embora a produção de anticorpos tenha sido considerada importante (Gazzinelli *et al.*, 1990), o papel dessas moléculas precisa ser melhor estudado. É, no entanto, um consenso na literatura, de que a resposta imune celular possui um papel fundamental na imunopatologia da doença de Chagas (revisito por Dutra *et al.*, 2005; Dutra e Gollob, 2008).

A indução de uma resposta imune celular eficiente é dependente da ativação de células apresentadoras de antígenos (APC). A estimulação de células T requer a interação entre o receptor destas (TCR) e o complexo peptídeo-MHC (complexo de histocompatibilidade principal) nas células apresentadoras de antígeno. Além disso, também é necessária uma co-estimulação adequada fornecida pelas APCs. O papel principal destas células é tornar o antígeno “visível” para o linfócito T e isto ocorre quando, após a sua captação, as células o processam em pequenas frações e o ligam a moléculas de MHC classe I e II. Estas moléculas adquirem, respectivamente, peptídeos derivados da degradação de proteínas endógenas e exógenas. Após sua formação, o complexo peptídeo-MHC é translocado para a superfície celular tornando-se disponível para ligação ao TCR dos linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ (Chapman, 1998). Em 2004, Souza e colaboradores investigaram a expressão de HLA-DR por células CD14⁺ de pacientes chagásicos com as formas clínica cardíaca e indeterminada e de indivíduos não chagásicos. Eles mostraram que monócitos de pacientes chagásicos indeterminados apresentam baixos níveis de HLA-DR quando comparados a indivíduos não chagásicos, sugerindo que pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada apresentam uma menor capacidade de estimular as células T CD4⁺. Esta hipótese pode representar um importante mecanismo de controle da reação inflamatória nestes pacientes, levando a menores danos dos tecidos, o que é consistente com a forma indeterminada da doença. Além do sinal fornecido pela ligação do complexo antígeno-MHC ao receptor, as células T necessitam de um segundo sinal para terem sua resposta otimizada. Este segundo sinal é fornecido por moléculas coestimulatórias, presentes na superfície de APCs e que se ligam a receptores específicos presentes nas membranas dos linfócitos T (Lecomte *et al.*, 1994). A via coestimulatória mais estudada e importante é dada pela interação CD28/B7-1 e B7-2. O CD28 é uma glicoproteína transmembrana, homodimérica, da família das

imunoglobinas, presente na superfície de linfócitos T (Azuma, 1992) que, associada a seus ligantes, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), presentes nas APCs, estimula a proliferação linfocitária, produção de citocinas e impede o estado de anergia (Harding *et al.*, 1992). CD28 divide sua habilidade de se ligar a membros da família B7 com o seu homólogo CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico). Entretanto, eles possuem diferentes afinidades por seus ligantes; CTLA-4, também chamado de CD152, tem uma afinidade aproximadamente 100 vezes maior pelo ligante do que CD28 (Linsley *et al.*, 1994). A ligação de CTLA-4 a B7 resulta na inibição da produção de interleucina 2 e consequente paralização da progressão do ciclo celular de G0/G1 o que pode levar a morte celular por apoptose. Desta forma, CTLA-4 funciona como um inibidor da ativação do linfócito T (Krummel e Allison, 1996; Walunas *et al.*, 1996). Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que pacientes chagásicos possuem alta frequência de células T CD28⁻ e que estas células possuem uma expressão preferencial da região variável beta 5 (Vbeta5) em seu TCR (Menezes *et al.*, 2004). Mais recentemente, foi demonstrado que estas células possuem características funcionais distintas, correlacionadas com a forma clínica dos pacientes chagásicos: enquanto nos pacientes indeterminados células T CD4⁺CD28⁻ expressam citocinas inflamatórias, mas também anti-inflamatórias, em pacientes com cardiopatia grave, elas associam-se primariamente à expressão de citocinas inflamatórias (Dutra *et al.*, 2009). Outra correlação clínica importante encontrada em nossos estudos foi uma expressão aumentada de CTLA-4 por linfócitos T de pacientes chagásicos indeterminados, mas não cardiopatas, o que pode contribuir com a modulação da resposta imune nos pacientes indeterminados (Souza *et al.*, 2007).

Estudos mostram que citocinas inflamatórias têm um papel central na infecção experimental aguda por *T. cruzi*. Após a infecção pelo *T. cruzi*, macrófagos e células dendríticas secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, regulam positivamente a

expressão de receptores coestimulatórios e aumentam a endocitose e morte intracelular do parasito pela liberação de espécies reativa de oxigênio e nitrogênio. Em contato com IFN- γ , macrófagos tornam-se altamente ativos e aumentam a síntese de radicais livres derivados do nitrogênio (Gazzinelli *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1993).

Citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, e TNF- α são prontamente liberadas durante a infecção e ativam outros tipos celulares (Souza *et al.*, 2007, anexo II; Bilate and Cunha-Neto 2008). Souza e colaboradores (2004) observaram que a infecção por *T. cruzi* levou ao aumento da expressão de IL-10 e IL-12 pelos monócitos de pacientes indeterminados comparado à condição não infectada. Monócitos de pacientes chagásicos cardíacos apresentaram altos níveis de TNF- α após a infecção pelo parasito. Estas diferenças observadas entre os perfis de citocinas de pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença indicam uma resposta modulatória e inflamatória, respectivamente. O achado acima demonstra que monócitos de pacientes chagásicos com formas clínica distintas reagem diferentemente à infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*.

Acreditava-se que as células T-helper (T_H) diferenciavam apenas em células T_H1 ou T_H2, no entanto, recentemente foi descrito um subtipo de células T CD4⁺ produtoras de IL-17. As células T_H17 estão relacionadas à indução de injúria tecidual autoimune (Park *et al.*, 2005; Harrington *et al.*, 2005). A expressão de IL-17 está envolvida em processos inflamatórios em algumas doenças como a artrite, uma vez que IL-17 regula proteinases importantes na destruição do tecido local (Chabaud *et al.*, 2000). Como vários estudos mostram indícios de que parte da patologia da doença de Chagas se deve a fatores autoimunes (Cossio *et al.*, 1995; Levitus *et al.*, 1991, Cunha-Neto *et al.*, 1996, Dutra *et al.*, 1994) é importante compreender o papel de IL-17 na doença de Chagas.

Embora vários estudos tenham sido realizados na tentativa de compreender como se dá a infecção da célula hospedeira de mamíferos pelo protozoário *T. cruzi*, este processo não foi completamente esclarecido. Além disso, sabe-se que a produção de mediadores imunológicos é responsável pelo estabelecimento e controle da doença. No entanto, os mecanismos envolvidos na liberação destes mediadores não foram completamente elucidados. Nesse trabalho, propomo-nos a avaliar a **hipótese** de que o peptídeo cinina, liberado pela cruzipaina do *T. cruzi*, liga-se aos seus receptores presentes nos monócitos humanos, potenciando a entrada do parasito nessas células, e, ao mesmo tempo, induzindo alterações fenotípicas e funcionais nos monócitos que possam influenciar ou correlacionar-se com o curso distinto da infecção. Propomo-nos também a avaliar o papel das cininas na indução da ativação e na função efetora dos linfócitos T. Na nossa hipótese, o uso do fármaco captopril potencializaria a resposta dada pelas cininas. Acreditamos que as respostas a essas hipóteses auxiliarão num melhor entendimento das interações célula hospedeira-parasito e da resposta imune celular na doença de Chagas humana.

2. Justificativa

A doença de Chagas atinge, atualmente, cerca de 15 milhões de indivíduos na América Latina, e representa a primeira causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente ativos nos países endêmicos (Coura e Dias, 2009 e OMS, 2002). Portanto, estudos que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos patogênicos da infecção pelo *T. cruzi* são de grande importância.

A invasão celular é um passo essencial para o desenvolvimento da doença de Chagas, sendo o fator que precede a replicação intracelular do parasito e a liberação dos tripomastigotas infectivos na corrente sanguínea do hospedeiro que se disseminarão por todo o organismo. O *T. cruzi*, agente causador desta doença, expressa uma proteína, chamada cruzipaina, que está presente em todos os seus estágios de vida. Já foi demonstrado, em modelos experimentais, que esta proteína é importante na invasão da célula hospedeira murina pelo parasito, e que a invasão ocorre via receptor B₂ de cinina. Propomo-nos em nossos estudos avaliar se a adição de antagonistas específicos para os receptores B₁ e B₂ pode influenciar a interação de tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y com monócitos humanos. Propomo-nos também, avaliar se estes antagonistas modificam a expressão de moléculas importantes para a ativação e função efetora de monócitos CD14⁺ e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e se possíveis alterações poderiam nos auxiliar na compreensão da evolução clínica diferencial observada na doença Chagas. Outro alvo de nossos estudos é o fármaco captopril que é um inibidor de ECA e portanto, aumenta a biodisponibilidade das cininas, este fármaco é comumente prescrito para pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, mas são poucos os estudos experimentais e em humanos que investigam os efeitos de captopril na resposta imunológica de pacientes chagásicos. Propomo-nos a determinar qual é o papel deste fármaco

na infecção de monócitos humanos pelo *T. cruzi* e qual é a sua participação na resposta imune frente ao estímulo com o parasito. Este estudo é importante principalmente considerando-se que este fármaco é comumente administrado a pacientes chagásicos hipertensos e não se sabe qual o papel do captopril frente à infecção pelo *T. cruzi*. Acreditamos que estes estudos elucidarão aspectos importantes da interação parasito-célula hospedeira e trarão informações sobre os efeitos do captopril na resposta imunológica dos pacientes chagásicos podendo, inclusive, beneficiar a população infectada.

3. Objetivo Geral

Avaliar a participação dos receptores B₁ e B₂ de cininas e do fármaco captopril em processos decorrentes da interação do *T. cruzi* com células hospedeiras provenientes de indivíduos portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas e de indivíduos não chagásicos.

3.1. Objetivos Específicos

Propõe-se a determinar, na população de monócitos:

1- Os níveis de expressão de enzima conversora de angiotensina (ECA) por monócitos de pacientes chagásicos com as formas clínicas cardíaca e indeterminada frente ao tratamento com captopril e antagonistas específicos para os receptores B₁ e B₂ de cininas, infectados ou não com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

2- A frequência da infecção de monócitos de pacientes chagásicos das formas clínicas cardíaca e indeterminada e de indivíduos não chagásicos por tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, frente ao tratamento com captopril e antagonistas específicos para os receptores B₁ e B₂ de cininas.

4- A expressão de moléculas coestimulatórias e marcadores de ativação celular (CD80, CD86, HLA-DR), da enzima iNOS e de citocinas (IL-12, TNF- α , IL-10) em monócitos de pacientes chagásicos com as formas clínicas cardíaca e indeterminada e de indivíduos não chagásicos, frente ao tratamento com captopril e antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas, infectados ou não com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Propõe-se a determinar, na população de linfócitos de indivíduos não chagásicos:

6- O papel do fármaco captopril na ativação (expressão de HLA-DR) e na função imunoregulatória de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-17) frente à estimulação com o parasito *T. cruzi* da cepa Y.

4. Materiais e Métodos

4.1. Pacientes

Os pacientes que fizeram parte deste estudo foram selecionados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes-Diniz (CTR-DIP). O diagnóstico da doença de Chagas foi confirmado através de sorologia específica para a doença. O diagnóstico e o tratamento destes pacientes são de responsabilidade do Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

Os indivíduos que foram analisados neste trabalho foram divididos em quatro grupos distintos: pacientes chagásicos indeterminados, pacientes chagásicos com cardiopatia dilatada, pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada e indivíduos não chagásicos. A classificação dos pacientes chagásicos em indeterminados e cardíacos dilatado, ou não, seguiu o critério estabelecido por Rocha e colaboradores, 2003.

O grupo indeterminado (FCI, n= 6) compreende pacientes que não apresentam sintomas da doença e seus exames radiográficos e eletrocardiográficos foram normais, sendo a doença evidenciada somente pela positividade de testes sorológicos específicos. Neste mesmo grupo enquadram-se pacientes assintomáticos com pequenas alterações detectáveis em exames de alta sensibilidade como testes ergométricos e holter.

O grupo cardíaco foi subdividido em cardiopata sem dilatação (CND, n= 7) e com dilatação, sendo este o quadro mais grave (CD, n= 6). Os cardiopatas sem dilatação apresentam variadas alterações cardíacas que afetam o sistema de condução, sem apresentarem alterações de contractilidade ou cardiomegalia. Estes pacientes apresentam alterações no eletrocardiograma, bloqueio completo do ramo direito, bloqueio divisional antero superior de extra-sístolia frequente e induzida pelo esforço. O raio X do tórax destes pacientes é normal.

Os cardiopatas com dilatação apresentam cardiomegalia, além de todas as alterações citadas para os cardiopatas sem dilatação.

O grupo controle (NC, n= 6) é constituído por indivíduos saudáveis com sorologia negativa para *T. cruzi*.

Foram coletados 40 mL de sangue de cada indivíduo por punção de veia periférica, em tubos a vácuo contendo heparina/EDTA.

Os termos de esclarecimento e de consentimento, direcionados aos pacientes que concordaram em participar desta pesquisa, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP), como parte integrante do projeto maior intitulado “Avaliação eletrofisiológica não-invasiva na doença de Chagas: diagnóstico do dano miocárdico e fatores prognósticos”, coordenado pelo Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

4.2. Linhagens celulares para cultura de T. cruzi

Células VERO, obtidas de fibroblastos do rim de macaco, foram mantidas em frascos de cultura de 250 cm² com meio de cultura RPMI (Sigma) suplementado com 5% de SBF (Soro Fetal Bovino) inativado e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO₂, 37°C, e as células repicadas periodicamente.

4.3. Obtenção dos parasitos

Este procedimento foi realizado conforme descrito por Souza *et al.* (2004). Foram utilizados tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y obtidos do sobrenadante de cultura de células VERO. Cerca de 1 x 10⁶ células foram semeadas em frascos de cultura de 250 cm²

contendo o meio descrito acima. Após a adesão e formação da monocamada, as células foram infectadas com 1×10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* obtidos de sangue desfibrinado de camundongos infectados experimentalmente ou de estoques mantidos a -80°C congelados em DMSO. Após 24 horas de incubação, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 , 33°C , as garrafas foram lavadas para a retirada dos tripomastigotas que não penetraram as células. Após acrescentar meio, as culturas de células infectadas foram mantidas em estufa úmida, a 33°C e 5% de CO_2 . O meio foi trocado no dia seguinte e no quarto dia de infecção. A partir do quinto dia de cultura, começaram a ser liberados os tripomastigotas, o sobrenadante contendo os parasitos foi recolhido e centrifugado a 1000g, por 10 minutos, a 4°C . Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado com meio para 1 mL. Os parasitos foram contados e utilizados nos ensaios de infecção. A contagem dos parasitos foi realizada na câmara de Neubauer. Após a liberação dos tripomastigotas, o meio de cultura foi trocado diariamente, a fim de reduzir a frequência de amastigotas no meio.

4.4. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

A cada 10 mL de sangue obtido dos doadores voluntários foi adicionado volume igual de tampão salina fostato (PBS- adquirido comercialmente da Sigma), pH 7.2, e esta mistura foi aplicada cuidadosamente sobre 10 mL de *Ficoll-Paque* (Pharmacia). Após 40 minutos de centrifugação a 128g, a 20°C , as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), separadas por gradiente, foram recolhidas e lavadas por centrifugação (128g, 4°C) em PBS 1X. Este processo foi repetido mais duas vezes. Em seguida, foram contadas em câmara hemocitométrica e ressuspensas com meio RPMI (Sigma), acrescido de 2mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de penicilina G potássica e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina.

4.5. Infecção das células para análise do efeito do tratamento com antagonistas dos receptores de cinina e de captopril na invasão dos monócitos por tripomastigotas de T. cruzi e na expressão de moléculas de superfície e citocinas

Antes da infecção das células com *T. cruzi* da cepa Y, as células foram tratadas com uma série de reagentes para avaliar o papel dos receptores de cininas na invasão pelo parasito.

O protocolo de tratamento foi:

- 1- Células + Meio
- 2- Células + Captopril 50 μ M
- 3- Células + Antagonista de B₁/B₂ (B9430) 200 η M
- 4- Células + Antagonista de B₁ (B9958) 200 η M
- 5- Células + Antagonista de B₂ (HOE-140) 200 η M

Os reagentes foram cedidos gentilmente pelo Dr. Júlio Scharfstein da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As concentrações e os respectivos tempos de cultura para cada reagente foram testados e confirmados por experimentos pilotos.

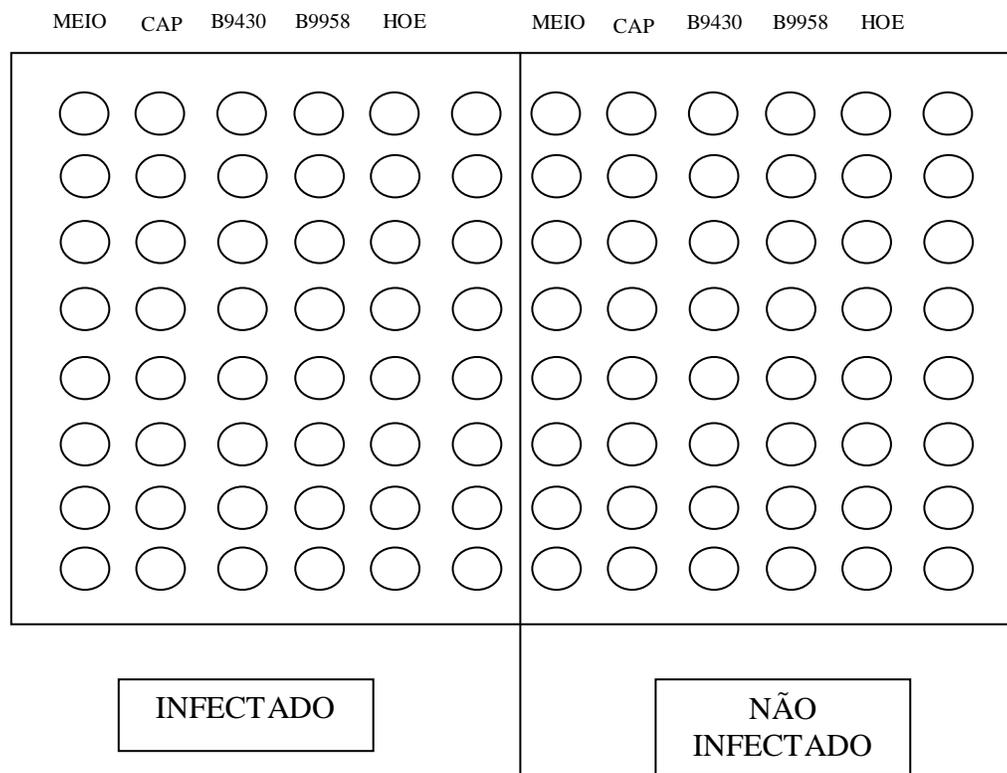
Os tripomastigotas foram ressuspensos em RPMI para a concentração de 5×10^7 parasitos/mL e foram adicionados cinco tripomastigotas de *T. cruzi* por célula. O tratamento e infecção foram realizados em placas de 96 poços fundo em U (para posterior avaliação de moléculas de superfície e citocinas) ou em placas de 24 poços (para avaliação da infectividade dos monócitos). Para as análises de moléculas de superfície e citocinas, a cada poço foi adicionado:

Células ($0,2 \times 10^6$ células/poço)

Tripomastigotas (1×10^6 tripomastigotas/poço)

Tratamento (meio, captopril, Ant. B₁/B₂R, Ant. B₁ ou Ant. B₂)

Meio completo composto por: RPMI + 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL), 1% de L-glutamina (200nM) + 10% de soro fetal humano inativado) completando o volume para 200µL.



Esquema 1: Esquema da placa mostrando o protocolo de incubação com os diferentes tratamentos.

A placa foi deixada na estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂, por 3 horas para que ocorresse a infecção. Após este período a placa foi lavada duas vezes com PBS 1x, centrifugada a 128g, 4°C, 10 min. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos com meio

completo para um volume final de 200µL por poço e a placa foi reincubada na estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂, por aproximadamente 14 horas e posterior marcação das células, como descrito no item subsequente. Em todos os experimentos de análise de expressão de moléculas de superfície e citocinas foram acrescentados controles no qual as células receberam os tratamentos, mas não foram infectadas (Esquema 1).

Para análise da infectividade, os ensaios foram realizados em placa de 24 poços. Foi colocada em cada poço uma lamínula e então adicionados 200µL da solução contendo as células, na concentração supracitadas, e 300µL de meio completo. A placa foi levada para a estufa 37°C, 5% de CO₂ por 1 hora, para a aderência das células na lamínula. Após este período os poços foram lavados duas vezes com 750µL de RPMI + 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL) a 37°C para remoção das células não aderentes. Foram, então, adicionados:

Tratamentos (meio, captopril, Ant. B₁/B₂R, Ant. B₁ ou Ant. B₂)

Tripomastigotas (5×10^7 tripós/mL)

Meio completo

A placa foi reincubada em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 3 horas para o processo de infecção. Após este período os parasitos que não infectaram as células foram removidos e desprezados realizando-se duas lavagens cuidadosas com PBS 1X a 37°C. Foi então, realizada a coloração com Giemsa, para avaliação do número de células infectadas.

4.6. Reação de imunofluorescência para análise em citômetro de fluxo

Após aproximadamente 14 horas de cultura, parte das células nas placas de 96 poços foram incubadas por mais 4 horas com brefeldina-A (1 mg/mL), a qual bloqueia a secreção de

proteínas concentrando as citocinas no citoplasma celular. As placas contendo células que não seriam marcadas para citocinas foram retiradas da estufa e centrifugadas a 128g, 4°C, 8 min, o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionada, em cada poço, uma solução contendo PBS 0,015M pH 7.2 contendo 0,01% de azida sódica e 0,2% albumina bovina sérica (BSA) e anticorpos monoclonais. Em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4 acoplado ao fluorocromo cy-chrome (Cy), anti-CD8 ou anti-CD14 acoplados ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificação de diferentes populações celulares; anti-CD80, CD86, CD28, CTLA-4 ou HLA-DR acoplados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) para avaliar a expressão de moléculas de ativação e coestimulação; anti-CD143 acoplado ao fluorocromo PE para avaliar a expressão de enzima conversora de angiotensina. O protocolo de marcação foi:

1- Controles de Isotipo

2- CD14/CD80

3- CD14/CD86

4- CD14/HLA-DR

5- CD8/CD28/CD4

6- CD8/CTLA-4/CD4

7-CD14/CD143

Após esta incubação, as células foram fixadas pela adição de solução de formaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas e centrifugadas. Os pellets foram ressuspensos com formaldeído 2% para um volume final de 200µL. As células foram transferidas para tubos apropriados e então, realizada a aquisição em citômetro de fluxo.

Para coloração intracitoplasmática, após as 4 horas de incubação com brefeldina, as células foram incubadas com anti-CD4, CD8 e CD14 como descrito anteriormente, em seguida, permeabilizadas pela incubação com solução de 0,5% de saponina por 30 min, centrifugadas e, incubadas com anticorpos anti-citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ TNF- α , ou anti-iNOS acoplados ao fluorocromo PE. O protocolo de marcação foi:

- 1- Controles de Isotipo
- 2- CD14/IL12
- 3- CD14/IL10/CD4
- 4- CD14/TNF-alfa/CD4
- 5- CD8/IFN-gama/CD4
- 6-iNOS/CD14

4.7. Reação de imunofluorescência para análise do papel de captopril na ativação e função imunoregulatória dos linfócitos T

Durante a infecção das células com *T. cruzi* da cepa Y, as células receberam o seguinte tratamento:

- 1- Células + Meio
- 2- Células + Meio + Bradicinina
- 3- Células + Captopril 50 μ M
- 4- Células + Captopril 50 μ M + Bradicinina
- 5- Células + Antagonista de B₂ (HOE-140) 200 η M + Bradicinina

As células foram submetidas à infecção por 3 horas. Após este período, os tripomastigotas que não infectaram as células foram descartados por 3 lavagens com PBS 1X e as células foram

incubadas por 14 horas e ressuspensas em meio suplementado com 10% em estufa 37°C, 5% CO₂. Passado este período foi realizado o protocolo descrito no item 4.6 utilizando os seguintes anticorpos: anti-CD4 acoplado ao fluorocromo FITC e anti-CD8 acoplado ao fluorocromo Cy para identificação dos subtipos de células T; anti-HLA-DR, CD143, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17 acoplados ao fluorocromo PE para avaliar a ativação e a função efetora dos linfócitos T. O protocolo de marcação foi:

- 1- Controles de Isotipo
- 2- CD4/HLA-DR/CD8
- 3- CD4/CD143/CD8
- 4- CD4/TNF- α /CD8
- 5- CD4/IFN- γ /CD8
- 6- CD4/IL-10/CD8
- 7- CD4/IL-17/CD8

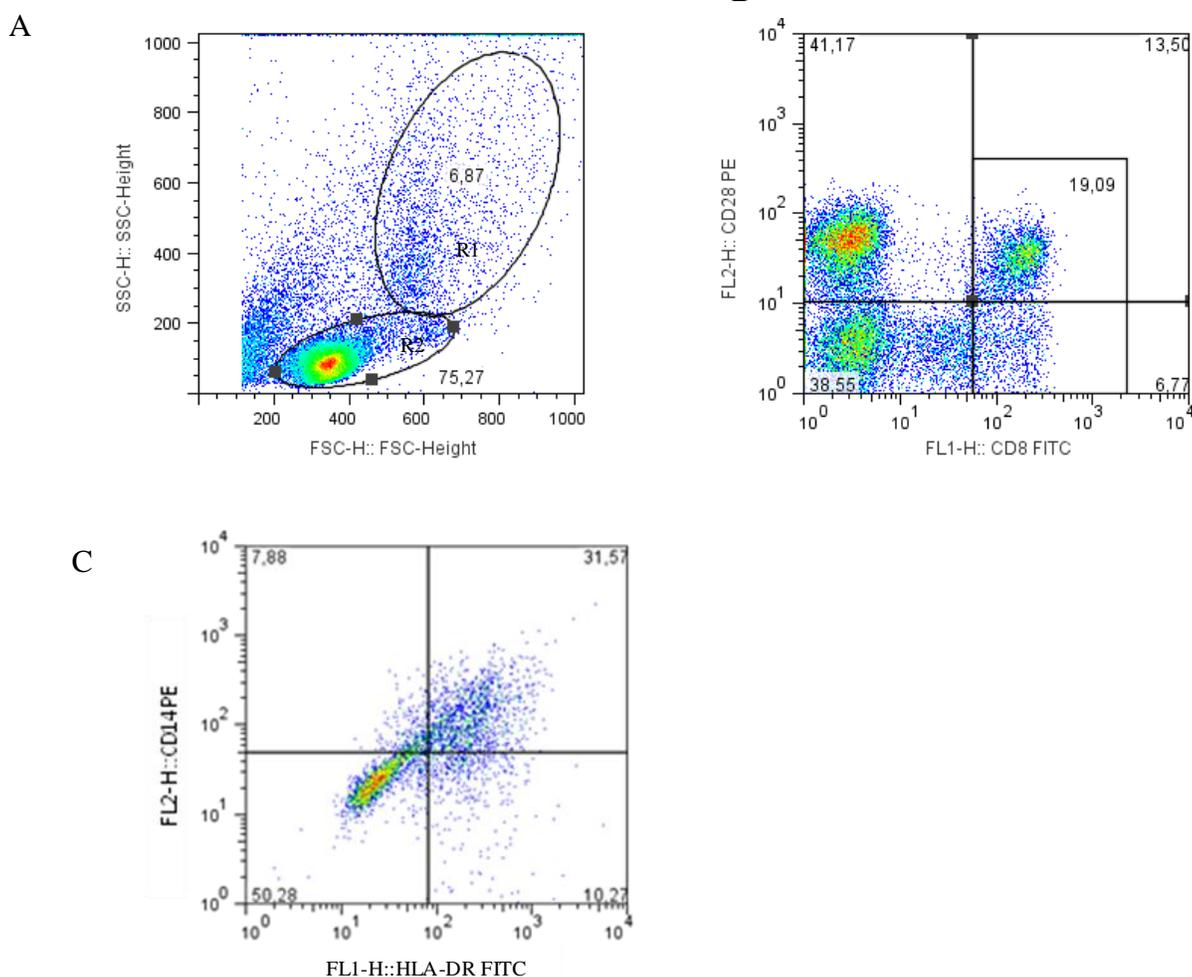
4.8. Análises citométricas

A citometria de fluxo foi utilizada para a análise da expressão de moléculas de superfície e citocinas por CMSP após os tratamentos citados e infecção com *T. cruzi*.

O citômetro de fluxo (FACScan – *Beckton & Dickinson*), aparelho utilizado para coleta e análise dos dados, permite a avaliação de cinco parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade das células (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2) e fluorescência tipo 3 (FL3). FL1, FL2 e FL3 correspondem a sinais luminosos emitidos pela excitação do isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou CFSE, ficoeritrina (PE) e *cy-chrome* (CY), respectivamente. Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula incubada com anticorpos e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos acoplados aos

anticorpos, em diferentes comprimentos de onda. O emprego de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos que emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda permite identificar, em uma mesma célula, estruturas distintas, reconhecidas pelos anticorpos específicos.

Utilizando o programa *Flow-Jo*, selecionamos a população celular a ser analisada, de acordo com sua localização no gráfico de tamanho *versus* granulosidade.



Esquema 2: Perfil puntual representativo de CMSP. A) perfil de localização das CMSP de acordo com o tamanho x granulosidade. A população selecionada e que se localiza próxima ao eixo do X é a população de linfócitos. A população selecionada pela elipse maior representa a população de monócitos. B) Perfil puntual de linfócitos marcados com anti-CD8 e anti-CD28. C) Perfil puntual de monócitos marcados com anti-CD14 e anti-HLA-DR.

4.9. Coloração com Giemsa

Após as 3 horas de infecção, as células contidas na placa de 24 poços foram lavadas cuidadosamente com PBS 1X a 37°C para a remoção dos tripomastigotas que não infectaram. Foram adicionados 200µL de ácido Tânico 1% em cada poço por 1 minuto, as células foram lavadas uma vez com PBS. Foi adicionada 1 gota de soro fetal humano inativado por 5 minutos para evitar a precipitação do corante nos passos seguintes. Após os poços terem secado completamente, foram adicionados 200µL de May-Grumwald por 30 segundos e lavado rapidamente com água destilada, na sequência, foi adicionado 200µL de Giemsa, preparado momentos antes, por 1min e 30 seg. O corante foi lavado com água destilada. As lamínulas foram retiradas dos poços com auxílio de uma agulha e montadas na lâmina. A contagem das células infectadas foi realizada em microscópio óptico com um aumento de 600X. Contamos 10 campos por tratamento.

4.11. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados pelo teste t pareado ou não pareado do programa estatístico GraphPad Prism 3.0. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. Resultados

ANÁLISES NA POPULAÇÃO DE MONÓCITOS:

Os monócitos são importantes células da imunidade inata que participam ativamente da eliminação de patógenos, tais como *T. cruzi*, e da indução da resposta imune adaptativa pela apresentação do antígeno a linfócitos T. Dadas as evidências de que células murinas superexpressando B₂R foram mais infectadas por tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) e que o tratamento com captopril aumentou a infecção de células CHO e HUVECs (Scharfstein et al., 2000), propomosemo-nos avaliar a participação dos receptores B₁R e B₂R no processo de infecção dos monócitos humanos pelo *T.cruzi* da cepa Y, e se captopril potencializa os efeitos destes receptores, uma vez que este fármaco aumenta a meia vida das cininas. Além disso, também avaliamos a expressão de moléculas coestimulatórias, de ativação e citocinas por monócitos humanos submetidos aos diferentes tratamentos, provenientes de indivíduos não chagásicos e pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

5.1 O tratamento de monócitos humanos CD14⁺ com antagonistas do receptor B₁ e B₂ de cininas ou com o fármaco captopril altera a expressão da enzima conversora de angiotensina (CD143) em indivíduos chagásicos com diferentes formas clínicas da doença.

A molécula ECA é importante para este estudo pela sua função de degradar as cininas. Sabe-se que ela é expressa na superfície de algumas células, dentre elas monócitos e linfócitos. Assim, neste trabalho, avaliou-se a expressão de CD143 pelos monócitos CD14⁺ infectados ou não pelo *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com os antagonistas do receptor B₁ e B₂ de cinina, com captopril e somente meio.

Avaliando-se cada grupo de estudo separadamente, observou-se que no grupo de indeterminados não houve diferença em relação à expressão de ECA entre as diferentes condições (Figura 1A). No grupo dos cardiopatas sem dilatação, o tratamento com o antagonista B9430 aumentou a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ comparando-se ao tratamento com captopril e meio; esta diferença só foi observada na presença do parasito (figura 1B). Na ausência do parasito, o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ comparando-se ao meio. No grupo de cardiopatas com dilatação, o captopril aumentou a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ comparando-se ao meio, na ausência do parasito (figura 1C).

Comparou-se também, a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ entre os diferentes grupos de chagásicos dentro de cada tratamento. Na condição sem tratamento, meio, observou-se que a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ é menor no grupo CND comparada aos grupos FCI e CD, na presença do parasito (figura 2A). Resultado semelhante foi observado após o tratamento com captopril, a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ também foi menor no grupo CND comparada aos grupos FCI e CD; no entanto, esta diferença só foi observada na ausência do parasito (figura 2B). A frequência de monócitos CD14/CD143⁺ foi menor no grupo CND comparada ao grupo FCI na ausência do parasito após o tratamento com o antagonista B9430, (figura 2C) e a mesma tendência foi observada após o tratamento com o antagonista B9958 (P<0,06) (figura 2D). No tratamento com o antagonista HOE, a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ foi menor no grupo CND comparada ao grupo CD na presença do parasito (figura 2E). De uma maneira geral, a figura 2 mostra que a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ é menor no grupo CND comparada às demais formas clínicas da doença de Chagas.

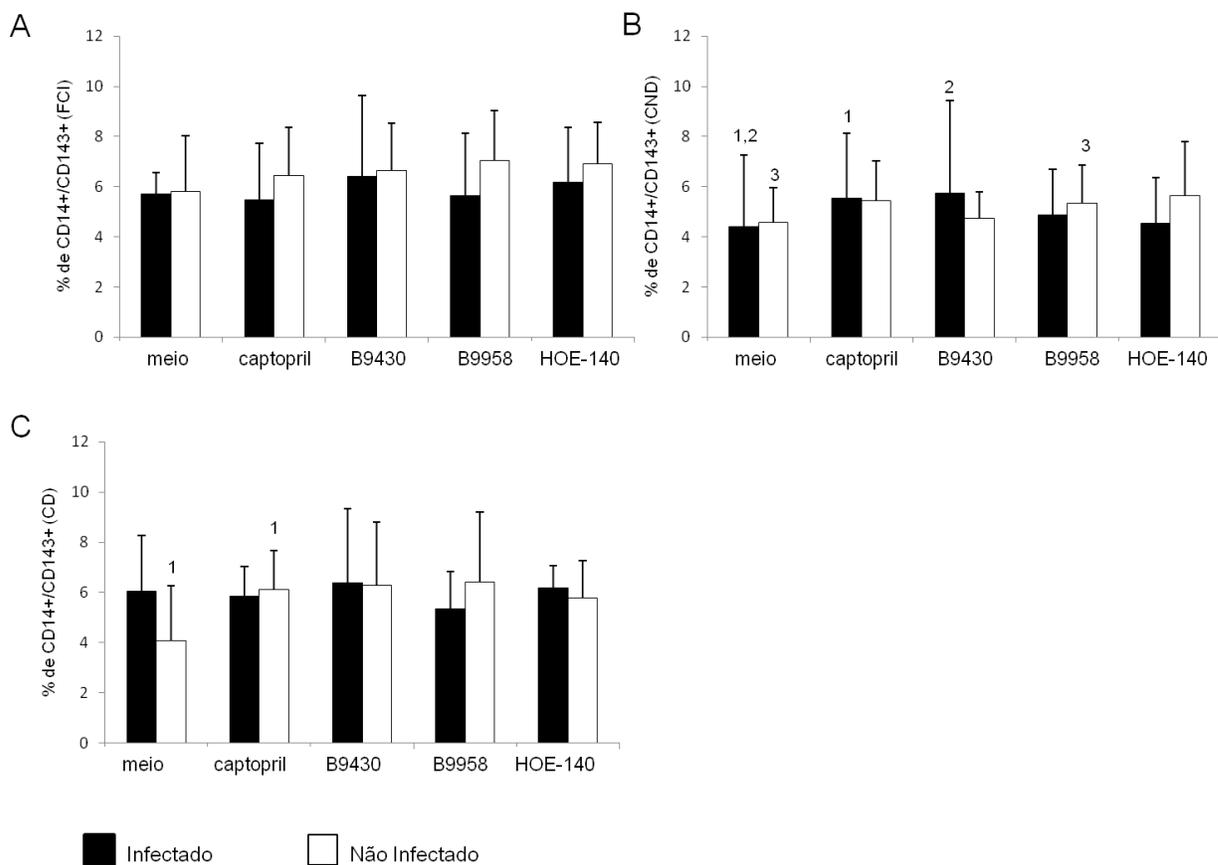


FIGURA 1: Expressão da molécula CD143 por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD143 acoplados ao fluorocromo PE e anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC. As células receberam somente meio captopril (Cap), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430), antagonista do receptor B₁ (B9958) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (n=6) (A), com cardiopatia não dilatada (n=7) (B), e com cardiopatia dilatada (n=6) (C). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente, sendo o valor de p<0,05.

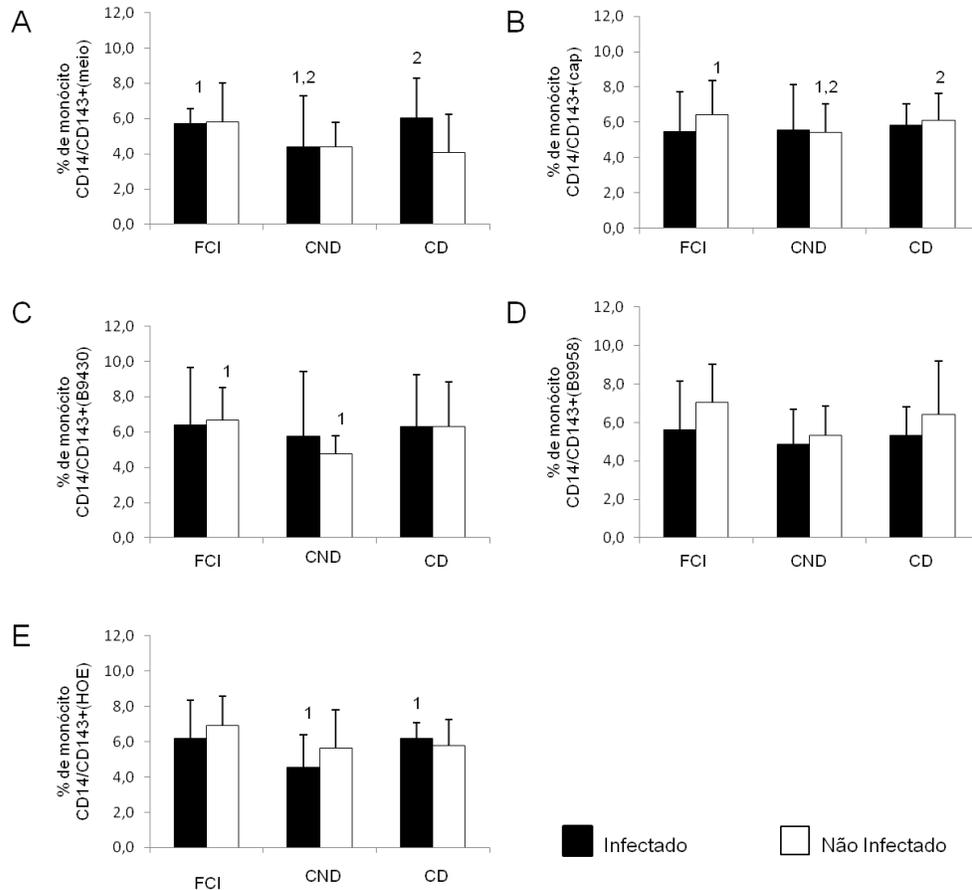


FIGURA 2: Expressão da molécula CD143 por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi* entre os diferentes grupos de pacientes chagásicos. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD143 acoplados ao fluorocromo PE e anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (n=6), com cardiopatia não dilatada (n=7), e com cardiopatia dilatada (n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

5.2 O tratamento de monócitos humanos com antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas reduz o número de células infectadas pelo parasito *Trypanosoma cruzi* da cepa Y.

Através de coloração com Giemsa, foi realizada a contagem de monócitos humanos infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Foram adicionados às culturas de CMSP, separadamente, os antagonistas B9430, B9958 ou HOE 140 específicos para B₁R e B₂R,

somente para B₁R e somente para B₂R, respectivamente, ou captopril. Então, as células foram infectadas com tripomastigotas e a cultura foi incubada por 3hs. Quando avaliaram-se os efeitos dos antagonistas B9430, B9958 e HOE 140, observou-se que eles reduziram significativamente a frequência de monócitos infectados por *T. cruzi*, comparados à condição na qual as células receberam somente meio ou captopril (figura 3). Entretanto, diferentemente do que esperávamos, o tratamento com captopril não aumentou a frequência de monócitos infectados, comparando-se à condição que recebeu apenas meio (figura 3). De forma interessante, embora o captopril não tenha aumentado a frequência de monócitos infectado pelo *T. cruzi*, o tratamento com este fármaco aumentou a intensidade de infecção dos monócitos de indivíduos não chagásicos (dados mostrados no anexo I). O tratamento com os antagonistas dos receptores de bradicinina não alterou a intensidade de infecção dos monócitos em relação à condição sem tratamento (dados não mostrados).

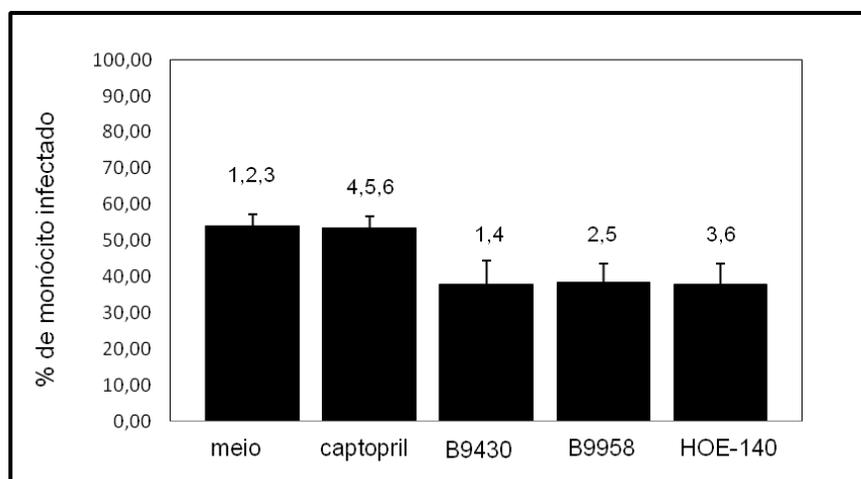


FIGURA 3: Análise da infecção de monócitos de indivíduos não chagásicos por *T. cruzi*. As CMSP foram coletadas de seis indivíduos não chagásicos e aderidas em placa de 24 poços, onde foi realizado o ensaio de infecção por tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y pelo período de 3 horas. Imediatamente antes da infecção, as células receberam somente meio ou foram tratadas com captopril, antagonista de B₁R/ B₂R (B9430), antagonista de B₁R (B9958) ou antagonista de B₂R (HOE 140). A infectividade foi aferida com a utilização de microscopia óptica, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de $p < 0,05$.

A análise da infecção de monócitos de pacientes chagásicos por *T. cruzi* após os diferentes tratamentos levou à resultados semelhantes aos observados em indivíduos não chagásicos. Os antagonistas B9430, B9958 e HOE 140 reduziram significativamente a frequência de monócitos infectados por *T. cruzi* comparado-se à condição na qual as células receberam somente meio ou captopril, enquanto que captopril não aumentou a frequência de monócitos infectados comparado a condição que recebeu meio (figura 4).

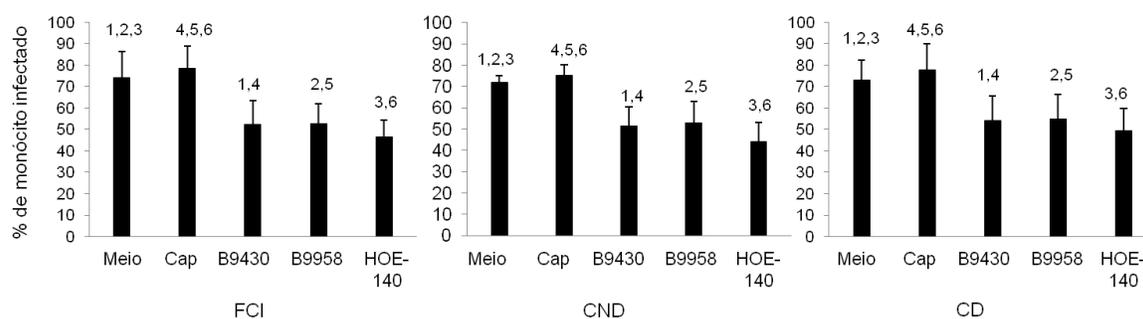


FIGURA 4: Análise da infecção de monócitos de pacientes chagásicos por *T.cruzi*. As CMSP foram coletadas e aderidas em placa de 24 poços, onde foi realizado o ensaio de infecção por tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y pelo período de 3 horas. Imediatamente antes da infecção, as células receberam somente meio ou foram tratadas com captopril, antagonista de B₁R/ B₂R (B9430), antagonista de B₁R (B9958) ou antagonista de B₂R (HOE 140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (FCI/n=7), com cardiopatia não dilatada (CND/ n=6) e com cardiopatia dilatada (CD/n=6). A infectividade foi aferida com a utilização de microscopia óptica, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de $p < 0,05$.

A fim de saber se os monócitos de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e de indivíduos não chagásicos são igualmente permissivos a infecção pelo *T. cruzi*, foi avaliada a frequência de monócitos infectados entre os pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença de Chagas e entre indivíduos não chagásicos. Observou-se que a porcentagem de monócitos infectados pelo *T.cruzi* foi estatisticamente menor no grupo de indivíduos não chagásicos do que nos grupos de pacientes chagásicos na

condição sem tratamento (figura 5A), após o tratamento com captopril (figura 5B) e após o tratamento com os antagonistas B9430 (figura 5C), B9958 (figura 5D) e HOE 140; neste último, a comparação com o grupo CND não foi estatisticamente diferente ($P=0,09$) (figura 5E). Os dados da figura 5 sugerem que os monócitos de pacientes chagásicos são mais permissivos à infecção pelo *T.cruzi* do que as células de um indivíduo que nunca teve contato com o parasito.

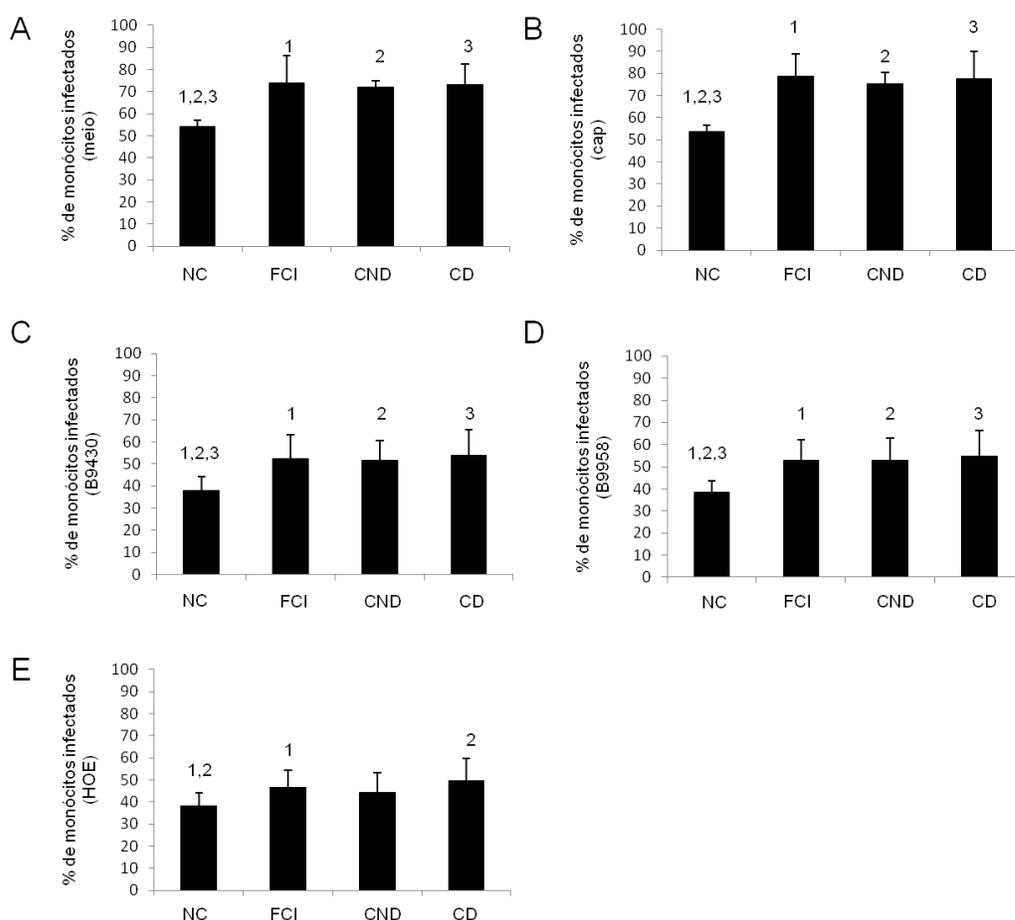


FIGURA 5: Análise da infecção de monócitos por *T.cruzi* nos diferentes grupos. As CMSP foram coletadas e aderidas em placa de 24 poços, onde foi realizado o ensaio de infecção por tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y pelo período de 3 horas. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (FCI/n=7), com cardiopatia não dilatada (CND/ n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A infectividade foi aferida com a utilização de microscopia óptica, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de $p < 0,05$.

5.3 O tratamento de monócitos humanos CD14⁺ com antagonistas do receptor B₁ e B₂ de cininas ou com o fármaco captopril não altera a expressão da enzima iNOS em indivíduos chagásicos com diferentes formas clínicas da doença.

A atividade tripanocida dos macrófagos é mediada pelo óxido nítrico gerado pela ação da NO sintase. Foi objetivo deste trabalho, avaliar se os receptores de cinina e captopril atuam na expressão da enzima iNOS pelos monócitos CD14⁺ infectados ou não pelo *T. cruzi*. As células dos diferentes grupos de estudo foram submetidas ao tratamento com antagonista dos receptores B₁ e B₂ de cinina, captopril e somente meio.

Avaliando-se cada grupo separadamente, observou-se que no grupo no grupo FCI, o tratamento com captopril aumentou a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ em relação ao tratamento com os antagonistas B9430 e B9958, na presença do parasito (figura 6A). Já no grupo CND, a frequência de monócitos CD14⁺ expressando a enzima iNOS foi maior após o tratamento com o antagonista B9430 em relação ao tratamento com captopril e com o antagonista HOE-140, na presença de *T. cruzi*. Já na ausência do parasito, o tratamento com o antagonista HOE-140 reduziu a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ em relação ao tratamento com meio. Também observou-se que a infecção pelo *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ no tratamento com o antagonista HOE-140 (figura 6B). No grupo CD, observou-se que o tratamento com captopril reduziu a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ em relação ao tratamento com meio, na presença do parasito (figura 6C), além disso, a infecção aumentou a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ no tratamento com meio (figura 6C).

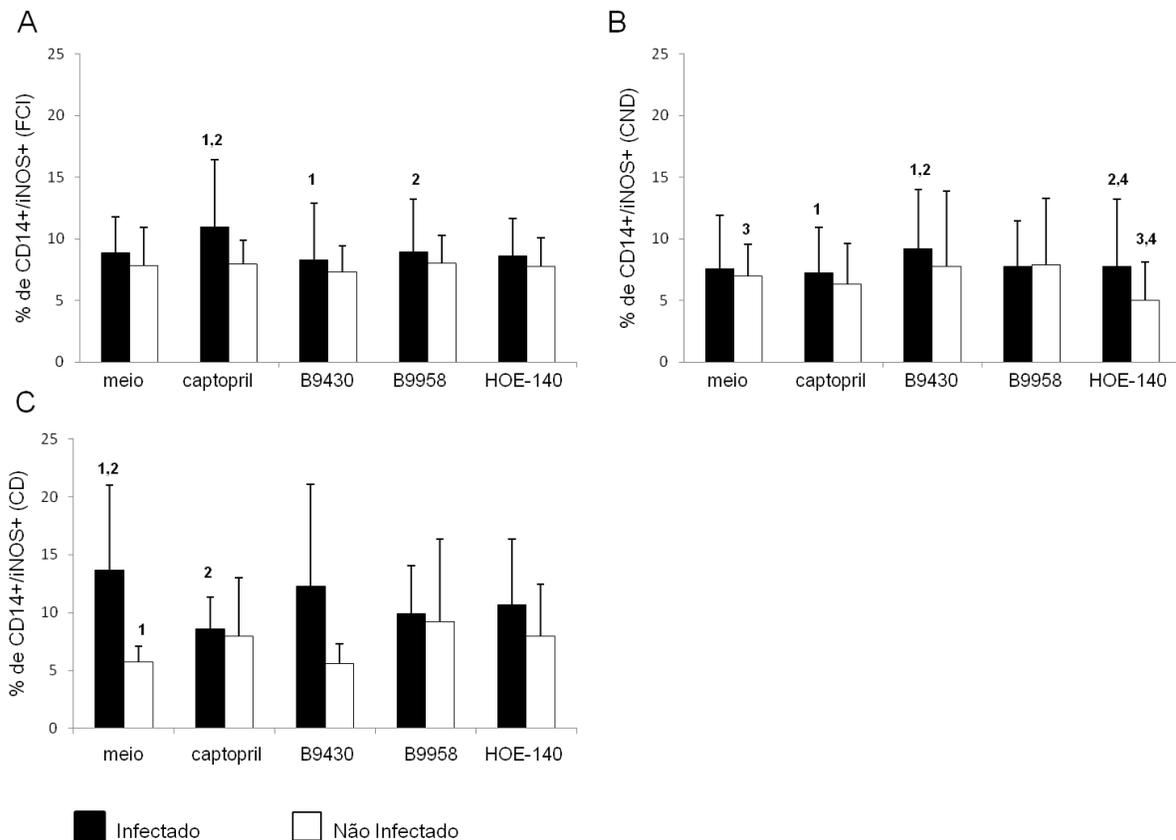


FIGURA 6: Expressão da molécula iNOS por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T. cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-iNOS acoplados ao fluorocromo FITC e anti-CD14 acoplados ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio ou foram tratadas captopril (Cap), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430), antagonista do receptor B₁ (B9958) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (n=6) (A), com cardiopatia não dilatada (n=7) (B), e com cardiopatia dilatada (n=6) (C). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

Comparou-se também, a frequência de monócitos CD14/iNOS⁺ entre os diferentes grupos de pacientes chagásicos dentro de cada tratamento. A frequência de células CD14/iNOS⁺ não foi estatisticamente diferente entre os grupos com formas clínicas distintas, após infecção com *T. cruzi*, independentemente do tratamento (figura 7). Em indivíduos com cardiopatia dilatada, a infecção com *T. cruzi* levou a uma maior expressão de iNOS por monócitos (figura 7A).

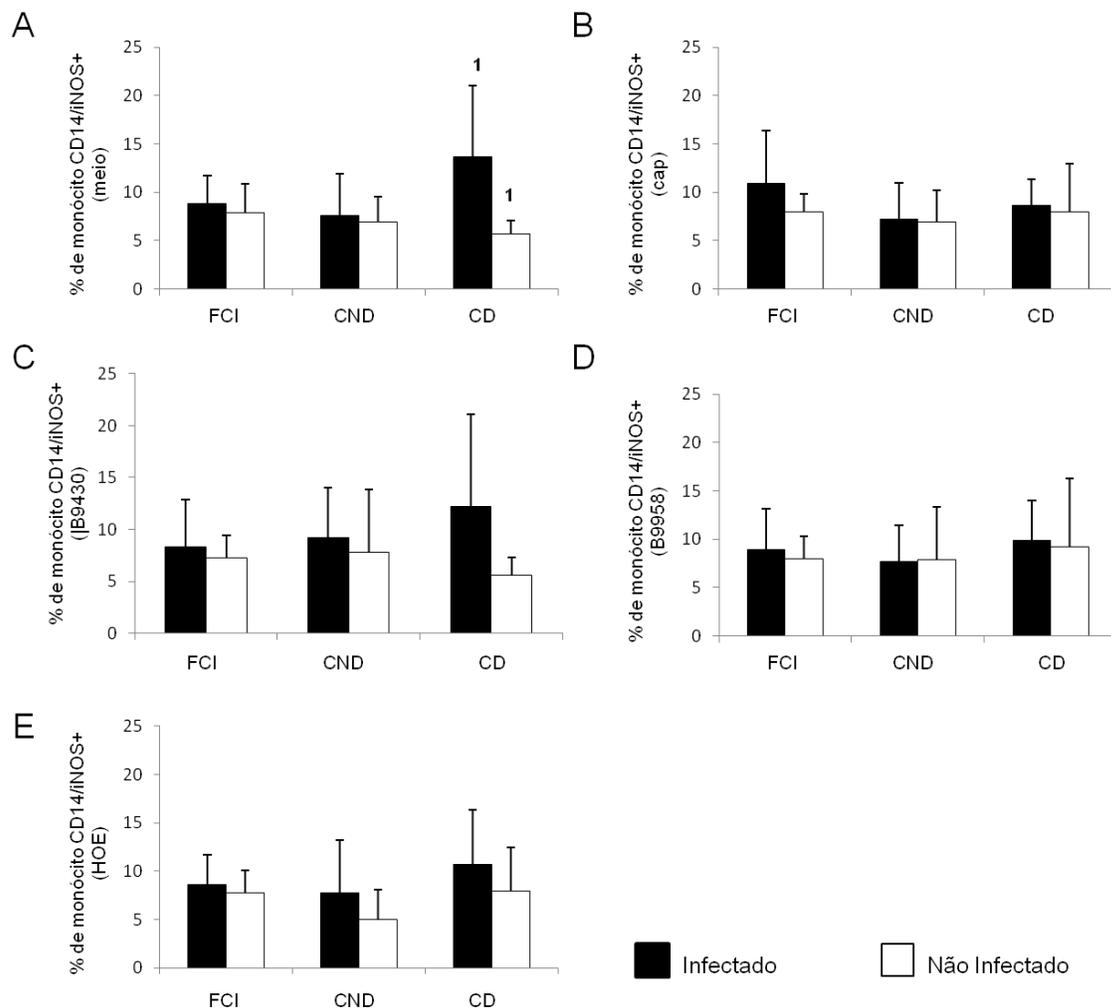


FIGURA 7: Expressão da molécula iNOS por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi* entre os diferentes grupos de pacientes chagásicos. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-iNOS acoplados ao fluorocromo FITC e anti-CD14 acoplados ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada (n=6), com cardiopatia não dilatada (n=7), e com cardiopatia dilatada (n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

5.4 O tratamento de monócitos humanos CD14⁺ com antagonistas do receptor B₁ e B₂ de cininas ou com o fármaco captopril induz alterações da expressão de moléculas importantes para a ativação e função efetora destas células em indivíduos chagásicos com diferentes formas clínicas da doença e em indivíduos não chagásicos.

A infecção de monócitos pelo parasito *T. cruzi* da cepa Y é uma etapa importante para o desenvolvimento da resposta imune na doença de Chagas. Visto que as cininas parecem atuar neste processo, avaliou-se também o papel destes peptídeos e do fármaco captopril na expressão de moléculas importantes para a ativação e a função efetora dos monócitos. Foi avaliada a expressão de HLA-DR, CD80, CD86 e das citocinas IL-12, IL10 e TNF- α pelos monócitos de pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença e de indivíduos não chagásicos.

Em indivíduos não infectados, a frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ não foi diferente independentemente da presença do parasito, em nenhum dos tratamentos aplicados. A frequência de monócitos CD14/CD80⁺ foi aumentada após o tratamento com o antagonista HOE-140 comparando-se ao tratamento com captopril, na presença de *T. cruzi* (tabela 1). Já na ausência do parasito, o tratamento com o antagonista B9430 reduziu a frequência de células CD14/CD80⁺ comparando-se ao tratamento com captopril. Além disso, a infecção por *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos CD14/CD80⁺, mas somente na presença de HOE 140. Quanto à expressão da molécula coestimulatória CD86, o antagonista B9958 aumentou a frequência de células CD14/CD86⁺ comparando-se ao tratamento com captopril e ao tratamento com antagonista B9430, na presença de *T. cruzi* (tabela 1). Foi observada uma redução da frequência de monócitos CD14/CD86⁺ após a infecção com *T. cruzi* nos tratamentos com meio, captopril e HOE. Em relação à expressão de citocinas pelos monócitos

de indivíduos não chagásicos, os tratamentos não alteraram a frequência de monócitos produtores de IL-12, tanto na presença quanto na ausência do *T. cruzi*. Quanto à expressão de IL-10, o tratamento com o antagonista B9958 reduziu a frequência de monócitos produtores de IL-10 em relação ao tratamento com o antagonista B9430, e houve uma tendência de ser diferente também em relação ao tratamento com captopril ($p=0,058$), na ausência do *T. cruzi* (tabela 1). Observou-se também alteração na expressão da citocina TNF- α , onde o tratamento com o antagonista HOE-140 aumentou a frequência de monócitos produtores de TNF- α em relação ao tratamento com captopril, isto se deu na presença do parasito (tabela 1). A frequência de monócitos produtores de IL-10 e TNF- α foi aumentada após a infecção com *T. cruzi* em todos os tratamentos. O mesmo resultado foi observado para IL-12, excetuando-se quando as células foram tratadas com captopril ou com o antagonista B9430.

Nos pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada, observou-se que o tratamento com o antagonista B9430 aumentou a frequência de células CD14/HLA-DR⁺ comparando-se ao tratamento com meio, na presença de *T. cruzi* (tabela 2). Já na ausência do parasito, pode-se observar que os tratamentos com captopril e o antagonista HOE-140 aumentaram a frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ em relação ao tratamento com meio (tabela 2), além disso, o tratamento com captopril induziu maior frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ em relação ao tratamento com o antagonista B9430 e tendeu a ser diferente também do tratamento com B9958 ($p=0,06$). No tratamento com meio e com captopril, a infecção com *T. cruzi* reduziu a frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ (tabela 2). Os tratamentos com captopril e o antagonista HOE-140 aumentaram a frequência de monócitos CD14/CD80⁺ em relação ao tratamento com meio, na ausência do *T. cruzi*, e o tratamento com captopril, na presença do parasito, reduziu a frequência de monócitos CD14/CD80⁺ (tabela 2). Com relação às citocinas, observou-se que, na presença do parasito, o tratamento com

antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-10, comparando-se ao tratamento com meio e que o tratamento com antagonista HOE-140 tendeu a induzir o aumento desta população celular também em relação ao tratamento com meio ($p=0,056$) (tabela 2). De um modo geral, a infecção com *T. cruzi* aumenta a frequência de monócitos produtores de IL-12, IL-10 e TNF- α , independentemente do tratamento aplicado.

Tabela 1: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14⁺ de indivíduos não chagásicos.

| | | % de CD14/HLA-DR+ | % de CD14/CD80+ | % de CD14/CD86+ | % de CD14/IL-12+ | % de CD14/IL-10+ | % de CD14/TNF- α + |
|-----------|---------------|----------------------|---|--|--|---|---|
| Meio | Infectado | 69,37 \pm 14,72 | 38,11 \pm 10,34 | 58,41\pm12,41² | 9,95\pm2,59⁵ | 4,75\pm1,43⁸ | 8,02\pm5,66¹³ |
| | Não Infectado | 78,36 \pm 7,39 | 32,92 \pm 13,03 | 76,17\pm9,04² | 5,34\pm2,89⁵ | 2,17\pm1,0⁸ | 3,8\pm3,08¹³ |
| Captopril | Infectado | 69,48 \pm 18,91 | 35,92\pm7,44^a | 57,69\pm9,57^{c3} | 8,68 \pm 4,01 | 4,39\pm1,59⁹ | 8,22\pm5,0^{f14} |
| | Não Infectado | 75,21 \pm 3,61 | 34,49\pm13,07^b | 76,04\pm10,50³ | 6,15 \pm 3,29 | 2,8\pm1,33⁹ | 5,27\pm4,97¹⁴ |
| B9430 | Infectado | 69,49 \pm 15,64 | 41,34\pm9,77 | 60,66\pm12,89^d | 10,21 \pm 4,9 | 4,89\pm1,6¹⁰ | 9,95\pm3,9¹⁵ |
| | Não Infectado | 75,04 \pm 11,62 | 30,24\pm11,41^b | 71,61 \pm 15,69 | 6,77 \pm 2,02 | 2,81\pm1,17^{e10} | 6,23\pm4,92¹⁵ |
| B9958 | Infectado | 68,95 \pm 16,73 | 40,75 \pm 10,88 | 68,58\pm11,44^{cd} | 11,63\pm5,88⁶ | 4,26\pm2,09¹¹ | 8,68\pm5,23¹⁶ |
| | Não Infectado | 77,75 \pm 9,08 | 26,67 \pm 16,09 | 74,69 \pm 13,43 | 6,05\pm2,92⁶ | 1,95\pm1,1^{e11} | 4,48\pm2,83¹⁶ |
| HOE-140 | Infectado | 71,04 \pm 17,72 | 41,31\pm7,77^{a1} | 63,55\pm14,69⁴ | 10,94\pm4,17⁷ | 4,36\pm0,6¹² | 9,92\pm3,58^{f17} |
| | Não Infectado | 79,01 \pm 8,09 | 32,75\pm11,84¹ | 78,02\pm8,43⁴ | 5,81\pm2,27⁷ | 2,22\pm1,4¹² | 5,3\pm3,8¹⁷ |

CMSP de seis indivíduos não chagásicos foram duplo marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-HLA-DR, CD80, CD86, IL12, IL-10 ou TNF- α acoplados ao fluorocromo PE e analisadas por citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Letras idênticas indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e números idênticos indicam diferença estatisticamente significativa entre a condição infectada e não infectada, sendo o valor de $P < 0,05$.

Nos pacientes chagásicos com a forma clínica cardíaca não dilatada, de um modo geral, a infecção com *T. cruzi* levou a uma diminuição da frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ em todos os tratamentos, excetuando-se quando as células foram tratadas com captopril. Em relação à expressão de CD80, o tratamento com captopril aumentou a

Tabela 2: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos com a **forma clínica indeterminada**

| | | % de CD14/HLA-DR ⁺ | % de CD14/CD80 ⁺ | % de CD14/CD86 ⁺ | % de CD14/IL-12 ⁺ | % de CD14/IL-10 ⁺ | % de CD14/TNF- α ⁺ |
|-----------|---------------|---|--|--------------------------------|--|--|---|
| Meio | Infectado | <u>55,52\pm4,93^{a1}</u> | 33,6 \pm 5,59 | 57,49 \pm 5,4 | <u>18,43\pm5,84⁴</u> | <u>14,52\pm7,99^{h9}</u> | <u>17,99\pm8,3¹⁴</u> |
| | Não Infectado | <u>68,05\pm9,24^{bc1}</u> | <u>33,27\pm13,04^{fg}</u> | 68,83 \pm 13,71 | <u>1,2\pm0,86⁴</u> | <u>1,95\pm1,5⁹</u> | <u>3,65\pm2,09¹⁴</u> |
| Captopril | Infectado | <u>61,5\pm8,55²</u> | <u>36,04\pm8,16^e</u> | 60,27 \pm 9,42 | <u>19,04\pm8,87⁵</u> | <u>16,38\pm6,77¹⁰</u> | <u>17,44\pm5,58¹⁵</u> |
| | Não Infectado | <u>75,94\pm10,91^{bd2}</u> | <u>43,91\pm8,48^f</u> | 64,75 \pm 32,99 | <u>0,76\pm0,65⁵</u> | <u>1,69\pm1,24¹⁰</u> | <u>2,69\pm1,33¹⁵</u> |
| B9430 | Infectado | <u>63,85\pm4,52^a</u> | <u>40,41\pm7,43^e</u> | 55,7 \pm 26,54 | <u>11,79\pm6,86⁶</u> | <u>12,58\pm7,8¹¹</u> | <u>13,63\pm8,14¹⁶</u> |
| | Não Infectado | <u>72,42\pm12,5^d</u> | 37,02 \pm 7,65 | 75,33 \pm 10,6 | <u>0,74\pm0,72⁶</u> | <u>2,63\pm2,34¹¹</u> | <u>3,3\pm2,63¹⁶</u> |
| B9958 | Infectado | 61,67 \pm 19,58 | 38,8 \pm 4,34 | 61,63 \pm 4,92 | <u>17,4\pm4,41⁷</u> | <u>16,96\pm7,36^{h12}</u> | <u>16,75\pm5,9¹⁷</u> |
| | Não Infectado | 70,15 \pm 13,06 | <u>39,96\pm6,89^g</u> | 74,68 \pm 10,58 | <u>1\pm0,71⁷</u> | <u>1,8\pm1,04¹²</u> | <u>3,54\pm1,61¹⁷</u> |
| HOE-140 | Infectado | 61,86 \pm 9,8 | <u>39,97\pm3,34³</u> | 63,52 \pm 4,8 | <u>16,35\pm4,33⁸</u> | <u>19,12\pm8,75¹³</u> | <u>16,44\pm6,82¹⁸</u> |
| | Não Infectado | <u>73,73\pm11,5^c</u> | <u>32,89\pm9,82³</u> | 69,14 \pm 10,23 | <u>0,61\pm0,51⁸</u> | <u>1,72\pm1,48¹³</u> | <u>3,05\pm1,4¹⁸</u> |

CMSP de seis pacientes com a forma clínica indeterminada foram duplo marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-HLA-DR, CD80, CD86, IL12, IL-10 ou TNF- α acoplados ao fluorocromo PE e analisadas por citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Letras idênticas indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e números idênticos indicam diferença estatisticamente significativa entre a condição infectada e não infectada, sendo o valor de $P < 0,05$.

frequência de células CD14/CD80⁺ comparando-se ao tratamento com meio e ao tratamento com o antagonista B9430; além disso, o tratamento com o antagonista B9430 aumenta a frequência de células CD14/CD80⁺ comparando-se ao tratamento com meio, estas

alterações ocorrem na presença de *T. cruzi* (tabela 3). A infecção com *T. cruzi* associada ao tratamento com HOE 140 levou a um aumento da frequência de monócitos CD14/CD80⁺. O tratamento com captopril também aumentou a frequência de células CD14/CD86⁺ em relação ao tratamento com meio, na presença de *T. cruzi* (tabela 3). De um modo geral, a infecção com *T. cruzi* levou a um aumento da frequência de monócitos CD14/CD86⁺. A frequência de monócitos produtores da citocina IL-12 neste grupo foi aumentada pelo tratamento com o antagonista B9430 em relação ao tratamento com meio e ao tratamento com o antagonista HOE-140. Além disso, o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ em relação ao tratamento com o antagonista HOE-140, todas estas alterações foram observadas na ausência de *T. cruzi* (tabela 3). De um modo geral, a infecção com *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-12, IL-10 e TNF- α , independentemente do tratamento aplicado.

Nos pacientes chagásicos com a forma clínica cardíaca dilatada, observou-se que o tratamento com o antagonista HOE ou com o antagonista B9430 aumentou a frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ em relação ao tratamento com o meio, na presença do parasito (tabela 4). A frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ na presença do *T. cruzi* e tratados com captopril foi menor do que na ausência do parasito. Observou-se também que o tratamento com captopril ou com os diferentes antagonistas dos receptores de bradicinina reduziu a frequência de células CD14/CD80⁺ comparando-se ao tratamento com meio e ao antagonista B9430, na ausência de *T. cruzi* (tabela 4). A presença do parasito levou a um aumento da frequência de monócitos CD14/CD80⁺ em relação à ausência de *T. cruzi* nos tratamentos com captopril, B9958 e HOE 140. Enquanto a expressão da molécula CD86, o tratamento com o antagonista HOE aumentou a frequência de células CD14/CD86⁺ em relação ao tratamento com o antagonista B9430 e ao tratamento com meio, na presença de *T. cruzi* (tabela 4). A

Tabela 3: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos com a forma clínica **cardíaca não dilatada**.

| | | % de CD14/HLA-DR+ | % de CD14/CD80+ | % de CD14/CD86+ | % de CD14/IL-12+ | % de CD14/IL-10+ | % de CD14/TNF- α + |
|-----------|---------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Meio | Infestado | <u>51,78±4,93¹</u> | <u>25,98±17,18^{ab}</u> | <u>51,44±10,75^{d6}</u> | <u>11,47±7,43¹⁰</u> | <u>6,32±1,73¹⁵</u> | <u>19,16±11,45²⁰</u> |
| | Não Infestado | <u>64,25±12,82¹</u> | 26,21±12,06 | <u>68,91±11,29⁶</u> | <u>2,5±2,41^{e10}</u> | <u>0,91±0,54¹⁵</u> | <u>2,13±0,82²⁰</u> |
| Captopril | Infestado | 59,65±14,94 | <u>39,99±14,37^{ac}</u> | <u>58,81±14,12^d</u> | <u>11,1±6,66¹¹</u> | <u>6,77±2,93¹⁶</u> | <u>20,03±11,12²¹</u> |
| | Não Infestado | 75,94±10,91 | 43,91±8,48 | 64,75±32,99 | <u>2,44±2,78¹¹</u> | <u>1,19±1,23¹⁶</u> | <u>2,59±1,13²¹</u> |
| B9430 | Infestado | <u>57,09±12,17²</u> | <u>35,58±11,94^{bc}</u> | <u>57,47±12,91⁷</u> | <u>11,45±5,85¹²</u> | <u>6,99±1,51¹⁷</u> | <u>19,24±9,61²²</u> |
| | Não Infestado | <u>68,84±14,63²</u> | 27,12±9,71 | <u>68,95±14,08⁷</u> | <u>3,5±2,3^{ef12}</u> | <u>1,66±1,56¹⁷</u> | <u>2,62±2,11²²</u> |
| B9958 | Infestado | <u>53,59±13,35³</u> | 34,40±13,81 | <u>53,5±10,83⁸</u> | <u>12,76±7,07¹³</u> | <u>7,69±3,24¹⁸</u> | <u>20,45±11,43²³</u> |
| | Não Infestado | <u>70,1±12,41³</u> | 29,73±11,3 | <u>64,3±12,26⁸</u> | <u>2,82±2,16⁹¹³</u> | <u>1,8±1,03¹⁸</u> | <u>2,87±1,81²³</u> |
| HOE-140 | Infestado | <u>53,43±25,74⁴</u> | <u>34,64±11,33⁵</u> | <u>57,75±16,06⁹</u> | <u>12,15±5,93¹⁴</u> | <u>7,08±2,18¹⁹</u> | <u>20,69±11,65²⁴</u> |
| | Não Infestado | <u>60,65±29,06⁴</u> | <u>25,29±12,67⁵</u> | <u>69,8±12,33⁹</u> | <u>1,94±1,73^{fg14}</u> | <u>1,42±2,03¹⁹</u> | <u>2,76±2,39²⁴</u> |

CMSP de seis pacientes com a forma clínica cardíaca não dilatada foram duplo marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-HLA-DR, CD80, CD86, IL12, IL-10 ou TNF- α acoplados ao fluorocromo PE e analisadas por citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Letras idênticas indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e números idênticos indicam diferença estatisticamente significativa entre a condição infectada e não infectada, sendo o valor de $P < 0,05$.

presença do parasito levou a um aumento da frequência de monócitos CD14/CD86⁺ em relação a ausência de *T. cruzi* nos tratamentos com captopril, B9430. Observou-se também que alguns tratamentos alteraram a expressão de citocinas. O tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de células CD14/IL-12⁺ comparando-se ao meio, na ausência de *T. cruzi* (tabela 4). O tratamento com o antagonista B9430 reduziu a frequência de monócitos produtores de IL-10 comparado ao tratamento com o antagonista B9958 e ao tratamento com captopril; além disso, houve uma tendência de reduzir esta população celular em relação ao tratamento com o antagonista HOE-140 ($p = 0,058$), na presença de *T. cruzi* (tabela 4).

Observou-se também que o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-10 comparando-se ao tratamento com meio, na presença do parasito (tabela 4). O tratamento com captopril aumentou a frequência de monócitos produtores de TNF em relação ao tratamento com meio ou ao tratamento com o antagonista B9958, na presença de *T. cruzi* e na ausência do parasito, captopril induziu o aumento desta população celular em relação ao tratamento com o antagonista B9430 (tabela 4). Observou-se que a infecção com *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-12, IL-10 e TNF- α independentemente do tratamento aplicado em comparação à ausência do parasito.

Tabela 4: Análise da expressão de HLA-DR, CD80, CD86, e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos com a forma clínica **cardíaca dilatada**.

| | | % de CD14/HLA-DR+ | % de CD14/CD80+ | % de CD14/CD86+ | % de CD14/IL-12+ | % de CD14/IL-10+ | % de CD14/TNF- α + |
|-----------|---------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Meio | Infectado | <u>60,42±11,4^{ab}</u> | 37±7,63 | <u>57,32±10,09^{g5}</u> | 11,49±8,65 ⁸ | <u>9,12±3,05^{l13}</u> | <u>14,12±3,76ⁿ¹⁸</u> |
| | Não Infectado | 65,76±10,78 | <u>38,37±7,42^{cdef}</u> | 72,98±3,1 ⁵ | <u>0,78±0,47ⁱ⁸</u> | 2,33±1,35 ¹³ | 2,73±1,08 ¹⁸ |
| Captopril | Infectado | <u>64,07±9,84¹</u> | 39,14±5,34 ² | 64,66±6,79 ⁶ | 13,12±5,11 ⁹ | <u>10,17±1,73^{m14}</u> | <u>17,07±3,82^{ho19}</u> |
| | Não Infectado | <u>77,27±13,45¹</u> | <u>26,86±13,49^{c2}</u> | 77,06±13,08 ⁶ | 0,98±0,69 ⁹ | 1,33±1,49 ¹⁴ | <u>3,55±1,23^{p19}</u> |
| B9430 | Infectado | <u>64,89±8,91^a</u> | 37,18±16,61 | <u>61,42±11,52^{h7}</u> | 11,77±6,28 ¹⁰ | <u>6,79±2,57^{jm15}</u> | 12,44±5,76 ²⁰ |
| | Não Infectado | 68,84±8,83 | <u>32,31±5,53^d</u> | 76,44±13,17 ⁷ | 1,18±0,8 ¹⁰ | 1,88±0,72 ¹⁵ | <u>2,33±0,46^{p20}</u> |
| B9958 | Infectado | 60,71±10,79 | <u>39,69±9,94³</u> | 61,09±12,75 | <u>13,05±5,4¹¹</u> | <u>11,13±3,4^{jl16}</u> | <u>13,99±2,93^{o21}</u> |
| | Não Infectado | 67,49±8,16 | <u>31,76±9,56^{e3}</u> | 64,3±12,26 | <u>0,99±0,38ⁱ¹¹</u> | 1,65±1,03 ¹⁶ | 2,1±0,96 ²¹ |
| HOE-140 | Infectado | <u>66,95±11,99^b</u> | 42,17±3,36 ⁴ | <u>64,92±9,5^{hg}</u> | 12,94±6,99 ¹² | 10,23±3,7 ¹⁷ | 14,06±3,88 ²² |
| | Não Infectado | 70±7,1 | <u>25,21±12,5^{f4}</u> | 60,94±30,30 | 0,77±0,61 ¹² | 2,42±1,97 ¹⁷ | 2,97±1,37 ²² |

CMSP de seis pacientes com a forma clínica cardíaca dilatada foram duplo marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-HLA-DR, CD80, CD86, IL12, IL-10 ou TNF- α acoplados ao fluorocromo PE e analisadas por citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. Letras idênticas indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e números idênticos indicam diferença estatisticamente significativa entre a condição infectada e não infectada, sendo o valor de $P < 0,05$.

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da infecção de monócitos na expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, da molécula de ativação HLA-DR e das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α . Observou-se que a frequência de monócitos CD14/HLA-DR⁺ foi reduzida pela infecção nos grupos de pacientes chagásicos CND (tabela 3) e FCI (tabela 2) em relação à ausência do parasito. No grupo FCI, a alteração ocorreu somente na condição sem tratamento e após o tratamento com captopril. A intensidade de expressão de HLA-DR por monócitos CD14⁺ também foi reduzida pela infecção no grupo de indivíduos não chagásicos (dados não mostrados). Nosso trabalho mostrou que a infecção pelo *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos CD14/CD80⁺ no grupo CD em relação a condição sem o parasito (tabela 4). Nos grupos NC, FCI e CND foi observado o aumento desta população celular, após a infecção pelo *T. cruzi*, somente após o tratamento com o antagonista HOE 140 (tabelas 1, 2 e 3). A infecção pelo *T. cruzi* também reduziu a frequência de monócitos CD14/CD86⁺ nos grupos NC, CND e CD em relação à condição sem parasito (tabela 1, 3 e 4). A intensidade de expressão de CD86 por monócitos CD14⁺ também foi reduzida com a infecção pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos (dados não mostrados). A expressão das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos foi significativamente maior após a infecção pelo *T. cruzi* nos grupos de pacientes chagásicos e no grupo de indivíduos não chagásicos (tabelas 1, 2, 3 e 4).

A infecção de monócitos pelo *T. cruzi* parece participar da modulação da expressão de moléculas importantes para o desenvolvimento da resposta imune e para o processo de erradicação do parasito.

5.5 Análise da expressão de moléculas importantes para a ativação e para a função efetora de monócitos entre indivíduos chagásicos com diferentes formas clínicas da doença e entre indivíduos não chagásicos.

Além de compararmos o efeito dos diferentes tratamentos, comparamos também a frequência de monócitos expressando as moléculas HLA-DR, CD80, CD86 e as citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α entre os diferentes grupos estudados.

A frequência de monócitos CD14⁺ expressando HLA-DR foi maior nos indivíduos não chagásicos do que nos três grupos de indivíduos chagásicos, na ausência do parasito. Na presença do parasito, a frequência de monócitos CD14⁺ expressando HLA-DR foi maior nos indivíduos não chagásicos em relação aos indivíduos chagásicos FCI e CND (figura 8A). Ainda na condição sem tratamento, a intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺, na ausência do parasito, também foi maior no grupo NC do que nos três grupos de indivíduos chagásicos (figura 8B). Entre os pacientes chagásicos, o grupo CD apresentou intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ menor do que o grupo FCI, na condição sem tratamento e na ausência do parasito (figura 8B). A frequência de monócitos CD14⁺ expressando HLA-DR foi similar entre os diferentes grupos e a intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ foi maior no grupo NC do que nos três grupos de indivíduos chagásicos no tratamento com captopril, tanto na presença como na ausência do parasito (figura 8C e 8D). Entre os pacientes chagásicos, o grupo CD apresentou intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ menor do que os grupos FCI e CND no tratamento com captopril e na ausência do parasito (figura 8D). A frequência de monócitos CD14⁺ expressando HLA-DR foi similar entre os diferentes grupos e a intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ foi maior no grupo NC do que nos três grupos

de indivíduos chagásicos no tratamento com o antagonista B9430 (figura 8E e 8F). Entre os pacientes chagásicos, o grupo CD apresentou intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ menor do que os grupos FCI e CND com o antagonista B9430 e na ausência do parasito (figura 8F). A frequência de monócitos CD14⁺ expressando HLA-DR foi similar entre os diferentes grupos e a intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ foi maior no grupo NC do que nos três grupos de indivíduos chagásicos nos tratamentos com os antagonistas B9958 (figura 8G e 8H) e com HOE (figura 8I e 8J), sendo que estas diferenças foram observadas tanto na presença quanto na ausência do parasito.

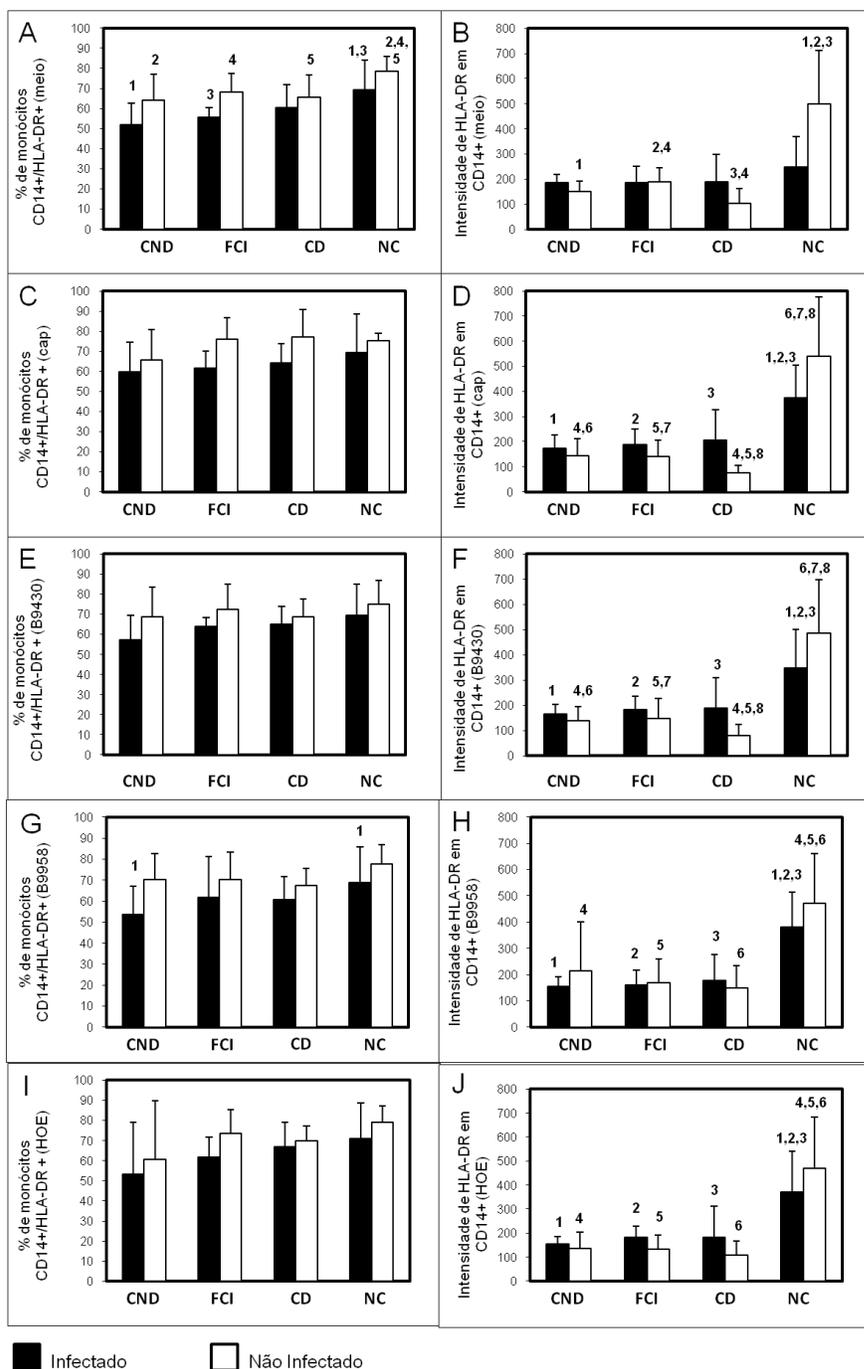


FIGURA 8: Expressão e intensidade de expressão da molécula de ativação HLA-DR por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-HLA-DR acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A,B), captopril (Cap) (C,D), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (E,F), antagonista do receptor B₁ (B9958) (G,H) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (I,J). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

A frequência de monócitos CD14⁺ expressando a molécula coestimulatória CD80 e a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos foi similar entre os diferentes grupos estudados na condição sem tratamento (figura 9A e 9B). No tratamento com captopril, a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 foi maior no grupo FCI em relação aos grupos CND e CD (figura 9C) e a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos foi similar entre os diferentes grupos estudados (figura 9D). No tratamento com o antagonista B9430, a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 foi menor no grupo CND em relação ao grupo FCI (figura 9E) e a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos foi similar entre os diferentes grupos estudados (figura 9F). No tratamento com o antagonista B9958 a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 foi menor no grupo CND em relação ao grupo FCI (figura 9G) e a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos foi menor no grupo CD em relação aos grupos CND e NC (figura 9H). No tratamento com o antagonista HOE a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 foi similar entre os grupos estudados (figura 9I), já a intensidade de expressão de CD80 pelos monócitos foi menor no grupo CD em relação aos grupos NC, sendo que houve uma tendência a esta diferença em relação ao grupo CND (P=0,057) (figura 9J). As diferenças mostradas na figura 9 foram observadas somente na ausência do parasito.

A frequência de monócitos expressando a molécula coestimulatória CD86 e a intensidade de expressão desta molécula pelos monócitos CD14 não mostrou nenhuma diferença, estatisticamente significativa, entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas e os indivíduos não chagásicos (figura 10).

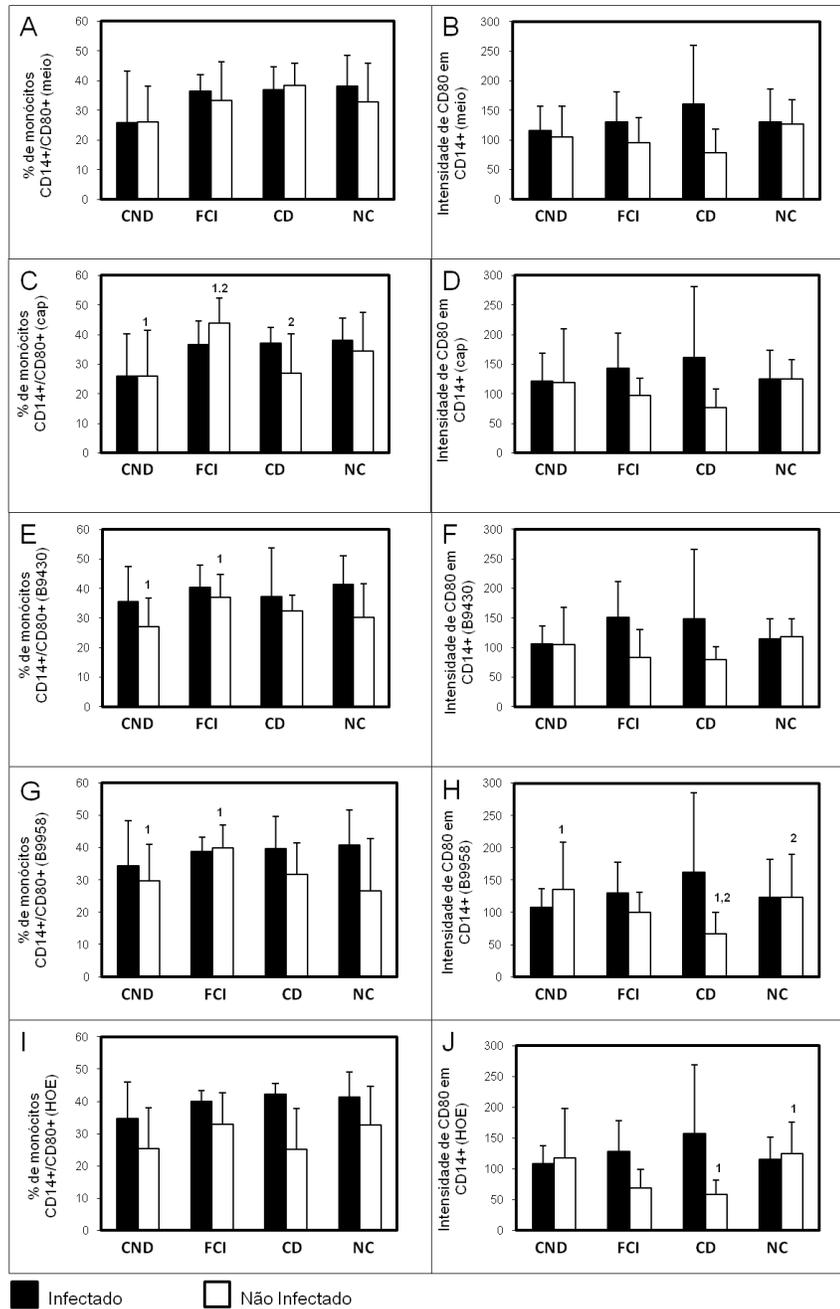


FIGURA 9: Expressão e intensidade de expressão da molécula da molécula coestimulatória CD80 por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T. cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-CD80 acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A,B), captopril (Cap) (C,D), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (E,F), antagonista do receptor B₁ (B9958) (G,H) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (I,J). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

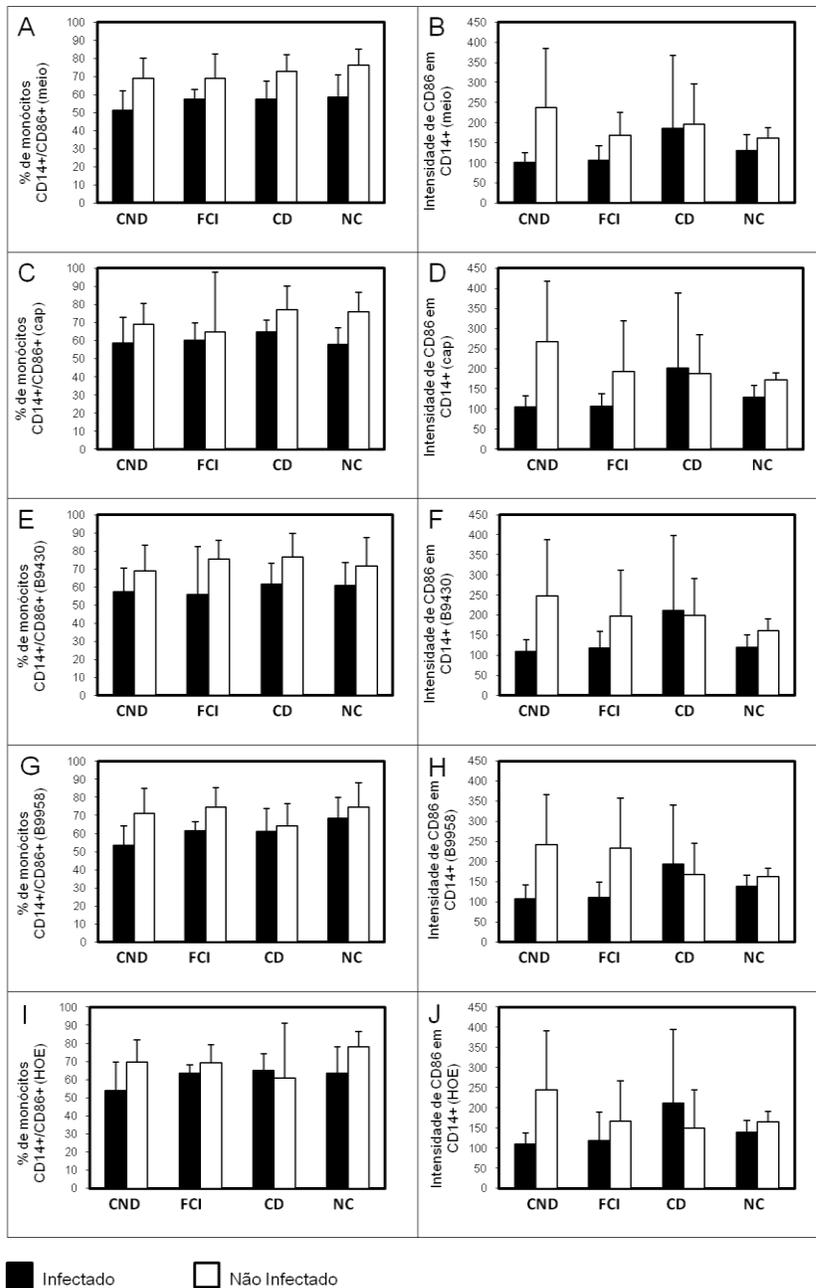


FIGURA 10: Expressão e intensidade de expressão da molécula da molécula coestimulatória CD86 por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e anti-CD86 acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A,B), captopril (Cap) (C,D), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (E,F), antagonista do receptor B₁ (B9958) (G,H) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (I,J). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

As citocinas são moléculas efetoras na resposta imune, sendo capazes de intensificar ou modular negativamente a resposta de vários tipos celulares. Neste estudo, avaliou-se a expressão das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α por monócitos CD14⁺. A interleucina 12 tem um papel crucial na ativação de monócitos e na produção de citocinas pró-inflamatórias durante a resposta imune adaptativa. Já a interleucina 10 atua na modulação da resposta imune pela supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de ativação e coestimulatórias. A citocina TNF- α está associada à atividade microbicida do macrófago e é uma citocina importante na doença de Chagas.

Avaliando-se a expressão destas citocinas entre os diferentes grupos estudados, observou-se que, na ausência de *T. cruzi*, a frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ foi maior no grupo NC em relação aos grupos de pacientes chagásicos FCI e CD na condição sem tratamento (figura 11A). O grupo CND apresentou maior frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ do que o grupo CD, também na ausência do parasito (figura 11A). Já na presença do parasito, observou-se que a frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ foi maior no grupo de chagásicos FCI do que no grupo NC na condição sem tratamento (figura 11A). A frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ foi maior no grupo de NC em relação aos três grupos de pacientes chagásicos nos tratamentos com captopril e na ausência do parasito (figura 11B). Já na presença do parasito, observou-se que a frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ foi maior no grupo de chagásicos FCI em relação aos grupos CND e NC e maior no grupo CD em relação ao grupo NC (figura 11B). (figura 11B). A frequência de monócitos CD14/IL-12⁺ foi maior no grupo de NC em relação aos três grupos de pacientes chagásicos nos tratamentos com os antagonistas B9430 (figura 11C), B9958 (figura 11D) e HOE (figura 11E), na ausência do parasito. Já na presença do parasito, observou-se que a frequência de monócitos CD14/IL-12⁺

foi maior no grupo FCI em relação ao grupo indivíduos não chagásicos nos tratamentos com os antagonistas B9958 (figura 11D) e HOE (figura 11E).

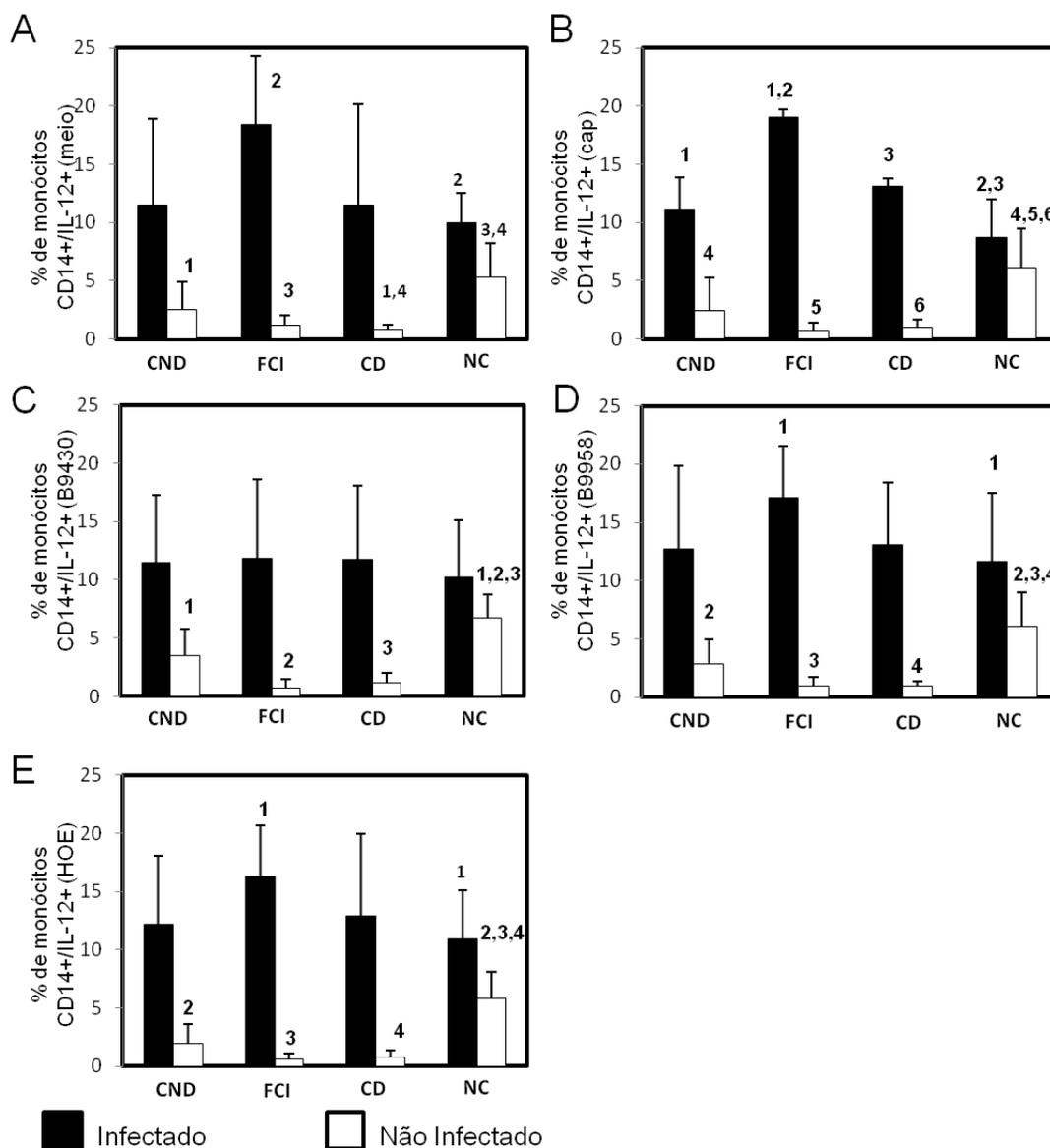


FIGURA 11: Frequência de monócitos CD14⁺ produtores da citocina IL-12 infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-IL-12 acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), ou antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

A frequência de monócitos produtores de IL-10 na condição sem tratamento foi menor no grupo NC do que nos três grupos de pacientes chagásicos, na presença do parasito (figura 12A). Além disso, o grupo FCI apresentou maior frequência de monócitos produtores de IL-10 em relação ao grupo CND (figura 12A). Também na presença do parasito, a frequência de monócitos produtores de IL-10 foi menor no grupo NC em relação aos três grupos de pacientes chagásicos no tratamento com captopril (figura 12B) e com os antagonistas B9430 (figura 12C), B9958 (figura 12D) e HOE (figura 12E). Os resultados mostram que, na presença do parasito, os pacientes chagásicos do grupo FCI apresentaram maior frequência de monócitos produtores de IL-10 do que os pacientes chagásicos dos grupos CND e CD, estas diferenças foram observadas nos tratamentos com captopril (figura 12B) e com os antagonistas B9430 (figura 12C), B9958 (figura 12D) e HOE (figura 12E). Na ausência do parasito, não foi observada nenhuma diferença na frequência de monócitos produtores de IL-10 entre os diferentes grupos estudados.

A frequência de monócitos produtores de TNF- α , na presença do parasito, também foi menor nos indivíduos não chagásicos em relação aos pacientes chagásicos dos três grupos. Estas diferenças foram observadas na condição sem tratamento (figura 13A) e nos tratamentos com captopril (figura 13B) e com os antagonistas B9958 (figura 13D) e HOE (figura 13E). No tratamento com o antagonista B9430 a diferença foi somente em relação ao grupo CND (figura 13C). Na ausência do parasito, não foi observada nenhuma diferença na frequência de monócitos produtores de TNF- α entre os diferentes grupos estudados.

Avaliou-se também a expressão das citocinas IL-12, IL-10 e TNF- α dentro da população de monócitos CD14⁺. Esta análise mostrou que, no grupo CND, o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a expressão de IL-12 por monócitos CD14⁺ em relação aos tratamentos com captopril ou com o antagonista B9430, na presença do T. cruzi. Já na

ausência do parasita, o tratamento com o antagonista B9430 reduziu a expressão de IL-12 por esta população celular (figura 14A). No grupo FCI e CD, a expressão de IL-12 por monócitos CD14⁺ foi similar entre os diferentes tratamentos (figura 14B e 14C). No grupo NC, observou-se que o tratamento com os antagonistas dos receptores de bradicinina aumentaram a expressão de IL-12 pelos monócitos CD14⁺ na presença do parasito (figura 14D).

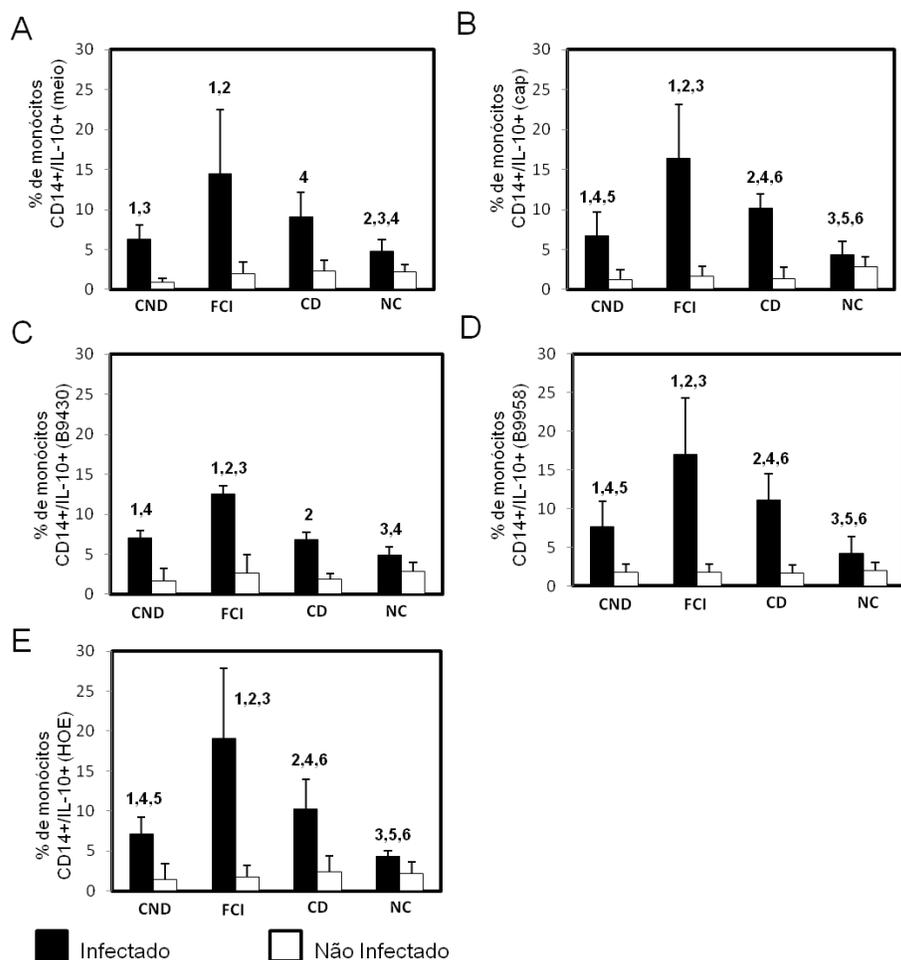


FIGURA 12: Frequência de monócitos CD14⁺ produtores da citocina IL-10 infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-IL-10 acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

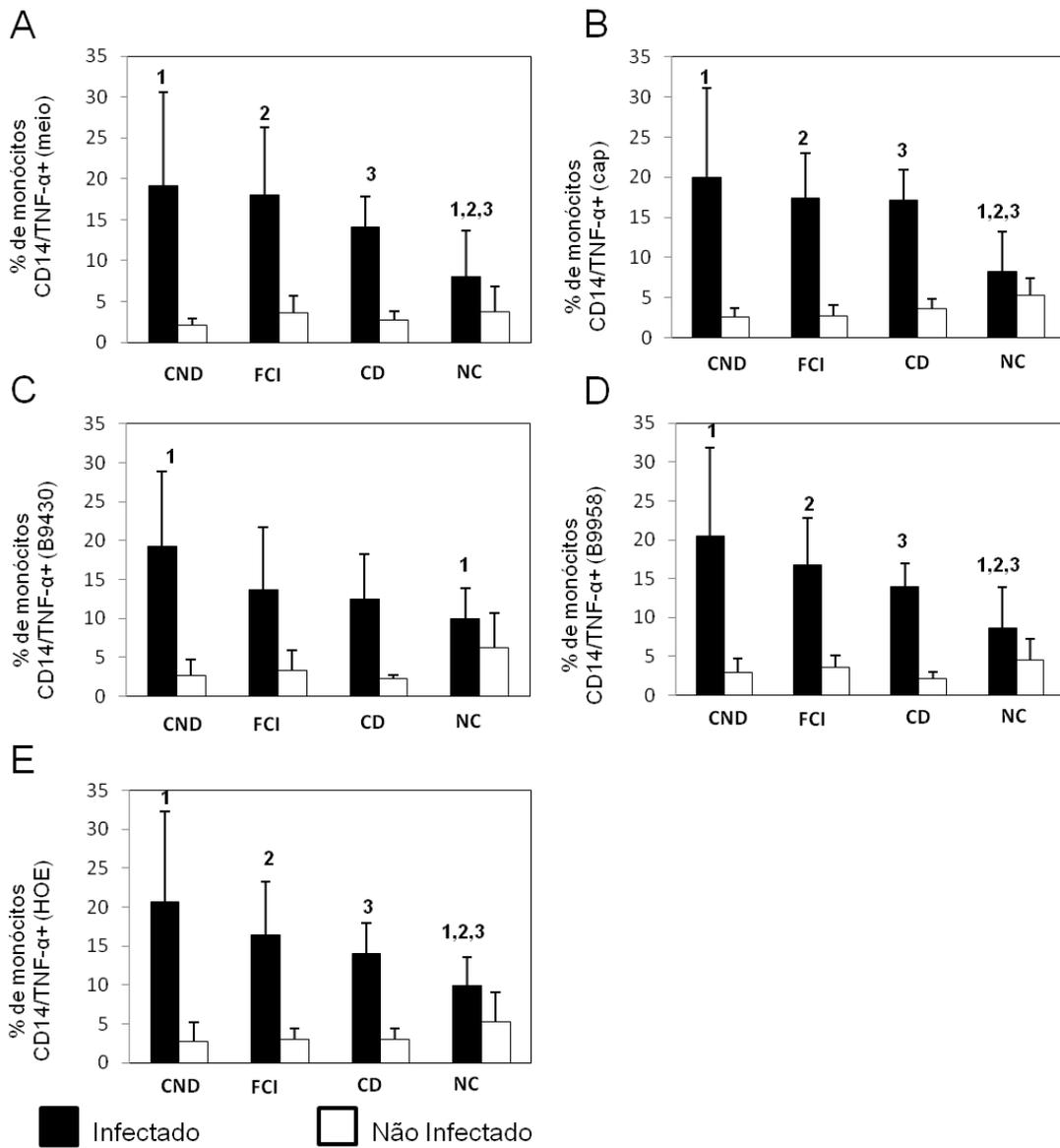


FIGURA 13: Frequência de monócitos CD14+ produtores da citocina TNF- α infectados ou não por *T. cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-TNF- α acoplado ao fluorocromo PE. As células receberam somente meio (A), captopril (Cap) (B), antagonista do receptor B₁ e B₂ simultaneamente (B9430) (C), antagonista do receptor B₁ (B9958) (D) ou antagonista do receptor B₂ (HOE-140) (E). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de $p < 0,05$.

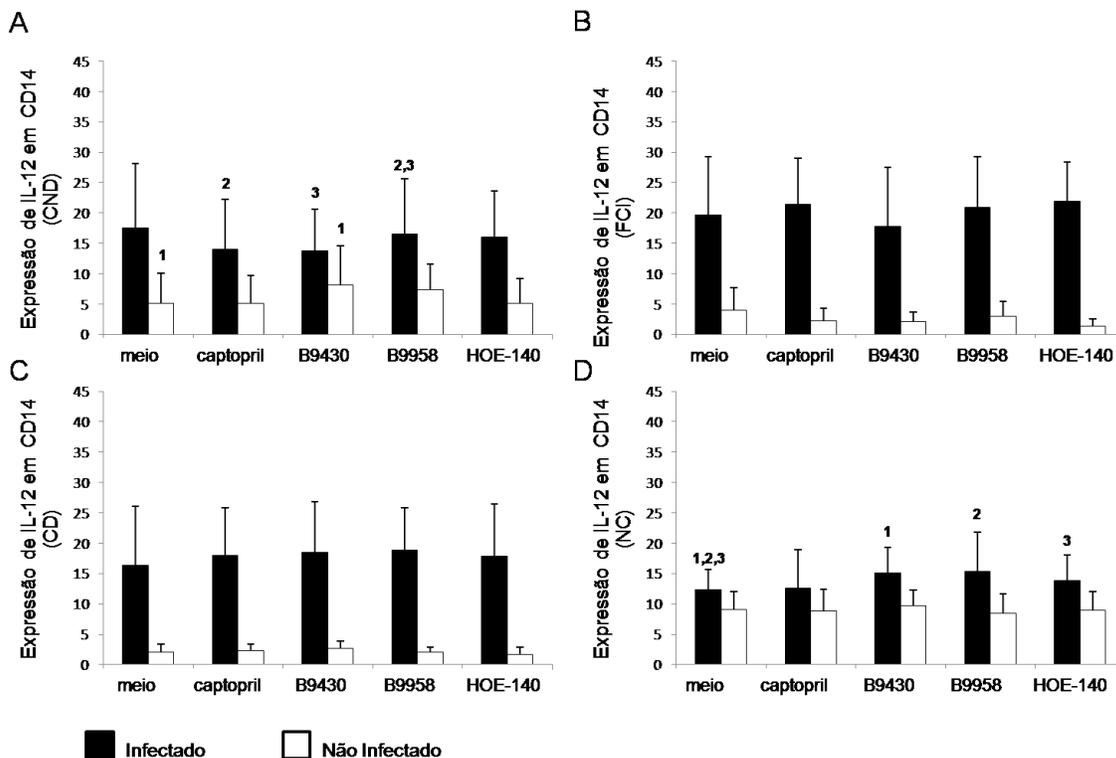


FIGURA 14: Expressão da citocina IL-12 por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluocromo FITC e com anti-IL-12 acoplado ao fluocromo PE. Imediatamente antes da infecção, as células receberam somente meio, captopril, antagonista de B₁R/ B₂R (B9430), antagonista de B₁R (B9958) ou antagonista de B₂R (HOE 140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7) (A), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6) (B), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) (C) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6) (D). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

No grupo CND, o tratamento com o antagonista B9430 aumentou a expressão de IL-10 por monócitos CD14⁺ em relação ao tratamento com captopril ou com o antagonista HOE-140, na ausência de *T. cruzi* (figura 15A). No grupo FCI, o tratamento com os antagonistas B9958 ou HOE-140 aumentaram a expressão de IL-10 pelos monócitos CD14⁺ em relação ao tratamento com meio, na presença do parasito (figura 15B). Já no grupo dos CD, tratamento com o antagonista HOE-140 aumentou a expressão de IL-10 pelos monócitos CD14⁺ em relação aos tratamentos com meio, com o antagonista B9430 e com o antagonista HOE-140,

na ausência do parasito (figura 15C). No grupo NC, o tratamento com captopril reduziu a expressão de IL-10 pelos monócitos CD14+ em relação ao tratamento com meio, na presença do parasito; já na ausência do parasito, o tratamento com captopril aumentou a expressão de IL-10 pelos monócitos CD14+ em relação ao tratamento com B9958 (figura 15D).

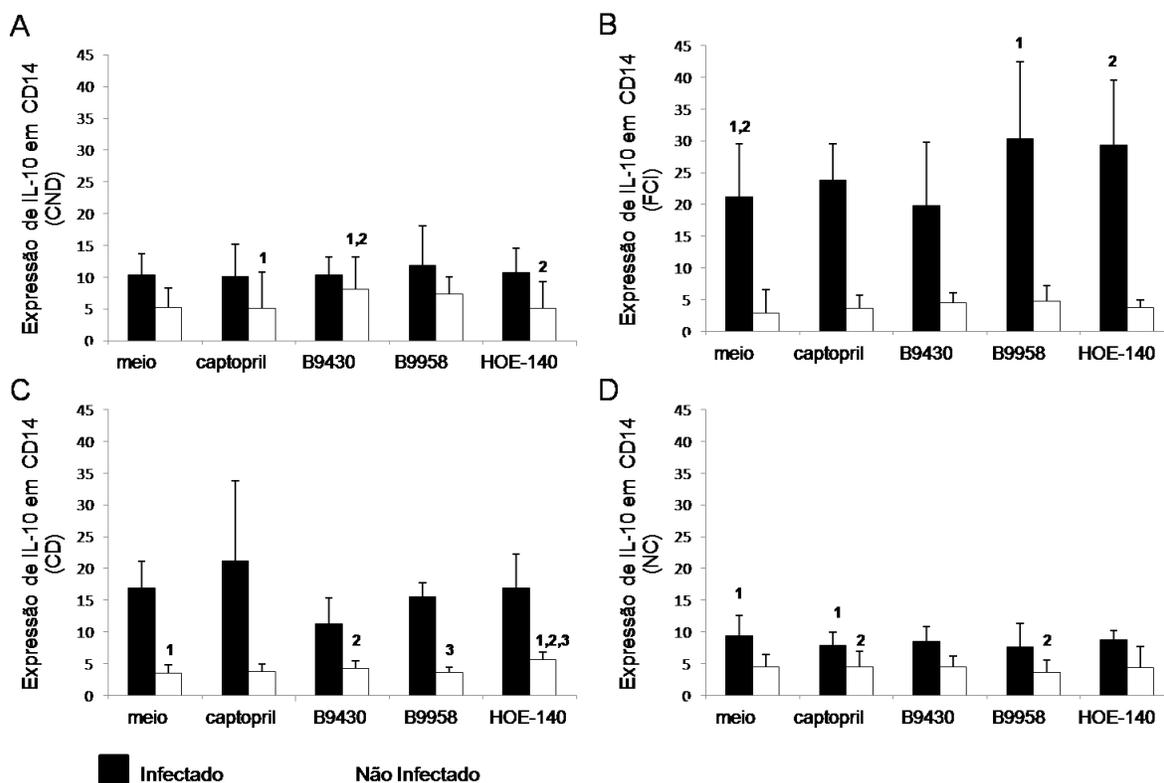


FIGURA 15: Expressão da citocina IL-10 por monócitos CD14+ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-IL-10 acoplado ao fluorocromo PE. Imediatamente antes da infecção, as células receberam somente meio, captopril, antagonista de B₁R/ B₂R (B9430), antagonista de B₁R (B9958) ou antagonista de B₂R (HOE 140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7) (A), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6) (B), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) (C) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6) (D). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

A análise da expressão da citocina TNF- α pela população de monócito CD14⁺ mostrou que esta citocina foi aumentada pelo tratamento com o antagonista HOE-140 em relação ao

tratamento com captopril e com o antagonista B9430, na presença do parasito. Este resultado foi observado no grupo CND (figura 16A). No grupo FCI, o tratamento com o antagonista HOE-140 aumentou a expressão de TNF- α pela população de monócito CD14⁺ em relação ao tratamento com o antagonista B9430, na presença do parasito (figura 16B). E no grupo CD, foi o captopril que aumentou a expressão de TNF- α pela população de monócito CD14⁺ em relação ao tratamento com meio e com o antagonista B9958, também na presença do parasito (figura 16C).

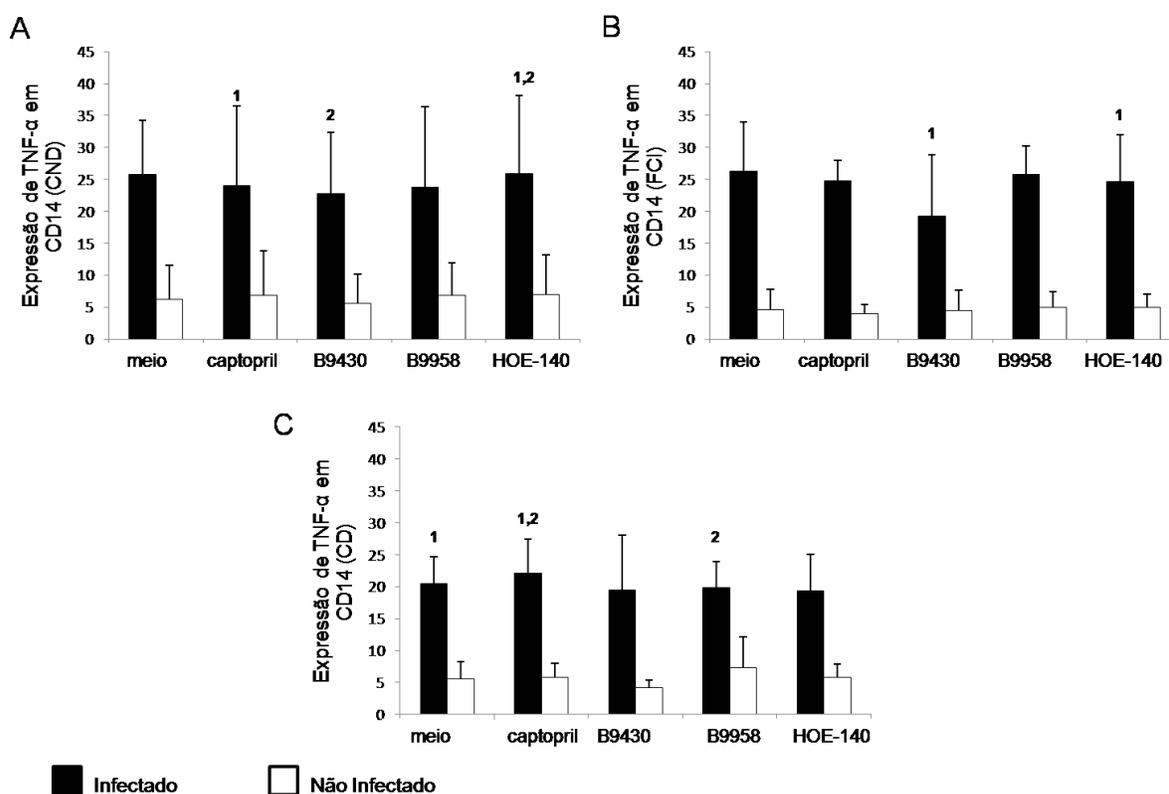


FIGURA 16: Expressão da citocina TNF- α por monócitos CD14⁺ infectados ou não por *T.cruzi*. As CMSP foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD14 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-TNF- α acoplado ao fluorocromo PE. Imediatamente antes da infecção, as células receberam somente meio, captopril, antagonista de B₁R/ B₂R (B9430), antagonista de B₁R (B9958) ou antagonista de B₂R (HOE 140). Os grupos estudados compreendem pacientes chagásicos com cardiopatia não dilatada (CND/n=7) (A), com a forma clínica indeterminada (FCI/n=6) (B), com cardiopatia dilatada (CD/n=6) (C) e indivíduos não chagásicos (NC/n=6) (D). A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

ANÁLISES NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS:

As células apresentadoras de antígenos, tais como os monócitos, fagocitam o parasito e o processam, a fim de apresentar os seus antígenos para as células da imunidade adaptativa. Observamos nos dados acima que o captopril e a via das cininas parecem modular a ativação e a função efetora dos monócitos.

Considerando-se que captopril é comumente administrado a pacientes chagásicos hipertensos e não se sabe se ele pode ter algum efeito nocivo ao paciente, esta parte deste estudo focaliza a avaliação do papel de captopril na resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos não chagásicos frente à estimulação com o parasito *T. cruzi*.

5.6 O tratamento de linfócitos humanos CD4⁺ e CD8⁺ com o fármaco captopril altera a expressão da enzima conversora de angiotensina (CD143)

Avaliou-se o efeito de captopril na expressão de ECA pelos subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Sabe-se que este fármaco é muito utilizado por pacientes com cardiomiopatia chagásica que sofrem de hipertensão arterial e que captopril impede a rápida degradação de cininas pela inibição da enzima ECA, a qual está presente na membrana de vários tipos celulares inclusive das de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Nosso trabalho mostrou que a presença do *T. cruzi* induziu um aumento da frequência de linfócitos T CD4/CD143⁺ e o aumento desta população celular é ainda maior com captopril (figura 17A). Já a frequência da população CD8/CD143⁺ não foi alterada com a presença do parasito nem com o tratamento com captopril (figura 17B).

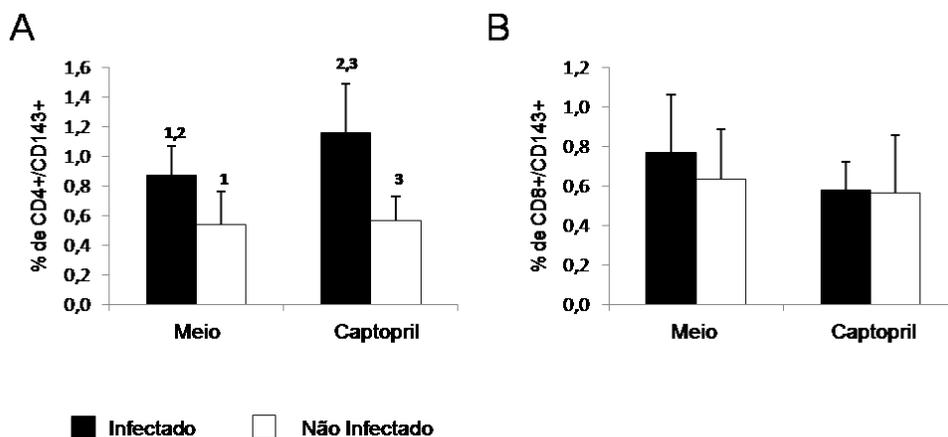


FIGURA 17: Expressão da molécula CD143 por linfócitos CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) na presença ou ausência do parasito *T.cruzi*. As CMSP de seis indivíduos não chagásicos foram separadas e marcadas com anticorpos anti-CD143 acoplados ao fluocromo PE, com anti-CD4 acoplados ao fluocromo FITC e com anti-CD8 acoplados ao fluocromo CY. As células foram tratadas com meio ou captopril. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatística, sendo o valor de p<0,05.

5.7 O tratamento de linfócitos humanos CD4⁺ e CD8⁺ com o fármaco captopril altera a expressão da molécula de ativação HLA-DR

O sucesso da resposta imune a um agente infeccioso depende da ativação e proliferação de células imuno competentes. É sabido que linfócitos ativados expressam em sua superfície várias moléculas associadas aos processos de ativação, dentre elas, a molécula HLA-DR. Nossos estudos mostraram que o tratamento com captopril, na presença de *T. cruzi*, aumentou a frequência de linfócitos T CD4/HLA-DR⁺ (figura 18A) e a expressão de HLA-DR por esta população celular (figura 18B) em relação ao tratamento com meio e com o antagonista HOE-140; além disso, na presença de *T. cruzi*, o tratamento com captopril aumentou a frequência de linfócitos T CD4/HLA-DR⁺ e a expressão de HLA-DR por linfócitos CD4⁺ em relação à células não infectadas (figura 18A e 18B). O tratamento com captopril e com o antagonista HOE-140 reduziu a frequência de linfócitos CD8/HLA-DR⁺

comparando-se ao tratamento com meio, na ausência do parasito (figura 18C). Observou-se também que o tratamento com captopril reduziu a frequência de linfócitos CD8/HLA-DR⁺ comparando-se ao tratamento com o antagonista HOE-140, na presença do parasito (figura 18C). Ainda na figura 18C, observou-se que a presença do *T. cruzi* reduziu a frequência de linfócitos CD8/HLA-DR⁺ com o tratamento com meio, no entanto aumentou esta população celular no tratamento com antagonista HOE-140. A expressão de HLA-DR pelos linfócitos CD8⁺ foi reduzida pelos tratamentos com o captopril e com o antagonista HOE-140 em relação ao tratamento com meio, na ausência do parasito (figura 18D).

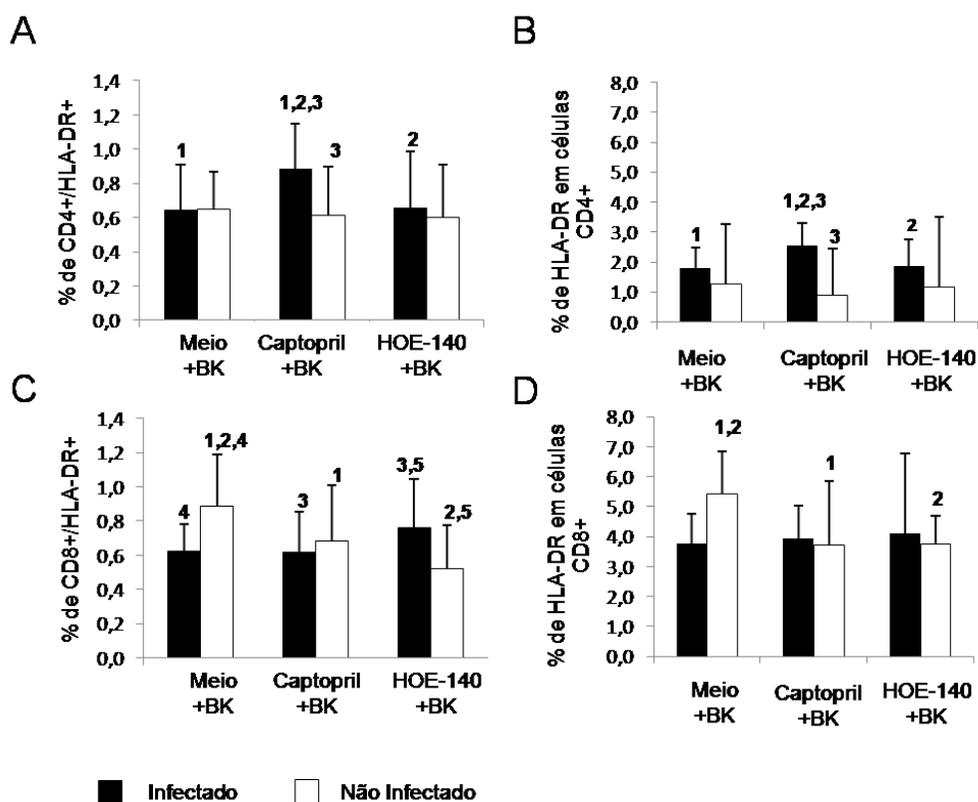


FIGURA 18: Expressão da molécula de ativação HLA-DR por linfócitos CD4⁺ (A e B) e CD8⁺ (C e D) na presença ou ausência do parasito *T. cruzi*. As CMSP de seis indivíduos não chagásicos foram separadas e marcadas com anticorpos anti-HLA-DR acoplados ao fluorocromo PE, com anti-CD4 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-CD8 acoplados ao fluorocromo CY. As células foram tratadas com meio, captopril ou com o antagonista HOE-140, o peptídeo bradicinina foi adicionado em todas as condições citadas anteriormente. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de p<0,05.

5.8 Análise do papel de captopril e do receptor B₂ de bradicinina na expressão de citocinas por linfócitos humanos CD4⁺ e CD8⁺

Avaliou-se, neste trabalho, se o fármaco captopril e as cininas estão envolvidos na expressão de algumas citocinas já descritas como importantes na resposta imune da doença de Chagas. Foi avaliada a expressão de IFN- γ pelos subtipos de linfócito T CD4⁺ e CD8⁺. A população de linfócito CD4/IFN- γ ⁺ foi maior na presença do *T. cruzi* em relação à ausência do parasito, no tratamento com captopril (figura 19A). A expressão de IFN- γ pelos linfócitos CD4⁺ não foi alterada pelos tratamentos nem pela presença do parasito (figura 19B). O tratamento com o antagonista HOE-140 aumentou a frequência de linfócitos CD8/IFN- γ ⁺ comparando-se ao tratamento com captopril, na presença do parasito. Além disso, observou-se que a presença do parasito aumentou a frequência de linfócitos CD8/IFN- γ ⁺ nos tratamentos com meio e com o antagonista HOE-140 (figura 19C). A expressão de IFN- γ pelos linfócitos CD8⁺ foi aumentada pelo tratamento com captopril em relação ao tratamento com o antagonista HOE-140, na ausência do parasito (figura 19D).

Recentemente, um subtipo de célula T produtora de IL-17 (T_H17), diferente das células T_H1 ou T_H2, foi descrita e parece ter um importante papel na indução de injúrias teciduais na autoimunidade. Neste trabalho, avaliou-se se captopril e as cininas estão envolvidos com a expressão de IL-17 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados mostraram que captopril aumentou a expressão de IL-17 por linfócito T CD4⁺ na presença do *T. cruzi*, comparado com HOE-140 (figura 20B). Na condição sem tratamento, a presença do parasito induziu o aumento da frequência de linfócitos CD4/IL-17⁺ (figura 20A). Na população de linfócito T CD8⁺ não foi observada nenhuma alteração na frequência de linfócitos CD8/IL-17⁺ ou da

expressão de IL-17 em células CD8 independentemente do tratamento utilizado ou da infecção (figura 20C e 20D).

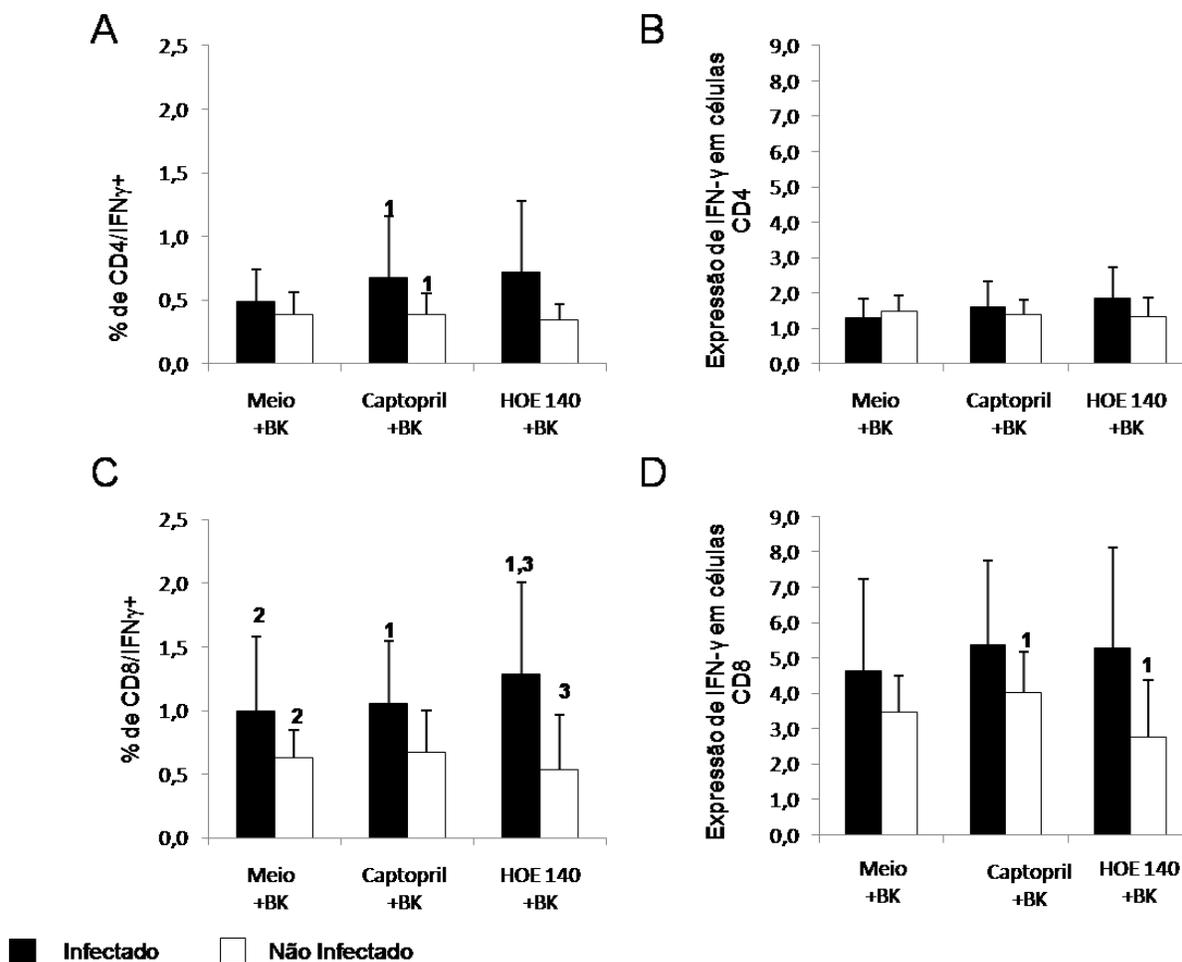


FIGURA 19: Expressão das citocinas IFN- γ por linfócitos CD4⁺ (A e C) e CD8⁺ (B e D) na presença ou ausência do parasito *T.cruzi*. As CMSP de seis indivíduos não chagásicos foram separadas e marcadas com anticorpos anti-IFN- γ acoplados ao fluocromo PE, com anti-CD4 acoplados ao fluocromo FITC e com anti-CD8 acoplados ao fluocromo CY. As células foram tratadas com meio, captopril ou com o antagonista HOE-140, o peptídeo bradicinina foi adicionado em todas as condições citadas anteriormente. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatisticamente significativa, sendo o valor de $p < 0,05$.

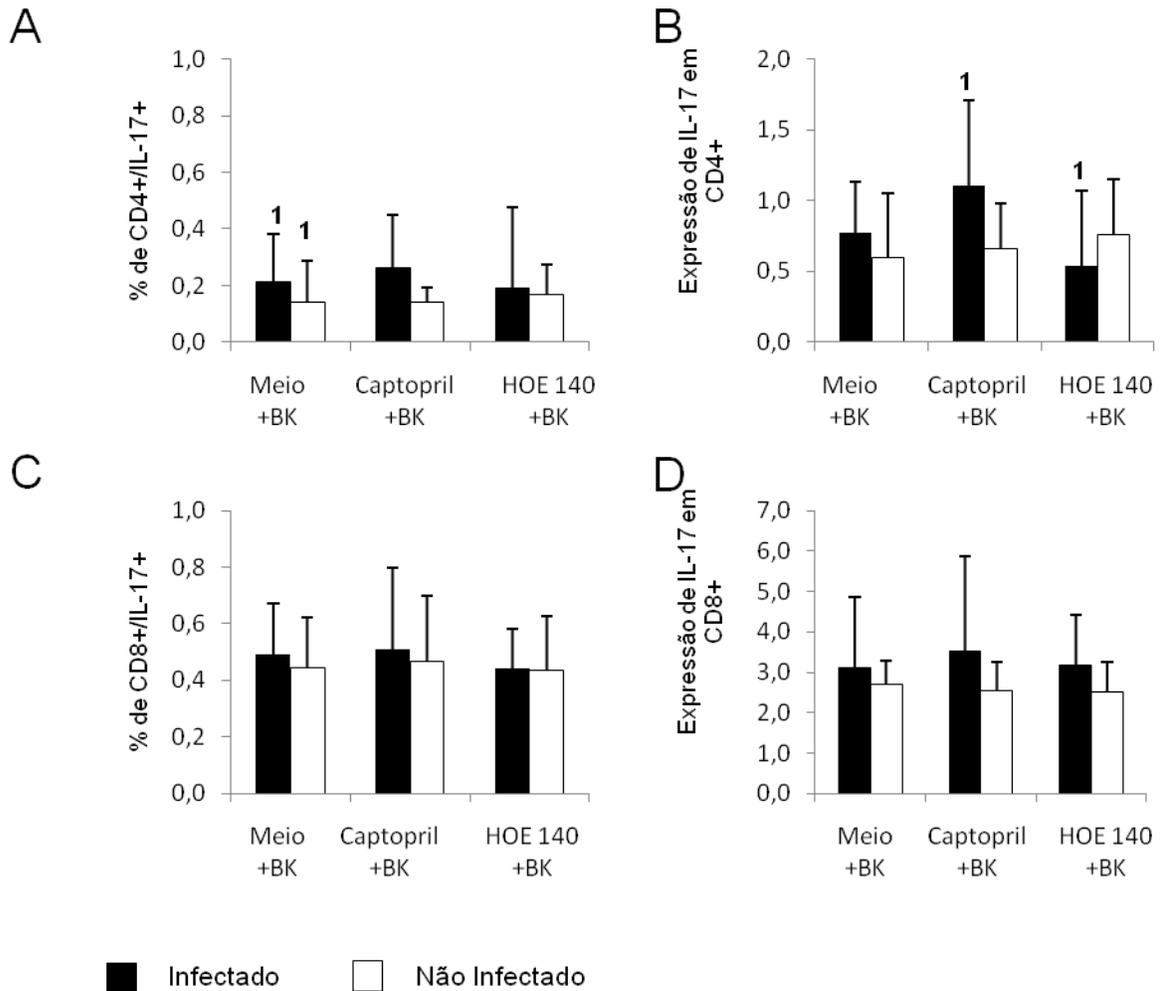


FIGURA 20: Expressão da citocina IL-17 por linfócitos CD4⁺ (A e B) e CD8⁺ (C e D) na presença ou ausência do parasito *T.cruzi*. As CMSP de seis indivíduos não chagásicos foram separadas e marcadas com anticorpos anti-IL-17 acoplados ao fluorocromo PE, com anti-CD4 acoplados ao fluorocromo FITC e com anti-CD8 acoplados ao fluorocromo CY. As células foram tratadas com meio, captopril e com o antagonista HOE-140, o peptídeo bradicinina foi adicionado em todas as condições citadas anteriormente. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados estão representados na forma de média (barras verticais) +/- desvio padrão (linhas verticais sobre as barras de média). Números iguais indicam diferença estatística, sendo o valor de $p < 0,05$.

Também foi avaliada a expressão das citocinas TNF- α e IL-10 pelos subtipos de linfócito T CD4⁺ e CD8⁺, no entanto, a expressão destas citocinas não foi alterada pelos tratamentos nem pela presença do parasito (dado não mostrado).

6. Discussão

A infecção de células pelos tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* é uma etapa crucial para o desenvolvimento da doença de Chagas. No entanto, vários estudos ainda precisam ser realizados para melhor compreensão desta interação parasito-hospedeiro. Definir a via, ou as possíveis vias, de entrada do parasito na célula é fundamental para novos conhecimentos sobre a doença de Chagas e, além disso, possibilita novas estratégias de tratamento. Neste contexto, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para determinar as moléculas envolvidas na aderência e internalização do *T. cruzi* pelas células hospedeiras. No estudo presente, visamos estabelecer qual é a participação dos receptores B₁ e B₂ e do fármaco captopril no processo de infecção de monócitos humanos por tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y.

A infecção de alguns tipos celulares pelo parasito *T. cruzi* tem se mostrado um processo ativo, envolvendo diversos componentes celulares. A forma infectiva do parasito adere a receptores específicos presentes na membrana plasmática da célula alvo. A adesão é mediada por pelo menos dois ligantes do parasito que interagem com moléculas de carboidratos dos receptores expressos na superfície da célula hospedeira. Um dos ligantes é a trans-sialidase, que promove a adesão pela reação com epítopos de ácido siálico, e o outro é a penetrina, que se liga a receptores contendo motivos de sulfato de heparina (Pereira, 1994 e Herrera et al, 1994).

Somente a interação de ligantes do parasito com receptores na célula hospedeira não é o suficiente para levar à infecção. A invasão pelo *T. cruzi* requer a ativação de vias de sinalização específicas, um processo crítico para a entrada do parasito. Uma via de sinalização que parece ser explorada por este parasito para efetuar a invasão de alguns tipos celulares é a via do TGF- β . Estudos mostram que células epiteliais mutantes sem expressão dos receptores I

e II de TGF- β não são permissivas à infecção pelo *T. cruzi*, neste caso, o *T. cruzi* se liga às células epiteliais, mas não consegue penetrá-las. Já quando estas células são transformadas por um plasmídeo contendo o gene para os receptores de TGF- β a infecção acontece, o que confirma a importância da via de sinalização do TGF- β no processo de infecção pelo *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995). No entanto, macrófagos humanos e murinos não sofrem alterações na infecção por *T. cruzi* quando aumenta-se ou bloqueia-se o TGF β disponível para a célula. Isto sugere que esta via de sinalização não é importante para a invasão de células fagocíticas por *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995).

Sabe-se que a concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ é importante para a infecção de vários tipos celulares por diversos parasitos. Em 1996, Wilkowsky e colaboradores mostraram uma mudança da concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ durante a infecção de macrófagos peritoniais de camundongos por tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*. A indução da transição da concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ é exclusiva da forma tripomastigota infectiva, o que é mais um indício de que a sinalização pelo Ca²⁺ é necessária para o processo de infecção. Fibroblastos tratados a fim de se inibir a transição da concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ e expostos ao parasito não são infectados (Tardieux *et al.*, 1994).

Scharfstein e colaboradores, 2000, mostraram transição da concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ em células CHO com alta expressão de B₂R após infecção com tripomastigotas de *T. cruzi*. Esta resposta foi reduzida com a adição de HOE-140, um antagonista seletivo de B₂R (Hock *et al.*, 1991). Isto demonstra um importante papel deste receptor na mudança da concentração intracitoplasmática de Ca²⁺ durante o processo de infecção por *T. cruzi*. Além dos receptores, são necessários os seus ligantes para que ocorra a ativação dos mesmos. Desta forma, a interação de cininas com seus receptores *in vivo* é

determinante para ativação destes receptores, influenciando as funções biológicas em que estão envolvidos.

Os dados do presente trabalho, referentes à figura 3 e 4, sugerem uma participação ativa dos receptores B₁ e B₂ no processo de infecção de monócitos humanos pelo *T. cruzi*. A inibição dos receptores de cinina, em cultura de monócitos, pela administração de antagonistas, tanto B9430 que se liga com alta afinidade em ambos receptores, quanto B9958 que se liga especificamente ao receptor B₁ ou HOE-140, específico para B₂R, levou a uma redução significativa do número de células infectadas pelo *T. cruzi*, comparando-se às culturas que receberam somente meio ou captopril. Este resultado foi observado tanto em indivíduos não chagásicos (figura 3) como em pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença (figura 4), o que reforça a participação dos receptores de cininas no processo de invasão dos monócitos humanos pelo parasito *T. cruzi*. Portanto, estes resultados sugerem que a ativação da via de sinalização das cininas, pela ligação do agonista ao seu receptor, potencializa a infecção de monócitos pelo *T. cruzi*. Como mostrado nas figuras 3 e 4, ambos receptores parecem atuar no processo de infecção. O B₂R é ativado pela ligação de bradicinina ou calidina, enquanto o B₁R é ativado por metabólitos da bradicinina. (Marceau *et al.* 2002; Marceau *et al.*, 1998; Bockmann *et al.*, 1998). Considerando-se que a bradicinina e o seu metabólito são formados sequencialmente e que o macrófago pode coexpressar ambos os receptores (Bockmann and Paegelow, 2000) é provável que estes receptores atuem em conjunto para aumentar a infecção da célula hospedeira pelo *T. cruzi*. Possivelmente, B₂R agiria em períodos iniciais, já que é constitutivamente expresso e ativado pelo primeiro produto da via das cininas, enquanto o B₁R atuaria num período mais tardio, uma vez que ele só é expresso posteriormente e seu ligante é fruto da degradação da bradicinina. Fogel-Petrovic e colaboradores, 2007, mostraram que os receptores de bradicinina são expressos

após 30 minutos da estimulação, portanto, o período de 3 horas de incubação utilizado em nosso trabalho parece ser suficiente para ocorrer a expressão de B₁R.

Observamos que os pacientes chagásicos apresentam maior frequência de monócitos infectados do que os indivíduos não chagásicos (figura 5). Os pacientes com doença de Chagas crônica apresentam parasitos circulantes e no tecido (Mosca *et al*, 1985). Mesmo sendo em baixos níveis, estes permitem um contato constante das células dos pacientes chagásicos com o parasito e/ou antígenos do mesmo, o que provavelmente altera o estado de ativação das células do seu sistema imune, talvez isto explicaria a resposta diferente dos monócitos de pacientes chagásicos frente à infecção com o *T. cruzi* comparado a dos indivíduos que nunca tiveram contato anteriormente com o parasito. Souza e colaboradores, 2004, mostraram que a frequência de monócitos infectados era similar entre indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada e cardíaca, diferentemente do que foi mostrado em nosso trabalho. É importante destacar que a técnica utilizada nos dois trabalhos foi diferente, no trabalho de Souza e colaboradores, 2004, foi mostrada a interação do parasito com os monócitos e não a internalização do parasito como foi mostrado em nosso trabalho.

Não sabemos ao certo qual é o mecanismo que leva à infecção pela via das cininas, no entanto, Vieira e colaboradores, 2002, demonstraram que após o reconhecimento do *T. cruzi* pelo macrófago ocorre ativação da cascata de fosforilação de tirosinas e o recrutamento de fosfatidilinositol 3-cinase levando à transição da concentração intracelular do Ca²⁺. Tardieux e colaboradores, em 1994, mostraram que a mobilização de Ca²⁺ é importante para a entrada do parasito na célula hospedeira. Também ocorre um recrutamento e fusão de lisosomas da periferia celular para próximo ao sítio de adesão do parasito na membrana da célula hospedeira. Este recrutamento é desencadeado pela ligação do *T. cruzi* à célula e é dependente

da mobilização dos estoques intracelulares de cálcio (Rodriguez *et al.*, 1996). A fusão dos lisosomas é essencial para reter os tripomastigotas no interior da célula hospedeira viabilizando a infecção (revisto por Andrade e Andrews, 2005). A necessidade do Ca^{2+} no processo de infecção pelo *T. cruzi* é bem estabelecida por diversos estudos. Sabendo que, a ativação da via de sinalização das cininas induz aumento intracitoplasmático de Ca^{2+} (revisto por Blaukat, 2003) é possível que esta seja uma das vias requeridas pelo parasito para infecção da célula hospedeira. A ativação da via das cininas pode ser mediada pela cruzipaína, uma cisteína proteinase presente no *T. cruzi*, que apresenta função cininogenase (Scharfstein *et al.*, 2000), sendo capaz de clivar o cininogênio, encontrado no plasma ou aderido na membrana da célula alvo (Barbasz e Kozik, 2009; Barbasz *et al.*, 2008), liberando cininas que se ligam aos seus receptores. Mesmo que um dos mecanismos de invasão dos macrófagos pelo *T. cruzi* seja por fagocitose, já que esta célula é um fagócito profissional e foi demonstrado que filamentos de actina são importantes durante a invasão por tripomastigotas (Rosestolato *et al.*, 2002; Viera *et al.*, 2002), ainda assim a via das cininas pode ser importante neste processo, já que foi mostrado que o uso de inibidores da polimerização de actina, em cultura de macrófagos, não inibiu a entrada do *T. cruzi* (Kipnis *et al.*, 1979). A inibição da via das cininas pelo uso dos antagonistas dos receptores de bradicinina também não impediu a infecção dos monócitos, mas somente reduziu o número de células infectadas, portanto, esta seria mais uma via alternativa para a infecção dos monócitos.

Baseado no trabalho de Scharfstein e colaboradores, 2000, esperávamos que o número de monócitos infectados aumentasse com a administração de captopril, uma vez que, este fármaco aumenta os níveis de cininas disponíveis pela inibição de ECA. No entanto, no ensaio de infecção realizado neste trabalho, quando se adicionou captopril ao meio de cultura e comparou-se com a infecção em cultura somente com meio, observamos uma taxa de infecção

similar entre as duas condições (figura 3 e 4). Este resultado não corrobora com o achado de Scharfstein e colaboradores, o que é aceitável, uma vez que os tipos celulares estudados foram diferentes, inclusive a cepa do parasito. No entanto, a intensidade de infecção do monócito é estatisticamente diferente entre as duas condições, o tratamento com captopril aumenta a intensidade de infecção de monócitos humanos pelo parasito *T. cruzi* (dados mostrados no anexo I), corroborando parcialmente com o achado de Scharfstein e colaboradores, 2000. Além de o captopril aumentar a meia vida da cinina, sabe-se que este fármaco é amplamente utilizado no tratamento de hipertensão (Singh *et al.*, 1996), inclusive no tratamento de pacientes chagásicos hipertensos. Logo, estes dados, mostrando que o captopril pode favorecer a infectividade do parasito, apontam para a necessidade de mais estudos que esclareçam a influência do captopril na infectividade pelo *T. cruzi in vivo*. Uma abordagem possível seria a avaliação da parasitemia (através de acompanhamento por hemoculturas) de pacientes chagásicos em uso de captopril. Em tese, o aumento da infectividade levaria a um aumento da população de parasitos que poderia ser identificada pela hemocultura. Outro acompanhamento importante seria relativo à evolução clínica dos pacientes chagásicos em uso do medicamento para determinar se eles, no caso de um aumento de parasitemia, evoluiriam mais rapidamente para formas mais graves. Se este for o caso, o uso deste fármaco como medicação de escolha no tratamento de hipertensão de pacientes chagásicos deve ser reavaliado. Roberti e colaboradores, 1992, mostram que captopril tem um efeito benéfico na liberação de neuro-hormônios com subsequente redução da frequência cardíaca e reduz a incidência de arritmias cardíacas em pacientes com doença de Chagas, mas não são relatados estudos mostrando o papel de captopril na resposta imune da doença Chagas.

Neste trabalho avaliamos a influência do tratamento com os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de bradicinina e com captopril na expressão de moléculas coestimulatórias

e de ativação e de citocinas importantes para a resposta imune na doença de Chagas. No grupo NC, a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 foi aumentada pelo antagonista HOE-140, e houve uma tendência a este aumento pelo antagonista B9430 (p=0,06), em relação ao tratamento com captopril, na presença de *T. cruzi*. Este aumento induzido pelos antagonistas é uma evidência de uma modulação negativa da expressão da molécula CD80, nos monócitos CD14⁺, pelo receptor B₂ de bradicinina; este efeito só foi observado em relação ao tratamento com captopril provavelmente porque este fármaco potencia os efeitos das cininas permitindo-nos a visualizar a ação das mesmas. Como o dado é observado na presença do *T. cruzi*, é provável que a presença deste seja importante para a modulação de CD80 pela via das cininas. É sabido que a cruzipaina, presente na membrana do *T. cruzi*, quebra o cininogênio aderido na membrana de monócitos liberando cininas (Scharfstein *et al.*, 2000 e Barbasz *et al.*, 2008) sendo mais uma fonte do peptídeo, o que justificaria a alteração da expressão de CD80 ter ocorrido somente na presença do parasito. No grupo FCI, observamos que o tratamento com o antagonista B9430 aumentou a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 em relação ao tratamento com captopril quando o parasito estava presente (tabela 2) o que está de acordo com o dado mostrado no grupo NC, mais uma vez indicando a modulação negativa de CD80 pela via das cininas. No grupo CND, observamos que o tratamento com captopril ou com o antagonista B9430 aumentou a frequência de CD14/CD80⁺ em relação ao tratamento com meio, na presença do tripo, e ainda, o tratamento com captopril aumentou esta população celular em relação ao tratamento com antagonista B9430 (tabela 3). Estes dados observados nos grupos NC, FCI e CND sugerem que a via das cininas é importante na modulação negativa da molécula CD80. No entanto, como observado nos grupos FCI e CND, captopril parece modular positivamente a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80. É provável que esta modulação ocorra por uma via distinta da via das

cininas, já que, mesmo potenciando a via das cininas, o captopril apresenta um efeito contrário do sugerido para a via das cininas. No grupo CD, o tratamento com captopril ou com os antagonistas dos receptores de bradicinina reduziu a frequência de monócitos CD14⁺ expressando CD80 em relação ao tratamento com meio, na ausência do parasito (tabela 4). Neste grupo, a ativação da via das cininas parece aumentar a frequência de monócitos expressando CD80, já o captopril parece modular negativamente a expressão desta molécula (tabela 4). Não existem muitos relatos relacionando a via das cininas e captopril com a expressão de moléculas coestimulatórias. Em geral, nossos dados sugerem que, a presença do parasito ativaria a via das cininas que diminuiria a expressão de CD80. Assim, os dados apresentados neste trabalho mostram que a via das cininas parece participar da modulação negativa da expressão de CD80, o que poderia ter consequências no estabelecimento de uma resposta imunológica. A baixa expressão de CD80 diminuiria sua interação com seus ligantes que, sendo CD28, teria como consequência uma redução na ativação celular, sendo CTLA-4, teria como consequência uma menor modulação da resposta celular. Avaliamos também a expressão nos linfócitos de CTLA-4 e CD28, mas não observamos nenhuma alteração na expressão destas moléculas após os diferentes tratamentos (dados não mostrados). Mais estudos sobre o sistema CD80-ligantes são necessários para esclarecer essas hipóteses.

A análise da expressão de CD86 nos revelou que, em pacientes CD, o tratamento com o antagonista HOE aumentou a frequência de monócitos CD14/CD86⁺ comparado ao tratamento com o antagonista B9430 e com meio, na presença de *T. cruzi* (tabela 4). Em indivíduos NC, o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de células CD14/CD86⁺ comparado ao captopril e ao B9430, na presença de *T. cruzi* (tabela 1). Estudos mostram que o tratamento de células dendríticas com bradicinina aumenta a expressão de CD86 por estas células e que a adição do antagonista HOE-140 reduz este efeito (Monteiro *et*

al., 2007). Parece que em monócitos humanos, a ação de HOE-140 é o inverso do observado em células dendríticas, em nosso trabalho há evidências de que tanto B₁R como B₂R reduz a expressão de CD86 em monócitos. Estudos anteriores do nosso grupo (Souza *et al.*, 2004) já haviam mostrado que o parasito reduz a expressão de CD86, especialmente em células de pacientes chagásicos com cardiopatia dilatada. Estudos experimentais também mostraram que a infecção por *T. cruzi* reduz a expressão de CD86 por macrófagos e células dendríticas de camundongos BALB/c (Planelles *et al.*, 2003). Neste trabalho, corroboramos este dado e mostramos que esta modulação ocorre na dependência da ativação da via das cininas: no caso dos cardiopatas, pela ativação de B₂R.

Avaliamos a expressão de HLA-DR, uma molécula de MHC classe II relacionada à apresentação antigênica para linfócitos T CD4⁺, sendo uma importante molécula no processo de ativação destes linfócitos (Todd *et al.*, 1998). HLA-DR é expressa principalmente por APCs e pode ser expressa por linfócitos T ativados. Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o tratamento com o antagonista B9430 aumentou a frequência de células CD14/HLA-DR⁺ comparado ao tratamento com meio, na presença de *T. cruzi*, em pacientes chagásicos FCI e CD (tabela 4), sugerindo que nestes grupos, os receptores de bradicinina podem estar envolvidos na regulação negativa da expressão de HLA-DR mediante a estimulação com o parasito, pois, ao inibir ambos receptores, a expressão desta molécula aumenta. No grupo CD, esta modulação pode ser dada pelo B₂R, já que o uso do antagonista HOE, específico para este receptor, aumentou a frequência de células CD14/HLA-DR⁺ comparado ao tratamento com meio (tabela 4). No grupo FCI, o tratamento com captopril e com o antagonista HOE aumentou a frequência de células CD14/HLA-DR⁺ comparado ao tratamento com meio, na ausência do parasito (tabela 2), sugerindo que o captopril está regulando a expressão de HLA-DR por uma via distinta da via das cininas.

Observamos também que a intensidade de expressão de HLA-DR pelos monócitos CD14⁺ é menor nos pacientes chagásicos do que nos indivíduos não chagásicos, (figura 8). Sabemos que indivíduos chagásicos, mesmo na fase crônica da doença, portam o parasito, ou pelo menos seus antígenos ou DNA (Jones *et al.* 1993; Mortara *et al.*, 1999; Vago *et al.*, 2000), logo, em ambas condições apresentadas em nosso trabalho, infectado e não infectado, os indivíduos chagásicos estão sempre em contato com o parasito ou seu antígeno, o que pode contribuir para a expressão reduzida de HLA-DR por monócitos CD14⁺ observada nos pacientes chagásicos. O fato da infecção com o *T. cruzi* reduzir, significativamente, a intensidade de expressão de HLA-DR nos indivíduos não chagásicos (dados não mostrados) pode contribuir para a veracidade desta hipótese, que mostra que o contato com o parasito realmente reduz a expressão de HLA-DR. Alguns trabalhos mostram que vários parasitos regulam a expressão de moléculas do gene de MHC-II via inibição do fator CIITA, o qual é essencial para a expressão deste gene (Luder *et al.*, 2003 e Chang *et al.*, 1996). Talvez o *T. cruzi* também regule a expressão de HLA-DR pela inibição deste fator.

Foram observadas algumas alterações na expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 e da molécula de ativação HLA-DR induzidas pelos tratamentos realizados neste trabalho. Os dados aqui apresentados apontam evidências de que captopril e os antagonistas dos receptores de bradicinina atuam na regulação de tais moléculas. Vimos que estes reagentes ora estimulam ora inibem a expressão destas moléculas e que o parasito *T. cruzi* contribui para esta regulação. No entanto, estudos mais detalhados de cada molécula devem ser realizados para esclarecer melhor como se dá o controle destas moléculas pela via das cininas e pelo captopril e porque a modulação é diferente nos grupos estudados.

Foi demonstrado por outros autores que a bradicinina induz liberação de prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico de neurônios sensoriais, células endoteliais,

fibroblastos e células do sistema imune (Bhoola *et al.*, 1992). Os receptores B₁ estão envolvidos na liberação de várias interleucinas, peptídeos quimiotáticos e leucotrienos por macrófagos (Tiffany and Burch 1989). O nosso trabalho propôs identificar o papel das cininas na expressão de citocinas importantes para a doença de Chagas.

Existem diferentes grupos de citocinas, sendo um grupo importante na resposta inflamatória e na resposta mediada por células e o outro amplifica a resposta imune humoral e são inibitórios para muitos aspectos da imunidade mediada por células (Howard *et al.*, 1993).

A citocina IL-12 tem um papel crucial na resistência à infecção pelo *T. cruzi* controlando a taxa de parasitos. Camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-12 apresentaram parasitemia e mortalidade aumentada (Aliberti *et al.*, 1996). O nosso trabalho mostrou que o tratamento de monócitos de pacientes CND com o antagonista B9430 aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-12 em relação ao tratamento com meio e com o antagonista HOE-140, e a expressão de IL-12 por monócitos em relação ao tratamento com meio, na ausência do parasito (tabela 3 e figura 14A). No grupo CD, observamos que o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos produtores de IL-12 em relação ao tratamento com meio (tabela 4). Vimos também que no grupo NC o tratamento com os antagonistas dos receptores de cinina aumentaram a expressão de IL-12 pelos monócitos CD14⁺ (figura 14D). Aliberti e colaboradores, 2003, mostraram que a ativação de receptores de cininas em células dendríticas estimula a produção e secreção da IL-12 por estas células, sendo esta resposta dependente de B₂R. No sistema utilizado em nosso trabalho há evidências de que os receptores de bradicicina modulam negativamente a expressão de IL-12 por monócitos CD14⁺, diferentemente do observado por Aliberti. Deve-se mencionar que aqueles autores utilizaram um modelo experimental e outra cepa do parasito. Observamos também que a infecção dos monócitos pelo *T. cruzi* aumenta significativamente a expressão de

IL-12 (tabelas 1, 2, 3 e 4), o que corrobora com dados descritos na literatura em relação ao aumento da expressão de IL-12 na presença do *T. cruzi*. Foi demonstrado, em modelo experimental, que tripomastigotas de *T. cruzi* induzem a síntese de IL-12 por macrófagos, esta citocina tem sido descrita como um potente indutor da produção de IFN- γ pelas células “Natural Killer” (NK) e por diferentes subtipos de células T (Gately *et al.*, 1994). A produção de IFN- γ observada durante a infecção é importante para o controle da proliferação do parasito *in vivo*, e esta resistência mediada por IFN- γ é dependente da IL-12 (Aliberti *et al.*, 1996). O aumento da expressão de IL-12 induzido pela infecção por *T. cruzi* é condizente com a função protetora da IL-12 em ativar o macrófago, o qual controla a replicação do parasito (Gazzinelli *et al.*, 1994). A frequência de monócitos produtores de IL-12 é distinta entre os diferentes grupos estudados, sendo que no grupo FCI, e não nos cardiopatas, esta frequência é maior do que no grupo NC. Este aumento de IL-12 observado no grupo FCI pode ser importante para tornar mais eficaz o processo de morte do parasito e reduzir o estímulo para uma futura exarcebação da resposta imune.

Avaliando-se a expressão da interleucina 10, uma citocina imunorregulatória, este trabalho mostrou que o tratamento com antagonistas dos receptores de cinina induziram a algumas alterações na expressão desta citocina. Observamos que no grupo CD e FCI, o tratamento com o antagonista B9958 aumentou a frequência de monócitos CD14/IL-10⁺ comparado ao tratamento com meio, e no caso do grupo CD também houve diferença comparado ao tratamento com o antagonista B9430, na presença do parasito (tabela 2 e 4). Este aumento da frequência de monócitos produtores de IL-10 após o uso do antagonista B9958 em relação ao meio sugere uma modulação negativa desta citocina pelo B₁R. Mas como há uma redução significativa da frequência de monócito produtor de IL-10 quando B₁R e B₂R são inibidos simultaneamente pelo uso do antagonista B9430, é provável que a via das

cininas seja importante no equilíbrio da expressão desta citocina frente o estímulo dado pela infecção por *T. cruzi*. A presença do parasito aumentou significativamente a expressão de IL-10 em todos os grupos estudados (tabelas 1, 2, 3 e 4). Comparando-se a expressão de IL-10 entre os diferentes grupos, observa-se que o grupo NC apresenta menor frequência de monócitos CD14/IL-10⁺ do que os pacientes chagásicos, além disso, o grupo FCI também apresentou uma frequência maior de monócitos CD14/IL-10⁺ do que os demais grupos (figura 12). Estudos relacionados às diferenças imunológicas entre os pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas da doença têm mostrado um perfil mais modulatório dos pacientes assintomáticos. Souza e colaboradores, 2007, mostraram que a infecção de monócitos pelo *T. cruzi* induziu a uma maior razão entre IL-10/TNF- α , uma citocina modulatória versus uma citocina pró-inflamatória, nos pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada, mas não nos pacientes chagásicos com a forma cardíaca, comparado com os indivíduos não chagásicos. Os dados apresentados neste trabalho corroboram com dados apresentados por Souza e colaboradores, 2007 (anexo II). É possível que os indivíduos chagásicos com a forma indeterminada sejam mais capazes de modular a resposta imune pela expressão da citocina IL-10 quando estimulados pelo parasito *T. cruzi*.

TNF- α é uma citocina pró- inflamatória que tem sido implicada em vários mecanismos imunes e inflamatórios (Aggarwal *et al.*,2001). Observamos em nosso trabalho que o tratamento com captopril aumentou a frequência de monócitos CD14/TNF- α ⁺ e a expressão de TNF- α por monócitos CD14⁺em relação ao tratamento com o antagonista B9958 e a condição meio, na presença do *T. cruzi*, estes dados foram observados no grupo CD (tabela 4 e figura 16C). Este dado condiz com o que é relatado na literatura. Estudos mostram que cininas estão relacionadas com a geração e manutenção da inflamação crônica. Estes peptídeos estimulam macrófagos *in vitro* a liberarem TNF- α e interleucina 1 (Tiffany *et al.*, 1989). Nossos dados

sugerem participação de captopril e do B₁R na expressão de TNF- α , pois o captopril, que potencia a via das cininas, aumenta a população de células produtoras de TNF- α e quando os receptores B₁ são inibidos pelo uso do antagonista B9958 a frequência desta população e expressão de TNF- α são reduzidas. É interessante notar que esta regulação de TNF- α por captopril e B9958 só acontece no grupo de chagásicos com cardiopatia dilatada, o qual apresenta um perfil mais inflamatório (Souza *et al.*, 2004) e é importante lembrar que, principalmente estes pacientes, fazem uso do fármaco captopril. Avaliamos também a expressão de TNF- α entre pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas e indivíduos não chagásicos, e observamos que os pacientes chagásicos apresentam maior frequência de monócitos produtores de TNF- α do que os indivíduos não chagásicos (figura 13). A expressão de TNF- α por monócitos também é aumentada significativamente pela infecção por *T. cruzi* (tabelas 1, 2, 3 e 4), indicando que o *T. cruzi* induz a ativação de vias nos monócitos que levam a expressão de TNF- α . Na infecção aguda, este é um processo vantajoso para o indivíduo, pois esta citocina tornará o macrófago mais eficiente para matar o parasito.

É interessante notar que a infecção de monócitos pelo *T. cruzi* induziu aumento da expressão das três citocinas estudadas neste trabalho. Sendo a IL-12 e TNF- α citocinas pró-inflamatórias e a IL-10 uma citocina modulatória, a maneira como cada indivíduo irá controlar a manutenção destas citocinas no seu organismo será determinante para o estabelecimento de uma forma mais branda ou mais agressiva da doença de Chagas. Como mostrado neste trabalho, os pacientes chagásicos FCI, que são assintomáticos, apresentam maior frequência de monócitos produtores de IL-10, mesmo apresentando expressão das citocinas pró-inflamatórias em níveis similares aos demais grupos de pacientes chagásicos, a maior expressão de IL-10 vista pelos FCI os torna mais eficientes em controlar a resposta inflamatória.

| | | HLA-DR | CD80 | CD86 | IL-12 | IL-10 | TNF- α |
|---------------------------|------------|--------|------|------|-------|-------|---------------|
| Captopril | infec. | | ↑ | ↑ | | | ↑ |
| | não infec. | ↑ | ↑ | | | | |
| B9430/ B1R-B2R | infec. | ↑ - | ↑ - | | | | ↓ + |
| | não infec | | ↓ + | | ↑ - | | |
| B9958/B1R | infec. | | | ↑ - | | ↑ - | ↓ + |
| | não infec | | ↑ - | | ↑ - | | |
| HOE/B2R | infec. | ↑ - | ↑ - | ↑ - | | | |
| | não infec | ↑ - | | | | | |

A tabela acima apresenta um resumo dos resultados referentes à expressão de moléculas coestimulatórias e de ativação e de citocinas por monócitos, mostrando uma visão geral do papel de captopril e da via das cininas na expressão destas moléculas. Desta forma, captopril parece modular positivamente a expressão destas moléculas enquanto a via das cininas parece modular negativamente, exceto a expressão de TNF- α , que parece ser modulado positivamente pelo B₁R. Como captopril potencia a via das cininas, esperava-se que o uso deste fármaco e a ativação da via das cininas regulassem igualmente as moléculas apresentadas neste trabalho, no entanto, foi observada uma ação antagônica na regulação de muitas das moléculas estudadas. Foi mostrado que captopril suprime a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF- α and IL-1 β em células sanguíneas mononucleares (Schindler *et al.*, 1995; Constantinescu *et al.*, 1998), também existem trabalhos que mostram que a ativação da via das cininas induz a síntese e secreção de IL-12, TNF- α e IL-1 (Aliberti *et al.*, 2003; Tiffany *et al.*, 1989), portanto, esta ação antagônica entre o captopril e a via das cininas já é bem estabelecida. Possivelmente, o captopril pode agir por outras vias além da via das cininas.

As setas indicam o efeito dos tratamentos na expressão das moléculas apresentadas e os sinais + e – indicam a possível modulação exercida na expressão destas moléculas pela ativação dos receptores de bradicinina.

ECA é uma enzima encontrada na forma solúvel no sangue e em fluidos corporais (Skidgel *et al.*, 1993) e também ligada à membrana de células endoteliais e outros tipos celulares nas quais é sintetizada (Danilov *et al.*, 2003). ECA é expressa em células mononucleares circulantes tais como monócitos e populações de linfócito T, tanto no subtipo CD4⁺ como no CD8⁺. Estudos têm atribuído várias funções para a enzima conversora de angiotensina. O papel clássico de ECA é converter angiotensina I em angiotensina II, este é um octapeptídeo que está envolvido em várias etapas do processo inflamatório, sendo considerado uma verdadeira citocina (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). ECA tem se mostrado envolvida em funções imunes e é encontrada em níveis elevados em condições inflamatórias (Ehlers and Riordan, 1989; Constantinescu *et al.*, 1997). Além disso, ECA é uma cininase que cliva os peptídeos cininas modulando a ativação da via das cininas. Desta forma, nosso trabalho avaliou a expressão de CD143 (denominação de ECA pelos “Cluster of differentiation”) pelos monócitos CD14⁺ infectados ou não pelo *T. cruzi*. Observamos que no grupo CND houve um aumento da população de células CD14⁺ expressando CD143 após o tratamento com captopril e com o antagonista B9430 em relação ao meio, na presença do parasito (figura 1A). Há evidências da participação de captopril na expressão de ECA, no entanto, sabemos que ele inibe a atividade desta enzima, talvez o organismo tente compensar esta inibição aumentando a expressão da molécula. A inibição de ECA leva à diminuição de Ang II, o que estimularia a produção de ECA. Este efeito também foi observado em camundongos tratados com captopril, eles tiveram aumento significativo do nível plasmático de ECA (Godsel *et al.*, 2003).

Em indivíduos NC, *T. cruzi* aumentou a frequência de monócitos CD14/CD143⁺ (dado não mostrado) e da frequência de linfócitos CD4/CD143⁺, já a população CD8/CD143 não foi alterada com a presença do parasito (figura 17). Observamos na figura 17 que o tratamento com captopril aumenta ainda mais a frequência da população celular CD4/CD143⁺. Esse resultado sugere que, talvez esteja ocorrendo um mecanismo de feedback positivo. A presença de captopril inibe ACE e aumenta a meia vida das cininas, desta forma, a via de sinalização das cininas está atuando por mais tempo o que pode desencadear uma maior expressão de ECA pela célula, a fim de modular negativamente a ativação desta via. Estudos mostram que a coexpressão de B₂R e ECA modula positivamente a atividade de ECA (Sabatini *et al.*, 2008), talvez, algo parecido tenha ocorrido em nosso sistema, assim uma maior ativação do receptor de cinina leva a uma expressão mais intensa de ECA.

Estudos mostram que o peptídeo bradicinina estimula a produção de radicais superóxido por macrófagos, além disso, a atividade de B₂R está correlacionada com a atividade dos macrófagos (Bockmann *et al.*, 1998). Macrófagos peritoneais de camundongos, de tamanho intermediário, são mais eficientes em responder à bradicinina do que macrófagos peritoneais menores. Nos primeiros, foi observada uma elevação, claramente maior, do cálcio intracelular livre. Os achados indicam que o estágio de diferenciação/maturação e ativação dos macrófagos pode ser importante para a habilidade da bradicinina em estimular estas células em respostas inflamatórias *in vivo* (Bockmann *et al.*, 1998). Sabemos que a ativação dos receptores de cinina induz a liberação de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (Bhoola *et al.*, 1992), e já foi demonstrado que o mesmo é citotóxico para uma variedade de patógenos incluindo o *T. cruzi* (Gazzinelli *et al.*, 1992). Desta forma, avaliamos se a inibição dos receptores de cinina altera a expressão da enzima iNOS por monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos. Encontramos que a administração do captopril e dos antagonistas dos receptores

de bradicinina induziram algumas alterações, mas que não são suficientes para sugerirmos uma participação dos mesmos na expressão da enzima iNOS nos pacientes chagásicos (figura 6). Vimos também que a sua expressão é similar entre os diferentes grupos estudados (figura 7). Pode ser que a expressão desta enzima seja mais crítica na infecção aguda por *T. cruzi*, quando a carga parasitária é alta e os monócitos são ativados a fim de matarem os parasitos, já os indivíduos estudados neste trabalho se encontravam na fase crônica da doença de Chagas, quando os parasitos são escassos.

O sucesso da resposta imune a um agente infeccioso depende da ativação e proliferação de células imune competentes. Avaliamos até o momento o papel dos receptores de cininas e de captopril na expressão de moléculas importantes para a ativação e para a função efetora de monócitos. Os monócitos quando em contato com o parasito irão apresentar antígenos do mesmo para os linfócitos T. Esta interação mediada pelo TCR e o complexo peptídeo MHC-II será crucial para a ativação dos linfócitos T e o desenvolvimento da resposta imune específica. Dada as evidências do envolvimento da via das cininas e de captopril na infecção dos monócitos e na expressão de algumas moléculas importantes para a ativação destas células, avaliamos o efeito destes reagentes na ativação e função efetora dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. É sabido que linfócitos T ativados expressam em sua superfície várias moléculas chamadas antígenos de ativação, dentre elas CD25, CD69, CD71 e HLA-DR, que usualmente são pouco expressas ou até ausentes na célula em repouso (Caruso *et al.*, 1997). Nossos estudos mostraram que captopril, na presença de *T. cruzi*, aumentou a frequência de linfócitos T CD4/HLA-DR⁺ e a expressão de HLA-DR por esta população celular (figura 18A e 18B). É possível que captopril seja um importante indutor da resposta imune na doença de Chagas ativando os linfócitos T CD4⁺ frente ao estímulo dado pelo parasito, esta ativação pode ser pela via das cininas, pois a inibição da mesma pelo antagonista HOE reduz a expressão de

HLA-DR. Já a população de linfócitos T CD8⁺ parece ser modulada por captopril e HOE na ausência do parasito, na presença deste, a expressão de HLA-DR é similar entre os diferentes tratamentos. Os dados sugerem que captopril pode modular negativamente a ativação de CD8, mas por uma via distinta da via das cininas, uma vez que a inibição de B₂R pelo uso de HOE também reduziu a expressão de HLA-DR (figura 18C e 18D), o que sugere que a via das cininas aumenta a expressão desta molécula.

Captopril é usado no tratamento de hipertensão através do bloqueio da conversão da angiotensina I em angiotensina II (Ondetti *et al.*, 1977). Além deste efeito, o captopril tem apresentado propriedades de regulação da resposta imune, principalmente atuando como anti-inflamatório. Inibidores de ACE, incluindo o captopril, têm efeito benéfico em encefalomielite autoimune e em miocardites (Constantinescu *et al.*, 1995; Godsel *et al.*, 2003b). Captopril suprime a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF- α and IL-1 β em células sanguíneas mononucleares (Schindler *et al.*, 1995; Constantinescu *et al.*, 1998). No entanto, os relatos sobre o fármaco captopril são controversos quanto ao seu papel na resposta imune. Foi mostrado que captopril inibiu a apoptose induzida por ativação de hibridomas de células T (Odaka and Mizuochi, 2000) e inibiu a apoptose induzida por Fas em células T humanas do sangue periférico (Déas *et al.*, 1997). Ele bloqueou a expressão de FasL em células T induzida por anti-CD3 e diminuiu a expressão de Fas (Odaka and Mizuochi, 2000). Estes estudos sugerem que captopril pode interferir com a deleção clonal e a aquisição de autotolerância *in vivo*, induzindo desta forma à autoimunidade. Recentemente, um subtipo de célula T produtora de IL-17 (T_H17), diferente das células T_H1 or T_H2, foi descrita e parece ter um importante papel na indução de injúrias teciduais na auto-imunidade (Park *et al.*, 2005; Harrington *et al.*, 2005). Interessantemente, o presente trabalho mostrou que captopril, na presença de *T. cruzi*, aumentou a expressão de IL-17 pelas células T CD4⁺ (figura 20B). Como este aumento de IL-

IL-17 não foi observado na condição utilizando somente meio, tanto na presença como na ausência do parasito (figura 20B), é possível que captopril esteja envolvido na expressão desta citocina por linfócitos T CD4⁺. Sabendo que captopril impede a rápida degradação de cininas através da inibição da enzima ECA, inibimos a ativação da via das cininas utilizando o antagonista HOE-140. Como mostrado na figura 20, o uso de HOE, na presença do parasito reduz a expressão de IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺. Avaliados juntos, estes dados sugerem que captopril, sob estimulação com o *T. cruzi*, induz o aumento da expressão de IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺ e provavelmente esta regulação se dá pela via das cininas, com participação do receptor B2. A expressão de IL-17 está envolvida em processos inflamatórios em várias doenças. Em artrite, IL-17 regula proteinases que atuam na destruição do tecido local (Chabaud *et al.*, 2000). Um quadro de destruição tecidual também é observado no miocárdio de indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica, (Higushi *et al.*, 1987). IL-17 pode ser uma importante citocina para o processo inflamatório tecidual observado no coração de pacientes com a doença de Chagas, já que a presença de *T. cruzi* juntamente com o captopril parecem ser agentes indutores da produção desta citocina em linfócitos T CD4⁺. Além disso, como citado anteriormente, captopril pode atuar como anti-apoptótico de linfócitos T ativados (Odaka and Mizuochi, 2000 e Déas *et al.*, 1997) mantendo estas células em estado ativado por mais tempo do que necessário. Isto é mais um fator que reforça a importância deste fármaco na resposta imune da doença de Chagas, uma vez que a resposta imune exacerbada pode contribuir para os danos do tecido cardíaco. Observamos que o tratamento com HOE-140 aumentou a frequência de linfócitos CD8/IFN- γ ⁺, na presença do *T. cruzi* (figura 19C), sugerindo que a via das cininas regula negativamente a expressão desta citocina. Estudos realizados por outros autores mostraram que a neutralização de IFN- γ *in vitro* aumentou a frequência de células produtoras de IL-17, indicando que IFN- γ pode inibir a expansão de

células T_H17 (Park *et al.*, 2005). Corroborando com estes dados, o trabalho presente sugere que na presença do *T. cruzi*, a adição de captopril e a ativação da via das cininas regulam positivamente a expressão de IL-17 ao mesmo tempo em que regulam negativamente a expressão de IFN- γ (figura 19C e 20B), sugerindo um importante papel da via das cininas no desenvolvimento da resposta do tipo T_H17. Expressão de IL-10 e TNF- α por linfócitos T CD4 e CD8 também foram avaliadas, mas não foram observadas diferenças quanto aos tratamentos (dados não mostrados).

Os resultados mostrados neste trabalho nos trazem fortes evidências de que a via das cininas é ativada pelo *Trypanosoma cruzi* para mediar a invasão dos monócitos humanos, sendo uma importante via para a interação parasito-hospedeiro. Além disso, a ativação da via das cininas juntamente com o parasito parece modular negativamente a expressão de moléculas de ativação e citocinas por monócitos humanos, exceto pela citocina inflamatória TNF- α .

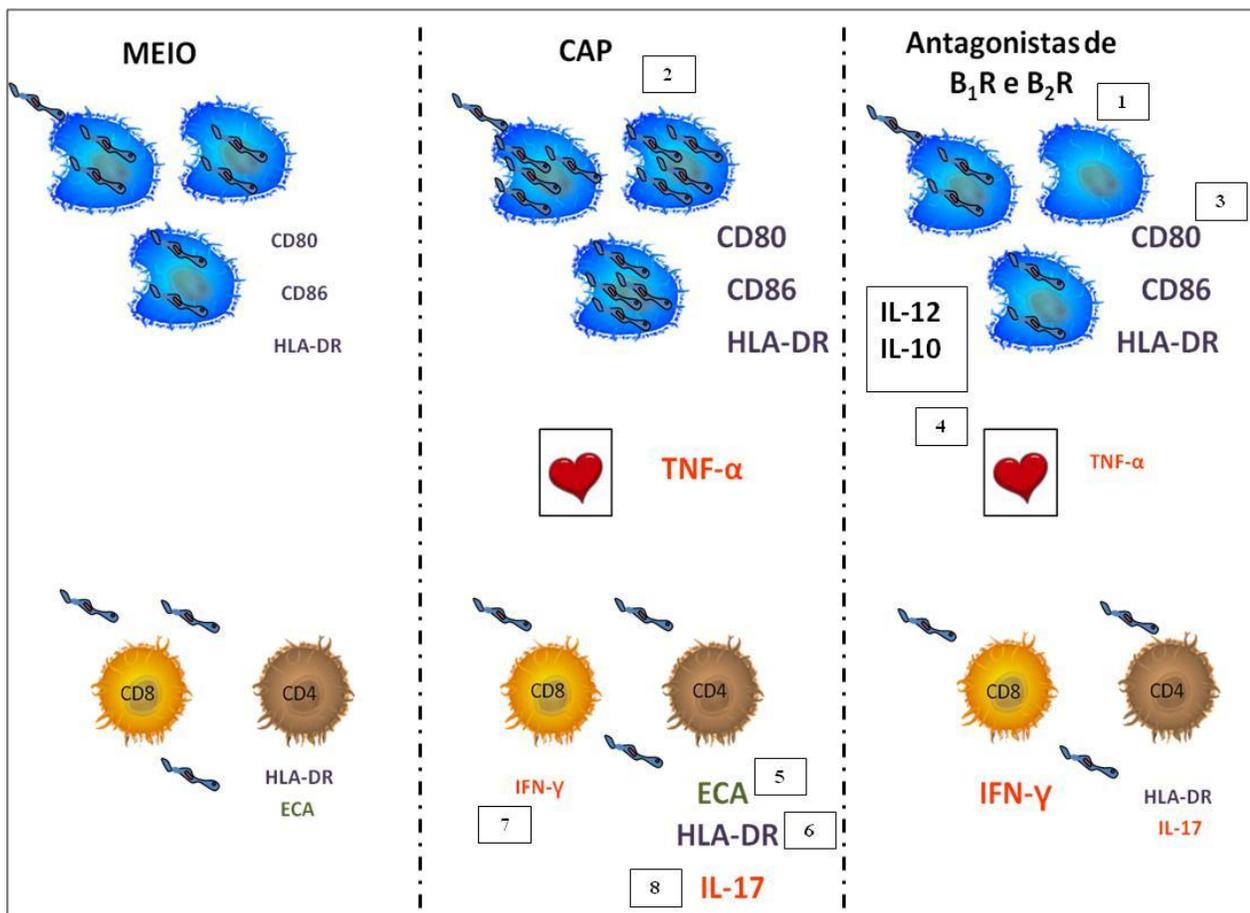
Estudos mostram que captopril tem um efeito benéfico na liberação de neuro-hormônios com subsequente redução da frequência cardíaca e reduz a incidência de arritmias cardíacas em pacientes com doença de Chagas (Roberti *et al.*, 1992), mas não são relatados estudos mostrando o papel de captopril na resposta imune da doença Chagas. Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que captopril pode estar envolvido no aumento de uma citocina inflamatória importante na injúria tecidual, o que não seria benéfico para o paciente chagásico. Estes estudos, além de trazer informações importantes sobre os efeitos do captopril e do sistema das cininas nas características imunológicas de pacientes chagásicos, apontam para a importância de se investigar mais a fundo o papel de captopril e da via das cininas na resposta imune da doença de Chagas, uma vez que este fármaco é muito utilizado pelos pacientes com cardiomiopatia chagásica. Assim, nossos dados devem nortear estudos

clínicos, imunológicos e parasitológicos que possam esclarecer definitivamente se o captopril deve ou não ser utilizado para tratamento de hipertensão em pacientes chagásicos ou em risco de contrair a doença de Chagas.

7. *Resumo dos resultados*

Aqui estão indicados, de forma resumida, os dados obtidos em nosso trabalho. O esquema 3 permite que os resultados sejam seguidos de acordo com a numeração a seguir:

- 1- O tratamento de monócitos humanos com antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cinina reduz a infecção destas células pelo parasito *Trypanosoma cruzi*.
- 2- Captopril aumenta a intensidade de infecção de monócitos humanos pelo parasito *Trypanosoma cruzi*.
- 3- A via das cininas juntamente com a infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi* modula negativamente a expressão de moléculas coestimulatórias em monócitos, por diferentes vias entre os indivíduos estudados.
- 4- A frequência de monócitos CD14⁺ expressando as citocinas IL-12 e IL-10 é aumentada pelo bloqueio da via das cininas e pela infecção por *Trypanosoma cruzi*, enquanto que o bloqueio dessas vias diminui a expressão de TNF- α .
- 5- Captopril e *Trypanosoma cruzi* aumentam a frequência de linfócitos T CD4/CD143⁺.
- 6- Captopril aumenta a frequência de linfócitos T CD4/HLA-DR⁺.
- 7- Captopril e a ativação da via das cininas estão envolvidos na regulação negativa da expressão de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺.
- 8- Captopril e a ativação da via das cininas estão envolvidos na regulação positiva da expressão de IL-17 por linfócitos T CD4⁺.



Esquema 3: Representação esquemática do resumo dos resultados. Captopril aumenta a intensidade de infecção de monócitos (2). A inibição dos receptores de bradicinina reduz a frequência de monócitos infectados com *T. cruzi*, sugerindo participação destes receptores no processo de infecção (1). Os resultados evidenciam o envolvimento de captopril na modulação positiva da expressão de CD80, CD86 e HLA-DR enquanto os receptores de bradicinina modulariam negativamente, uma vez que, o uso dos antagonistas aumentou a expressão destas moléculas (3). Exclusivamente no grupo de pacientes chagásicos com cardiopatia dilatada, o uso de antagonistas dos receptores de bradicinina reduziu a expressão da citocina TNF- α , sugerindo uma modulação positiva desta citocina pelos receptores (4). Captopril na presença de *T. cruzi* induziu a expressão de HLA-DR pelos linfócitos T CD4⁺ (6), além disso, induziu o aumento da expressão de ECA (5) e da citocina IL-17 (8), enquanto o antagonista reduziu a expressão de IL-17. Já a população de linfócitos T CD8⁺ aumenta a expressão da citocina IFN- γ na presença do antagonista HOE 140, sugerindo modulação negativa da expressão desta citocina pelo receptor de bradicinina (7). Os números indicam o dado a que se referem.

8. Referências Bibliográficas

1. Adam A., Albert A., Calay G., Closset J., Damas J., Franchimont P. (1985) Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem.* 31:423-426
2. Aggarwal B. B., Samanta A., Feldmann M. (2001) TNF α . *Cytokines Ref* 1:413-434
3. Agusti R., Couto A. S., Campetella O., Frasc A. C. C., de Lederkremer R. M. (1998) Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 97:123-131
4. Aliberti J.C., Cardoso M.A., Martins G.A., Gazzinelli R.T., Vieira L.Q., Silva J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1961-1967
5. Aliberti J.C., Viola J. P. B., Vieira-de-Abreu A., Bozza P. T., Sher A., Scharfstein J. (2003) Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *The Journal of Immunology* 170:5349-5353
6. Andrade L. O., Andrews N. W. (2005) The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*
7. Andrade L. O., Machado C. R. S., Chiari E., Pena S. D. J., Macedo A. M. (1999a) Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 100:163-172
8. Andrade Z. A. (1999b) Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:71-80

9. Anonymous (1999) Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:429-432
10. Aparicio I.M., Scharfstein J., Lima A. P. (2004) A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.* 72:5892-5902
11. Azuma M., Phillips J. H., Lanier L. L. (1992) CD28 co-stimulation of T cell mediated cytotoxicity. *Int J Cancer* 7:33-39
12. Barbasz A., Kozik A., (2009) The assembly and activation of kinin-forming systems on the surface of human U-937 macrophage-like cells. *Biol Chem.* 390:269-275
13. Barbasz A., Guevara-Lora I., Rapala-Kozik M., Kozik A. (2008) Kininogen binding to the surfaces of macrophages. *International Immunopharmacology* 8:211–216
14. Bhoola K. D., Figueroa C. D., Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 44:1-80
15. Bilate A.M., Cunha-Neto E. (2008) Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50:67-74.
16. Blaukat A. (2003) Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia* 35:17-23
17. Bockmann S., Mohrdieck K., Schmidt H., Zundorf G., Paegelow I. (1998) Differential sensitivity of macrophages to bradykinin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 357:151-158
18. Bockmann S., Paegelow I. (2000) Kinin and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Leukoc Biol.* 68:587-592

19. Burleigh B., Andrews N. W. (1995) A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺ signaling factor for mammalian cells. *J Biol. Chem* 270:5172-5180
20. Burleigh B. A., Woolsey A. M. (2002) Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* 4:701-711
21. Buscaglia C. A., Di Noia J. M. (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*. 5:419-427
22. Cadena R. D., Colman R. W. (1991) Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci*. 12:272-275
23. Campetella O. E., Martinez J., Cazzulo J. (1990). A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microb. Lett.* 67:145-150
24. Caruso A., Licenziati S., Corulli M., Canaris A.D., De Francesco M.A., Fiorentini S., Peroni L., Fallacara F., Dima F., Balsari A., Turano A. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. 27:71-6.
25. Chabaud M., Garnero P., Dayer J.M., Guerne P.A., Fossiez F., Miossec P. (2000) Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 12:1092-1099
26. Chang C. H., Guerder S., Hong S. C., van Ewijk W., Flavell R. A. (1996) Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 4:167-178
27. Chapman H. A. (1998) Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Current Opinion in Immunology* 10:93-102

28. Constantinecu C.S., Ventura E., Hilliard B., Rostami A. (1995) Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 17:471-491
29. Constantinescu C.S., Goodman D.B., Grossman R.I., Mannon L.J., Cohen J.A., (1997) Serum angiotensin-converting enzyme in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 54,1012-1015
30. Constantinecu C.S., Goodman D.B.P., Ventura E.S., (1998) Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters.* 62:25-31
31. Cortez M., Silva M.R., Neira I., Ferreira D., Sasso G.R., Luquetti A.O., Rassi A., Yoshida N. (2006) Trypanosoma cruzi surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect.*8:36-44
32. Costerousse O., Allegrini J., Lopez M.A., Alhenc-Gelas F. (1993) Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem. J.* 290: 3-40
33. Cossio P.M., Casanova M.B., Bellido C., Arce L., Storino R., de la Vega M.T., Diez C., Arana R.M. (1985) Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas' disease. *Medicina (B Aires).* 45:643-648
34. Coura J.R., Dias J.C.P. (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:31-40
35. Coura J., Junqueira A., Fernandes O., Valente S., Miles M. (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18:171-176
36. Cunha-Neto E., Coelho V., Guilherme L., Fiorelli A., Stolf N., Kalil J. (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi*

- protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas'cardiomyopathy patient. *J Clin Invest.* 98:1709-1712
37. Danilov S. M., Sadovnikova E., Scharenborg N., Balyasnikova I. V., Svinareva D. A., Semikina E. L., Parovichnikova E. N., Savchenko V. G., Adema G.J. (2003) Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Experimental Hematology* 31:1301309
38. Déas O., Dumont C., Mollereau B., Métivier D., Pasquier C., Bernard-Pomier G., Hirsch F., Charpentier B., Senik A. (1997) Thiol-mediated inhibition of FAS and CD2 apoptotic signaling in activated human peripheral T cells. *Int Immunol.* 9:117-25
39. Del Nery E., Juliano M. A., Lima A. P. C. A., Scharfstein J., Juliano L. (1997) Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry.* 272:25713-25718
40. DNDi, *Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas*, disponível na Internet (2010) <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>
41. Docampo R., Moreno S. N. J. (1996) The role of Ca^{2+} in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today.* 12:61-65
42. Dutra W.O., Menezes C.A., Villani F.N., da Costa G.C., da Silveira A.B., Reis D., Gollob K.J. (2009) Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:208-218.
43. Dutra W.O., Gollob K.J. (2008) Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21:287-292

44. Dutra, W.O., Rocha, M.O.C., Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*
45. Dutra, W.O., Martins-Filho, O.A., Cançado, J.R., Pinto-Dias, J.C., Brener, Z., Freeman Junior, G.L., Colley, D.G., Gazzinelli, G., Parra, J.C. (1994). Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* 6 (4): 499-506
46. Eakin A. E., Mills A. A., Harth G., McKerrow J. H., Craik C. S. (1992) The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal Biological Chemistry.* 267:7411-7420
47. Ehlers M.R., Riordan J.F. (1989) Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry.* 28:5311-5318
48. Elliott D. F., Horton E. W., Lewis G. P. (1959) Biological activity of pure bradykinin – a plasma kinin from of blood. *J Physiol (Lond.).* 150:6p
49. Ferguson M. A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352:1295-1302
50. Freitas J. M., Augusto-Pinto L., Piementa J., Bastos Rodrigues L., Gonçalves V. F., Teixeira S. M. R., Chiari E., Junqueira A. C. V., Fernandes O., Macedo A. M., Machado C. R., Pena S. D. J. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS pathogens* 2:e24
51. Bertram C.M., Baltic S., Misso N.L., Bhoola K.D, Foster P.S., Thompson P.J., Fogel-Petrovic M. (2007) Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca² and cell migration. *Journal of Leukocyte Biology* 81:1445-1454

52. Gately M. K., Warrier R. R., Honasoge S., Carvajal D. M., Faherty D. A., Connaughton S. A., Anderson T. D., Sarmiento U., Hubbard B. R., Murphy M. (1994) Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma *in vivo*. *Int. Immunol.* 6:157-167
53. Gazzinelli R. T., Wysocka M., Hayashi S., Denkers E. Y., Hieny S., Caspar P., Trinchieri G., Sher A. (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* 153:2533-2543
54. Gazzinelli R.T., Hieny S., Wynn T.A., Wolf S., Sher A. (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6115-6119
55. Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Hieny S., James S. I., Sher A. (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology* 22:2501-2506
56. Gazzinelli, R.T., Gazzinelli, G., Cançado, J.R., Cardoso, J.E., Brener, Z., Colley, D.G. (1990). Two modes of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas' disease: correlations with clinical forms of infection. *Res. Immunol.* 141 (8), 757-770
57. Giordano R., Chammas R., Veiga S. S., Colli W., Alves M. J. (1994) An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65:85-94

58. Gobieli F., Neugebauer W., Nguyen-Le X. K., Nsa Allogho S., Pheng L. H., Blouin D., Whalley E. T., Regoli D. (1997) Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:591-595
59. Godsel L. M., Leon J. S., Engman D. M. (2003a) Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in experimental myocarditis. *Curr Pharm Des.* 9:723-735
60. Godsel L. M., Leon J. S., Wang K., Fornek J. L., Molteni A., Engman D. M. (2003b) Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *The Journal of Immunology* 171:346-352
61. Harding F. A., McArthur J. G., Gross J. A., Raulet D. H., Allison J. P. (1992) CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature. Apr.* 356(6370):607-9
62. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6:1123-1132
63. Herrera E. M., Ming M., Ortega-Barria E., Pereira M. E. A. (1994) Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol. Bio-chem. Parasitol.* 65:73-83
64. Higuchi M.L., De Moraes C.F., Pereira Barreto A.C., Lopes E.A., Stolf N., Bellotti G., Pileggi F. (1987) The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol* 10:665-670

65. Hock J. F., Wirth K., Albus U., Linz W., Gerhards H. J., Wiemer G., Henke S., Breipohl G., König W., Knolle J., Scholkens B. A. (1991) HOE 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 102:769-773
66. Howard M. C., Myiajima A., Coffman R. L. (1993) T-cell derived cytokines and their receptors. In: Paul W. ed *Fundamental Immunology*. Third ed. Bethesda: *Raven Press* 763-800
67. Ilieva I., Ohgami K., Jin X.H., Suzuki Y., Shiratori K., Yoshida K., Kase S., Ohno S. (2006) Captopril suppress inflammatory in endotoxin-induced uveitis in rats. *Experimental Eye Research.* 83:651-657
68. Jones E. M., Colley D. J., Tostes S., Lopes E. R., Vnencak-Jones C. L., McCurley T. L. (1993) Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 48:348-357
69. Kaman W.E., Wolterink A.F.W.M., Bader M., Boele L.C.L., van der Kleij D. (2009) The bradykinin B₂ receptor in the early immune response against *Listeria* infection. *Med Microbiol Immunol.* 198:39-46
70. Kelm S., Schauer R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rec Cytol.* 175:137-240
71. Kipnis T. L., Calich V. L. G., Dias de Silva W. (1979) Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology* 78:89-99
72. Koberle F. (1958) Cardiopatía chagásica. *O Hospital.* 53:311
73. Krummel M. F., Allison J. P. (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* 183:2533-2540

74. Lapteva N., Ide K., Nieda M., Ando Y., Hatta-Ohashi Y., Minami M., Dymshits G., Egawa K., Juji T., Tokunaga K. (2002) Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:194-200
75. Lecomte O., Hauss P., Barbat C., Mazerolles F., Fischer A. (1994) Role of LFA-1, CD2, VLA5/CD29, and CD43 surface receptors in CD4+ T cell adhesion to B cells. *Cellular Immunology* 158:376-388
76. Levitus G., Hontebeyrie-Joskowicz M., Van Regenmortel M. H., Levin M. J. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol.* 85:413-417
77. Linsley P. S., Greene J. L., Bradey W., Bajorth J., Ledbetter J. A., Peach R. (1994) Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801
78. Luder C. G. (2003) *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. *J. Neuroimmunol.* 134:12-24
79. Macedo V. (1982) Chagas' disease. In: Cvevil Textbook of Medicine, eds. *J B Wyngaarden and L. H. Smith*, p. 1728. *W. B. Daunders Company, Philadelphia*
80. Marceau F., Sabourin T., Houle S., Fortin J. P., Petitclerc E., Molinaro G., Adam A. (2002) Kinin receptors: functional aspects. *International Immunopharmacology* 2:1729
81. Marceau F., Hess J. F., Bachvarov D. R. (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 50:357-386
82. McEachern A. E., Shelton E. R., Bhakta S., Obernolte R., Bach C., Zuppan P., Fujisaki J., Aldrich R. W., Jarnagin K. (1991) Expression cloning of the rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7724-7728

83. Meirelles M. N., Juliano L., Carmona E., Silva S. G., Costa E. M., Murta A. C., Scharfstein J. (1992) Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impar host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* 52:175-184
84. Menezes C.A., Rocha M.O, Souza P.E., Chaves A.C., Gollob K.J., Dutra W.O. (2004) Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 137:129-238
85. Ming M., Ewen M. E., Pereira M. E. (1995) *Trypanosoma* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF- β signaling pathway. *Cell* 82:287-296
86. Moncayo A. (2003) Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:577-591
87. Monteiro A.C., Schmitz V., Morrot A., de Arruda L.B., Nagajyothi F., Granato A., Pesquero J.B., Müller-Esterl W., Tanowitz H.B., Scharfstein J., (2007) Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog.* 3(11):e185
88. Morrot A., Strickland D. K., Higuchi M. L., Reis M., Pedrosa R., Scharfstein J. (1997) Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional α -2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *International Immunology.* 9:825-834
89. Mortara R. A., Procópio D. O., Barros H. C., Verbisck N. V., Andreoli W. K., Silva R. B., da Silva S. (1999) Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:135-137

90. OMS- Organização Mundial de Saúde (2002) Chagas disease, disponível na Internet <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>
91. Odaka C., Mizuochi T. (2000) Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals. *Clin. Exp. Immunol.* 121:515-522
92. Ondetti M.A., Rubin B., Cushman D.W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: a new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196:441-444
93. Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C., (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6:1133–1141
94. Pereira M. E. A. (1994) Intracytosolic survival of *Trypanosoma cruzi*. *Baillières Clin Infect Dis.* 1:305-318
95. Planelles L., Thomas M. C., Maranon C., Morell M., Lopez M. C. (2003) Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APC from resistant or susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 131:41-47
96. Rassi A., Luquetti A. O. (1992) Therapy of Chagas disease. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine, eds. S. Wemdel, Z. Brener, M. E. Camargo and A. Rassi, p. 237. *ISBT-SBHH*, São Paulo
97. Roberti R.R., Martinez E.E., Andrade J.L., Araujo V.L., Brito F.S., Portugal O.P., Horowitz S.F. (1992) Chagas cardiomyopathy and captopril. *Eur Heart J.* 13:966-970
98. Rocha M. O. C., Ribeiro A. L. P., Teixeira M. M. (2003) Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Frontiers in Bioscience* 8:449-454

99. Rodríguez A., Samoff E., Rioult M. G., Chung A., Andrews N. W. (1996) Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *The Journal of Cell Biology*. 134:349-362
100. Rosestolato C. T. F., Dutra J. M. F., De Souza W., Carvalho T. M. U. (2002) Participation of host cell actin filaments during interactions of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct* 27:91-98
101. Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Suzuki Y., Ruperez M., Egido J. (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10,321-329
102. Sabatini R. A., Guimarães P. B., Fernandes L., Reis F. C. G., Bersanetti P. A., Mori M. A., Navarro A., Hilzendeger A. M., Santos E. L., Andrade M. C.C., Chagas J. R., Pesquero J. L., Casarini D. E., Bader M., Carmona A. K., Pesqueiro J. B. (2008) ACE Activity Is Modulated by Kinin B2 Receptor *Hypertension* 51:689-695
103. Scharfstein J., Schmitz V., Svensjo E., Granato A., Monteiro A.C. (2007) Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cells maturation. *Scand J Immunol*. 66:128-136
104. Scharfstein J., Schmitz V., Morandi V., Capella M. M. A., Lima A. P. C. A., Morrot A., Juliano L., Muller-Ester W. (2000) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B₂ receptors. *J. Exp. Med.* 192:1289-1299
105. Schaub G. A., Losch P. (1988) *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol* 65:174-186
106. Schenkman S., Eichinger D., Pereira M. E., Nussenzweig V. (1994) Structural and functional properties of trypanosoma trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol*. 48:499-523

107. Schenckman S., Jiang M. S., Hart G. W., Nussenzweig V. (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope requires for invasion of mammalian cells. *Cell*. 65:1117-1125
108. Schenkman S., Andrews N. W., Nussenzweig V., Robbins E. S. (1988) *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell* 55:157-165
109. Schindler R., Dinarello C.A., Koch K.M. (1995) Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 7:526-533
110. Schnapp A. R., Eickhoff C. S., Scharfstein J., Hoft D. F. (2002) Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection* 4:805-813
111. Singh R., Kalra O. P., Sarma P. U., Prabhu K. M. (1996) Effect of captopril on serum angiotensin converting enzyme and blood pressure in hypertensive patients. *J. Assoc. Physicians India*. 44:109-111
112. Skidgel R. A., Erdos E. (1993) Biochemistry of angiotensinI-converting enzyme. In: Robertson J. I. S., Nicholls M. G., eds. The renin-angiotensin system. *New York:Gower Medical Publishing* 10:1-10
113. Souza P. E. A.; Rocha M. O. C.; Menezes C. A. S.; Coelho J. S.;Chaves A. C. L.; Gollob K. J.; Dutra W. O. (2007) *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infection and Immunity* 75:1886-1894
114. Souza P. E. A.; Rocha M. O. C.; Rocha-Vieira E.; Menezes C. A. S.; Chaves A. C. L.; Gollob K. J.; Dutra W. O. (2004) Monocyte from patients with indeterminate and cardiac

- forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associates with morbidity. *Infection and Immunity* 72:5283-5291
115. Steindel M., Kramer Pacheco L., Scholl D., Soares M., de Moraes M.H., Eger I., Kosmann C., Sincero T.C., Stoco P.H., Murta S.M., de Carvalho-Pinto C.J., Grisard E.C. (2008) Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60:25-32
116. Stewart J. M., Gera L., Hanson W., Zuzack J. S., Burkard M., McCullough R., Whalley E. T. (1996) A new generation of bradykinin antagonists. *Immunopharmacology.* 33:51-60
117. Tardieux I., Nathanson M. H., Andrews N. W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. *J. Exp. Med.* 179:1017-1022
118. Tibayrenc M., Ayala F. (1999) Evolutionary genetics *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Microb. Infect.* 1:465-472
119. Tiffany C. W., Burch R. M. (1989) Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS* 247:189-192
120. Todd J. A., Acha-Orbea H., Bell J. I., Chao N., Fronck Z., Jacob C. O., McDermott M., Sinha A. A., Timmerman L., Steinman L., McDevitt H. O. (1998) A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240: 1003-1009.
121. Umezawa E., Stalf A. M. S., Corbett C. E. P., Shikanai-Yasuda M. A. (2000) Chagas' disease. *Lancet.* 357:797-799
122. Vago A. R., Andrade L. O., Leite A. A., Reis D. A., Macedo A. M., Adad S. J., Tostes S., Moreira M. C. V., Filho G. B., Pena S. D. J. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *American Journal of Pathology* 156:1805-1809

123. Vieira M., Dutra J. M. F., Carvalho T. M. U., Cunha-e-Silva N. L., Souto-Padrón T., Souza W. (2002) Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* 118:491-499
124. Walunas T. L., Bakker C. Y., Bluestone J. A. (1996) CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* 183:2541-2550
125. Wilkowsky S. E., Wainszelbaum M. J., Isola E. L. D. (1996) *Trypanosoma cruzi*: Participação of intracellular Ca^{2+} during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochemical and Biophysical Research communications* 222:386-389
126. Zeledón R., Alvarado R., Jirón L. F. (1977) Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop* 34:65-77
127. Zingales B., Souto R. P., Mangia R. H., Lisboa C. V., Campbell D. A., Coura J. R., Jansen A., Fernandes O. (1998) Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Intern. J. Parasitol.* 28:105-112