

LUÍSA MOURÃO DIAS MAGALHÃES

Avaliação dos efeitos da infecção com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos

BELO HORIZONTE

2013

LUÍSA MOURÃO DIAS MAGALHÃES

Avaliação dos efeitos da infecção com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra

BELO HORIZONTE

2013

“O mais importante hoje, é acabar com essa doença
e cuidar da nossa pobre gente infectada”
Carlos Chagas

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Wal, pelo incentivo e confiança durante todo esse processo.

Aos colaboradores Dr. Keneth Gollob e Dr. Egler Chiari pela ajuda em todos os momentos de dúvida.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações celulares pelo apoio e amizade.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia pela oportunidade.

A Cibele e a Sumara por estarem sempre dispostas a ajudar, e sempre com um sorriso no rosto.

A todos os professores da Pós-graduação em Parasitologia pelos ensinamentos e dedicação.

Aos colegas e amigos do “Lado B” por tornar as aulas de mestrado mais agradáveis e divertidas.

Aos amigos da graduação, que continuam presentes sempre ao meu lado.

Ao Breno, meu companheiro de mestrado e da vida sempre me ajudando em todos os momentos.

À minha família pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por acreditarem sempre, às vezes mais do que eu mesma acreditava ser capaz.

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Doença de Chagas | 12 |
| 1.2 Linhagens de <u>T. cruzi</u> | 15 |
| 1.3 A resposta imune na infecção por <u>T. cruzi</u> | 16 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 Objetivo geral | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos | 24 |
| 4. MATERIAS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 Doadores | 26 |
| 4.2 Linhagens celulares para culturas de <u>T. cruzi</u> | 26 |
| 4.3 Obtenção de parasitos | 26 |
| 4.4 Infecção das células para análise da diferença de infectividade entre as cepas de <u>T. cruzi</u> e expressão de moléculas de superfície e citocinas | 27 |
| 4.5 Reação de imunofluorescência para análise em citômetro de fluxo | 28 |
| 4.6 Análises em citômetro de fluxo | 30 |
| 4.7 Análises estatísticas | 30 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 5.1 Análise de frequência de células CD14+CFSE+ | 32 |
| 5.2 Análise da expressão de CD16 em subpopulações de monócitos | 32 |
| 5.3 Análise da expressão de TLR2 em monócitos | 34 |
| 5.4 Análise da expressão de TLR4 em monócitos | 36 |
| 5.5 Análise da expressão de HLA-DR em monócitos | 38 |
| 5.6 Análise da expressão de CD80 em monócitos | 39 |
| 5.7 Expressão de CD86 em monócitos | 41 |
| 5.8 Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas. | 44 |
| 5.9 Expressão de IL-12 em monócitos | 45 |
| 5.10 Expressão de TNF α por monócitos | 46 |
| 5.11 Expressão de IL-10 por monócitos | 47 |
| 5.12 Resumo dos dados obtidos para expressão de citocinas nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas. | 48 |
| 5.13 Razão entre citocina pró-inflamatória e citocina anti-inflamatória | 48 |
| 5.15 Avaliação da frequência de expressão de HLA-DR em linfócitos | 50 |
| 5.16 Avaliação da frequência de expressão de CD28 e CTLA-4 em linfócitos | 50 |
| 5.17 Avaliação da frequência de expressão de Granzima A em linfócitos | 52 |
| 5.18 Avaliação da frequência de expressão de IFN γ e TNF α em linfócitos | 52 |
| 5.19 Avaliação da frequência de expressão de IL-17 em linfócitos | 54 |
| 5.20 Avaliação da frequência de expressão de IL-10 em linfócitos CD4+ | 54 |
| 6. DISCUSSÃO | 57 |
| 7. CONCLUSÕES | 70 |

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo sendo, a sua maioria, na América Latina e mais de 25 milhões de pessoas em risco de infecção. *T. cruzi* é classificado atualmente em seis DTUs, chamados de Tc I a VI, de acordo com Zingales (2009).

Nossa hipótese é que cepas distintas infectam diferentemente monócitos humanos, causando alterações imunológicas distintas nestas células e em linfócitos. Assim, o projeto avaliou a infectividade do clone Colombiana 1.7 e da cepa Y pertencentes, respectivamente, aos grupos *T. cruzi* I e II, e o perfil imunológico induzido por elas na célula hospedeira. Para realização das análises, as cepas foram mantidas em cultura de células VERO em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. O parasito foi corado com CFSE e então foi realizada a infecção de células do sangue periférico de doadores não chagásicos por 3 e 72 horas. Após este período, as hemácias foram lisadas e as células incubadas com anticorpos monoclonais dirigidos contra moléculas marcadoras de ativação, co-estimulatórias, citotoxicidade e citocinas (anti-CD14, CD16, CD4, CD8, TLR2, TLR4, CD80, CD86, HLA-DR, CD28, CTLA-4, CD69, IL-12, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ e Granzima A). Os dados foram obtidos por citometria de fluxo e a análise dos mesmos realizada utilizando o software Flow-Jo. Nossos resultados demonstram que, apesar de não ter sido observada uma diferença na proporção de células CD14+CFSE+ quando a infecção foi realizada pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7, foram observadas diferenças na ativação de monócitos após a infecção pelas diferentes cepas. Quando a infecção foi realizada pela cepa Y observou-se maior ativação da subpopulação de monócitos CD16-, enquanto quando a infecção foi realizada pelo clone Colombiana 1.7 a subpopulação CD16+ foi a mais ativada. Foi observado também uma menor expressão de IL-10 por monócitos CFSE+ após a infecção pela cepa Y comparada com a infecção pelo clone Colombiana 1.7. Finalmente, foi possível diagnosticar um ambiente mais inflamatório após a infecção pela cepa Y do que após a infecção pelo clone Colombiana 1.7, ao estudar a razão entre as citocinas TNF α e IL-10. Foi observada também uma diminuição da expressão de CTLA-4 em células T CD8+ após 72 horas de infecção pelas duas cepas. Em resumo, nossos resultados mostraram que a infecção com as diferentes cepas do *T. cruzi* leva a alterações fenotípicas e funcionais em monócitos e linfócitos humanos. Estes achados são importantes pois oferecem informações relevantes para o conhecimento da resposta immune desencadeada por diferentes cepas, podendo auxiliar na compreensão da doença e abrir perspectivas para novos métodos de controle.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, cepas, perfil imunológico.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, there are about 10 million people infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide, mostly in Latin America, and more than 25 million people at risk of infection. *T. cruzi* is currently classified into six DTUs, called Tc I to VI according Zingales (2009). Our hypothesis is that different strains infect human monocytes differently, causing different immune changes in these cells and lymphocytes. Thus, the project assessed the infectivity of clone Colombiana 1.7 and the Y strain belonging respectively to groups *T. cruzi* I and II, and the immunological profile induced by them in the host cell. To perform the analysis, parasite strains were grown in VERO cells in incubators at 37 ° C and 5% CO₂. Trypomastigote forms of the parasites were stained with CFSE and used in infection of peripheral blood cells from healthy donors for 3 and 72 hours. After this period, the red cells were lysed and the cells incubated with monoclonal antibody directed against activation markers, co-stimulatory and cytotoxicity molecules, and cytokines (anti-CD14, CD16, CD4, CD8, TLR2, TLR4, CD80, CD86, HLA- DR, CD28, CTLA-4, CD69, IL-12, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ and granzyme A). Data were obtained by flow cytometry and analysis performed using the Flow-Jo software. Our results demonstrate that, despite no difference in the frequency of CFSE⁺ CD14⁺ cells when infection was performed by Y strain or clone Colombiana 1.7, differences were observed in the activation of monocytes after infection by different strains. When infection was carried out by Y strain, we observed higher activation of CD16⁻ subpopulation of monocytes, whereas when infection was carried out by clone Colombiana 1.7, the CD16⁺ subpopulation was the most activated. It was also observed a reduced expression of IL-10 by CFSE⁺ monocytes after infection with strain Y compared to infection with clone Colombiana 1.7. Finally, it was possible to observe a more inflammatory environment after infection with strain Y than after infection Colombiana 1.7, by studying the ratio of the cytokines TNF α and IL-10. There was also a reduction of the expression of CTLA-4 in CD8⁺ T cells after 72 hours of infection by the two strains. In summary, our results showed that infection with different strains of *T. cruzi* leads to functional and phenotypic changes in human monocytes and lymphocytes. These findings are important because they provide information relevant to the understanding of the immune response triggered by different *T. cruzi* strains, which could aid in understanding the disease and open perspectives for new control methods.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, strains, immunological profile.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estratégia de análise utilizada na dissertação | 30 |
| Figura 2: Avaliação da frequência e intensidade média de fluorescência de células CD14+CFSE+ infectadas com os diferentes isolados e em diferentes tempos de cultura | 32 |
| Figura 3: Avaliação da frequência de células CD14+CD16+ infectadas com os diferentes isolados e em diferentes tempos de cultura..... | 33 |
| Figura 4: Frequência de expressão de TLR2 | 34 |
| Figura 5: Intensidade média de fluorescência de expressão de TLR2 | 35 |
| Figura 6: Frequência de expressão de TLR4 | 36 |
| Figura 7: Intensidade média de fluorescência de TLR4 | 37 |
| Figura 8: Frequência de expressão de HLA-DR | 38 |
| Figura 9: Frequência de expressão de CD80 | 40 |
| Figura 10: Intensidade média de fluorescência de expressão de CD80 | 41 |
| Figura 11: Frequência de expressão de CD86 | 42 |
| Figura 12: Intensidade média de fluorescência de CD86 | 43 |
| Figura 13: Frequência de expressão de IL-12. | 45 |
| Figura 14: Frequência de expressão de TNF α | 46 |
| Figura 15: Frequência de expressão de IL-10 | 47 |
| Figura 16: Avaliação da frequência de expressão de CD69 em linfócitos..... | 49 |
| Figura 17: | 50 |
| Figura 18: Avaliação da frequência de expressão de CD28 em linfócitos..... | 51 |
| Figura 19: Avaliação da frequência de expressão de CTLA-4 em linfócitos..... | 51 |
| Figura 20: Avaliação da frequência de expressão de Granzima A em linfócitos..... | 52 |
| Figura 21: Avaliação da frequência de expressão de IFN γ em linfócitos. | 53 |
| Figura 22: Avaliação da frequência de expressão de TNF α em linfócitos..... | 53 |
| Figura 23: Avaliação da frequência de expressão de IL-17 em linfócitos. | 54 |
| Figura 24: Avaliação da frequência de expressão de IL-10 em linfócitos CD4+..... | 55 |
| Figura 25: Esquema representativo dos dados obtidos na dissertação. | 71 |

LISTAS DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Grupos experimentais de acordo com a cepa utilizada e o tempo de infecção..... | 27 |
| Quadro 2: Lista de anticorpos utilizados nos experimentos..... | 29 |
| Quadro 3: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas ($p < 0,05$)..... | 44 |
| Quadro 4: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas ($p < 0,05$)..... | 48 |
| Quadro 5: Razão entre a frequência de expressão de TNF α e IL-10 em monócitos.. | 49 |
| Quadro 6: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de superfície (ativação e co-estimulatórias) e citocinas em linfócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Antigen Presenting Cell
BSA – Bovine Serum Albumin
CD - Cluster of Differentiation (exemplo CD4)
Células NK – Células Natural Killer
CFDASE – 5-(e-6)-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTLA-4 – Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DMSO – Dimethyl Sulfoxide
DTUs – Discrete Typing Units
Gp – Glicoproteína (exemplo gp90)
GPI – Glicoinositolfosfato
IFN – Interferon
IL – Interleucina (exemplo IL-10)
MHC – Major Histocompatibility Complex
MIF – Intensidade Média de Fluorescência
MyD88 - Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NO – Nitric Oxide
PBS – Phosphate Buffered Saline
Proteína Ts – Proteína Trans-sialidase
PRRs – Pattern Recognition Receptors
ROS – Reactive Oxygen Species
SFB – Soro Fetal Bovino
TCR – T Cell Receptor
TLR – Toll Like Receptors (exemplo TLR2)
TNF α – Tumor Necrosis Factor-alpha
TRIF – Toll/IL1R – Domain containing adaptor protein inducing IFN beta



1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (Hotez et al. 2007) foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas que, em um único trabalho, descreveu o agente etiológico, o vetor e o modo de transmissão (Chagas 1909).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, e é também crescente o número de pacientes em países desenvolvidos não endêmicos (tais como Austrália, Canadá, Japão, Espanha e Estados Unidos), devido ao aumento da migração de latino-americanos que não sabem que estão infectados (DNDi 2011). De acordo com a OMS, existem cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo, sendo a sua maioria na América Latina. Existem mais de 25 milhões de pessoas em risco de infecção (WHO 2010). 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 bilhão em salários e produtividade industrial foram perdidos, devido a existência de um grande contingente de trabalhadores incapacitados pela doença de Chagas (DNDi 2011).

Apesar de já terem sido identificadas mais de 140 espécies de triatomíneos, somente algumas são vetores competentes para o *T. cruzi*. Os principais vetores conhecidos são: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul, *Rhodnius prolixus* e *T. dimidiata* na região Andina e partes da América Central, e *T. dimidiata* e *T. barberi* no México (Gorla et al. 2010). Quando um triatomíneo infectado pelo *T. cruzi* pica um vertebrado, ele defeca e, eventualmente, as fezes do barbeiro podem atingir o orifício da picada, contaminando o vertebrado com o protozoário que vive em seu intestino. A doença de Chagas também pode ser transmitida por outros meios, tais como: transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais, via oral (uma variação da transmissão vetorial) e de forma congênita (Moncayo 2003). A doença de Chagas apresenta um período de incubação variável de acordo com a via de transmissão, sendo de 5 a 15 dias na vetorial, de 30 a 40 dias na via transfusional, do quarto ao nono mês de gestação na via transplacentária e cerca de 7 a 22 dias para a via oral (Alvarenga & Bronfen 1997).

T. cruzi apresenta diferentes formas ao longo do seu ciclo de vida. A forma epimastigota é a replicativa que está presente no intestino do triatomíneo e não é infectante para mamífero. No

hospedeiro invertebrado, as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas em um processo denominado metaciclogênese (Neira et al. 2003). Os tripomastigotas metacíclicos invadem as células do hospedeiro vertebrado e diferenciam-se em amastigotas intracelulares, que são formas replicativas presentes no hospedeiro vertebrado. Após múltiplos ciclos de replicação, os amastigotas intracelulares diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, os quais rompem a célula e circulam temporariamente como parasitos extracelulares, prontos para invadirem novas células, perpetuando o ciclo infeccioso (Schenkman et al. 1988). Os tripomastigotas infectam células do hospedeiro de vários tipos de tecidos, sendo que o tropismo diferencial parece estar relacionado com a cepa do parasito (Dorta et al. 1995, Vago et al., 2000).

A penetração dos tripomastigotas nas células do hospedeiro é um processo com várias fases, envolvendo diversas moléculas do parasito e da célula hospedeira que levam a uma mobilização intracelular de Ca^{2+} em ambas as células (Burleigh & Woosley 2002). Para adesão à célula hospedeira, os tripomastigotas metacíclicos expressam uma glicoproteína específica, gp82 (Tardieux et al. 1992). Outra glicoproteína de superfície que também é expressa para a adesão celular por tripomastigotas metacíclicos é gp35/50 (Brener 1969). Em contrapartida, a glicoproteína gp90 atua como regulador negativo na invasão celular (Brener 1969). Assim como gp35/50 e gp82, a gp90 é ancorada à membrana plasmática via GPI (Burleigh & Woosley 2002).

No momento da invasão celular, em células alvo não fagocíticas, lisossomos da célula hospedeira são recrutados e se fundem com a membrana plasmática permitindo a formação do vacúolo parasitóforo (Andrade & Andrews 2005). Uma vez dentro do lisossomo, o *T. cruzi* usa o pH ácido para ativar uma molécula formadora de poro, TcTox, que degrada a parede do lisossomo, permitindo o escape do parasita para o citosol (Marin-Neto et al. 2007 e Pedroso et al. 2003). Tripomastigotas também podem invadir células por invaginação da membrana plasmática, gerando um vacúolo intracelular que então se funde com o lisossomo (Andrade & Andrews 2005). Em células fagocíticas, *T. cruzi* é internalizado pelo mecanismo convencional de fagocitose/endocitose, envolvendo uma aquisição gradual de marcadores endosomais e então fusão endosomo-lisossomo. (Fernandes & Andrews 2012)

No citosol, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. Após aproximadamente nove ciclos de divisão binária, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas móveis que são liberados por ruptura celular (Dvorak & Hyde 1973). Esse processo de amplificação do número de parasitos é responsável pela fase aguda da infecção, que é caracterizada por alta parasitemia e parasitismo tecidual (Rassi Jr et al. 2010). Essa fase caracteriza-se por ocorrência de febre, fraqueza, aumento do fígado e baço, mal estar geral e algum tipo de “chagoma de inoculação”,

entretanto as consequências da infecção não são normalmente reconhecidas. (WHO 2010, Rassi Jr et al. 2010). Em menos de 5% dos casos podem ocorrer complicações neurológicas e/ou cardíacas durante a fase crônica. (Prata 2001) A proliferação do *T. cruzi* dentro dos cardiomiócitos, com consequente ruptura e liberação de mediadores inflamatórios de vários tipos, é responsável por miocardite aguda intensa e difusa, que pode ocorrer na fase aguda (Andrade 1999).

Após a fase aguda, o número de parasitos circulantes cai drasticamente, mas baixos níveis ainda são detectáveis em certos tecidos, entretanto, a infecção só pode ser identificada por testes sorológicos ou parasitológicos específicos (Freitas et al. 2005). 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 1999). A forma indeterminada é encontrada em cerca de 60% a 70% dos pacientes infectados. A fase crônica da doença apresenta ainda outras três formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Na forma cardíaca, que afeta aproximadamente 20% a 30% dos indivíduos infectados, os pacientes desenvolvem distúrbios de condução e contratilidade do coração, levando ao surgimento de arritmias e insuficiência cardíaca que, frequentemente, são fatais (Brener 1987). 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. A forma clínica cardiodigestiva é menos comum e está associada com alterações tanto no sistema cardiovascular como no sistema digestivo (Brener 1987, Lopes et al. 1989 e Dutra et al. 2009).

Em regiões geográficas distintas, a prevalência da forma clínica e mortalidade da doença de Chagas são diferentes. No Brasil, a forma indeterminada é mais comum (60-70%), seguida pelas formas cardíacas e digestivas (20-30% e 8-10%, respectivamente), a forma cardiodigestiva é menos frequente. Entretanto, no Chile, as formas cardíacas e digestivas predominam, enquanto praticamente não existem na Venezuela e América Central (Luquetti et al. 1986, Dias 1992). Essa divergência geográfica pode estar relacionada, em parte, a aspectos genéticos e competência imune da população humana local, mas alguns autores acreditam que a sua causa primária seja a diversidade genética do parasito (Buscaglia & Di Noia 2003).

Independentemente da forma clínica, existem fortes evidências da participação do sistema imune na patogênese da doença de Chagas (Dutra & 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).

1.2 Linhagens de *T. cruzi*

T. cruzi se reproduz predominantemente por fissão binária e apresenta diversidade genética e bioquímica em suas cepas. Apesar de ter sido proposto, inicialmente, que a diversidade genética de *T. cruzi* fosse resultante de uma evolução predominantemente clonal (Tibayrenc et al. 1986) acredita-se, atualmente, que a troca genética entre estes parasitos contribuiu significativamente para a estrutura populacional hoje encontrada (Zingales et al. 2009). Durante muitos anos foram usados diversos métodos a fim de caracterizar a estrutura populacional de *T. cruzi*, o que gerou diferentes classificações como zimodemas (Miles et al. 1978, Romanha et al. 1979), schizodemas (Morel et al. 1980), biodemas (Andrade 1974, Andrade & Magalhães 1997), clones (Tibayrenc & Ayala 1991), linhagens (Souto et al. 1996), clados (Kawashita et al. 2001) e recentemente DTUs (Tibayrenc 1998) e haplotipos (Freitas et al. 2006, Herrera et al. 2007).

A fim de padronizar a classificação de *T. cruzi*, foi realizada uma reunião satélite, em 1999, em que foi definida a separação do parasito em duas grandes linhagens evolutivas, chamadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anonymous 1999) Dez anos após a primeira reunião satélite, devido ao grande avanço da comunidade científica na estrutura da população de *T. cruzi*, foi realizada uma segunda reunião. Nessa reunião, foi utilizado o conceito de DTUs (Discrete Typing Unit) que agrupa um conjunto geneticamente mais semelhante entre si do que qualquer outro (Tibayrenc 2003) e que são identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns. Utilizando-se dessa estratégia, foram definidos, para a população de *T. cruzi*, seis DTU's, correspondendo, respectivamente, a *T. cruzi* I a VI. Para a classificação de DTU's foram utilizados diversos parâmetros, tais como: crescimento *in vitro* em cultura, infectividade em células de cultura, patogenicidade em camundongos, capacidade de transmissão por triatomíneos e sensibilidade a drogas *in vitro* e *in vivo* (Tibayrenc 2003).

Os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, definidos na primeira reunião satélite, foram agrupados respectivamente nas duas grandes subdivisões DTU I e II, com exceção da cepa CL Brener, isolada do vetor *Triatoma infestans*, antes classificada como *T. cruzi* II e agora reclassificada como DTU VI. A cepa Colombiana, isolada de humano na Colômbia, foi mantida na sua classificação como DTU I ou TcI, conhecida por agrupar cepas do ciclo silvestre, e a cepa Y isolada de humano no Brasil continua sendo classificada como DTU II ou TcII, conhecida por apresentar cepas do ciclo doméstico (Zingales et al. 2009).

No Brasil, apesar da presença de vetores infectados naturalmente com cepas TcI e TcII, somente cepas do grupo TcII foram encontradas em pacientes crônicos (Di Noia et al. 2002, Freitas et al.

2005, Gomes et al. 1998).

Em um trabalho utilizando macrófagos murinos infectados concomitantemente com cepas do grupo TcI e TcII obtidas naturalmente ou preparadas artificialmente, foi observado que cepas do grupo TcII apresentam maior infectividade e capacidade de multiplicação comparado às cepas do grupo TcI, o que levou à seleção das cepas do grupo TcII após múltiplas passagens *in vitro* em macrófagos. Foi observado também que a presença de IFN γ no meio de cultura não alterou a infecção e o crescimento de nenhuma das cepas quando as infecções foram realizadas separadamente, assim como foi observada produção semelhante de NO pelas cepas (Pena et al. 2011).

1.3 A resposta imune na infecção por *T. cruzi*

Durante o processo de evolução da infecção por *T. cruzi*, as respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem. Entretanto, a participação de cada uma destas respostas pode ser mais evidente em fases distintas da infecção. A resposta inata é normalmente mais importante nas fases iniciais da infecção, uma vez que linfócitos e anticorpos específicos precisam de um tempo para serem gerados. Por outro lado, a resposta adaptativa desempenha um papel importante após a cronificação da doença ou mesmo em respostas secundárias.

A ativação de uma resposta imune inata é crucial para o controle do parasitismo por *T. cruzi*, suprimindo a infecção e replicação do parasito. A resposta imune inata é iniciada por ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo que os receptores do tipo toll (TLRs) são os PRRs mais estudados. A ativação de TLR2, TLR4 e TLR9 é de grande importância para o controle do parasitismo, entretanto, sabe-se que, uma vez ativado em excesso, TLRs podem mediar patologia. A via de sinalização de TLRs consiste em duas cascatas: uma cascata MyD88 dependente (myeloid differentiation primary-response-gene-88) e uma cascata TRIF dependente (Toll/IL1R-domain containing adaptor protein inducing IFNbeta) ou MyD88 independente. A cascata MyD88 dependente leva à produção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de TLRs, entre eles estão TLR2 e TLR9, enquanto a cascata TRIF dependente está relacionada à indução de IFNs do tipo I por meio da ativação de TLR3 e TLR4 (Aoki et al. 2012).

Enquanto o envolvimento de TLR2 e TLR9 na doença de Chagas é bem descrito na literatura em modelos experimentais, o papel de TLR4 é controverso. Camundongos TLR2^(-/-) infectados produzem maiores quantidade de citocinas, sugerindo um papel predominantemente imunoregulatório durante a infecção aguda por *T. cruzi* ao atuar inicialmente expandindo Treg e

depois abolindo seu fenótipo supressivo. Sabe-se também, que a ativação de TLR2 por tripomastigotas leva à ativação de Rab5, com consequente fusão de endossomos e fagocitose em macrófagos murinos (Bafica et al. 2006). Entretanto, poucos estudos abordam o papel de TLR's na infecção por *T. cruzi* em humanos. No entanto, sabe-se que indivíduos com polimorfismos que levam à diminuição da transdução de sinal de TLR2 e TLR4 apresentam um menor risco de desenvolver cardiopatia chagásica crônica (Ramasawmy et al. 2009).

A indução de uma resposta imune celular eficiente é dependente da ativação de células apresentadoras de antígenos (APC). O estímulo de células T requer a interação entre o receptor destas (TCR) e o complexo peptídeo-MHC nas APCs. Nesse contexto, 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 (Janeway & Medzhitov 2002).

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 linfócitos T e que se ligam a receptores específicos presentes nas membranas das APCs. A via coestimulatória mais estudada e importante é dada pela interação CD28/CD80 e CD86. O CD28 estimula a proliferação linfocitária, produção de citocinas e impede o estado de anergia (Linsley & Ledbetter 1993) e divide sua habilidade de se ligar a membros da família B7 com o seu homólogo CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico) (Riley et al. 2012). A ligação de CTLA-4 a CD80/CD86 resulta na inibição da produção de interleucina 2 e consequente paralisação da progressão do ciclo celular de G0/G1, o que pode levar a morte celular por apoptose (Linsley et al. 1994).

Vários estudos relatam a importância das vias de ativação de macrófagos na infecção experimental de camundongos por *T. cruzi*. Na fase aguda, após interação com *T. cruzi*, macrófagos produzem citocinas inflamatórias como IL-12 e TNF- α , que ativam a produção de IFN- γ por células NK. O IFN- γ produzido, juntamente com TNF- α , ativa os macrófagos que produzirão derivados de oxigênio de forma a eliminar o parasito (Silva et al. 1992, Cardillo et al. 1996, Holscher et al. 1998). Abrahamsohn & Coffman (1996) observaram que camundongos *knock out* para IL-10, infectados experimentalmente com *T. cruzi*, apresentaram menor parasitemia e parasitismo tecidual e maior produção de IFN- γ e óxido nítrico por células do baço, quando comparados a camundongos selvagens infectados. Além disso, o aumento da parasitemia após neutralização de IFN- γ , TNF- α ou IL-12 com anticorpos monoclonais, demonstra a importância da produção endógena dessas citocinas no controle do parasitismo pelas respostas imunológicas inata e adaptativa (Abrahamsohn

& Coffman, 1996). Dados experimentais sugerem que citocinas anti-inflamatórias inibem a produção de IFN γ , diminuindo a atividade tripanocida de macrófagos (Silva et al. 1991 e Roffê et al. 2012).

O papel dos monócitos em humanos também já foi demonstrado por Souza e colaboradores (2004) que demonstraram que entre as células mononucleares de sangue periférico, os monócitos são a subpopulação leucocitária preferencialmente infectada por tripomastigotas de *T. cruzi*. Essas células têm um papel importante na infecção, apresentando um perfil imunomodulatório ativo, devido à sua elevada expressão de IL-10 e baixa expressão de HLA-DR (Souza et al. 2004). Em humanos, já foi demonstrado que a infecção por *T. cruzi* pode levar a produção de citocinas que diminuem a expressão de CD80 e CD86 por monócitos, diminuindo a resposta de células T, possivelmente favorecendo sua sobrevivência no hospedeiro (Souza et al. 2007). Sabe-se também que monócitos de pacientes com forma clínica cardíaca apresentam uma diminuição na expressão de CD86 (Souza et al. 2004).

Uma importante subpopulação de monócitos estudada neste trabalho é a CD16+, descrita em 1989, quando foram separados monócitos CD14+CD16+ e monócitos CD14+CD16- (Passlick et al. 1989). Estudos mostraram que a população CD14+CD16+ representa cerca de 10% de todos os monócitos em doadores saudáveis, entretanto essa subpopulação aumenta drasticamente em pacientes com infecção severa, como por exemplo, em pacientes em quadro de sepse (Fingerle et al. 1993, Blumenstein et al. 1997, Nockher & Scherberich 1998). Estes monócitos CD16+ expressam altos níveis de HLA-DR, marcador de ativação tardia, em comparação com os monócitos clássicos (CD16-), além de apresentar uma expressão distinta de citocinas. Em um estudo foi demonstrado que monócitos CD16+ são responsáveis pela maior frequência de produção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF α , após estímulos com LPS (Belge et al. 2002). Recentemente foi descrita a subdivisão de monócitos não clássicos em duas subpopulações. Uma subpopulação com alta expressão de CD14 e baixa expressão de CD16 (CD14++CD16+) que corresponde a 5% de todos os monócitos circulantes e são chamados monócitos intermediários, e uma segunda subpopulação com baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD16 (CD14+CD16++) que corresponde a 10% dos monócitos circulantes e são chamados monócitos não clássicos (Ziegler-Heitbrock 2010). Subpopulações de monócitos também já foram descritas em modelos murinos, sendo que, acredita-se que as subpopulações chamadas Gr1+ e Gr1- correspondem aos monócitos CD16+ e CD16- encontrados em humanos (Gonçalves et al. 2011). Entretanto, até este momento, faltam estudos que correlacionem o papel destas subpopulações na doença de Chagas ou na infecção de células humanas por *T. cruzi*, seja em modelo murino ou em humanos.

A importância de células T na resposta imune da doença de Chagas já foi demonstrada por vários autores. Sabe-se que a falta de células T CD4⁺ ou CD8⁺ resulta em uma infecção aguda descontrolada com consequente morte em modelos experimentais (Vieira et al. 2012, Domingues et al. 2012, Mariano et al. 2008, Padilla et al. 2008). Também já foi observada a presença de células T no infiltrado inflamatório de tecido endomiocárdico de pacientes infectados por *T. cruzi*, tanto em fase aguda, quanto na fase crônica da doença de Chagas (Fuenmayor et al. 2005, Reis et al. 1993). Sabe-se ainda que pacientes crônicos, independentemente de sua forma clínica, apresentam uma alta frequência de células T ativadas no sangue periférico (Dutra et al. 1994).

Após a ativação de linfócitos T, estes passam por uma série de modificações fenotípicas e bioquímicas. Algumas dessas modificações envolvem a expressão de moléculas da superfície celular, tais como HLA-DR. Em experimentos *ex vivo*, foi observado um aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando a molécula HLA-DR nos indivíduos chagásicos em relação aos não infectados (Dutra et al. 1994, Sathler-Avelar et al. 2003).

Apesar da grande importância de células T para o controle da parasitemia durante a fase aguda, conforme demonstrado em modelos experimentais, sabe-se que essas células T ativadas são os principais componentes do infiltrado inflamatório observado em pacientes cardíacos e digestivos, relacionando sua presença e o perfil de citocinas secretadas por elas com a patologia durante a fase crônica (da Silveira et al. 2007, Higuchi et al. 1997, Reis et al. 1993). Sendo assim, é consistentemente encontrado na literatura que o balanço de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias durante a fase crônica, caracterizada por alta expressão da citocina IL-10, está relacionado com a forma clínica indeterminada, enquanto a expressão majoritária e desbalanceada de citocinas inflamatórias, como por exemplo TNF α e IFN γ , está relacionada com o desenvolvimento de patologia, tanto na forma clínica cardíaca quanto na forma digestiva (Dutra et al. 2009).

Acredita-se que o principal mecanismo de proteção durante a fase aguda via células T CD8⁺ seja relacionado com a expressão de IFN γ ou indução de NO com consequente eliminação do parasitismo (Martin & Tarleton 2004). Recentemente, foram identificados, tanto em modelo murino quanto em humanos, por Martin e colaboradores (2008) peptídeos de proteínas trans-sialidases (conhecida como proteína Ts) como o alvo imunodominante de células T CD8⁺. No mesmo trabalho foi descrito que a expressão desses peptídeos varia entre diferentes cepas de *T. cruzi*, sugerindo que a ativação diferencial de células T CD8⁺ pode estar relacionada com uma resposta imune diferencial gerada pela infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*.

Como mencionado anteriormente, as formas clínicas da doença de Chagas apresentam diferenças no perfil de expressão de citocinas durante a fase crônica. Além do papel fundamental de citocinas como IL-10, TNF α e IFN γ , já vastamente descritas na literatura, recentemente foi sugerido pelo nosso grupo que a citocina IL-17 apresenta um importante papel protetor, estando relacionada com melhor função cardíaca em pacientes crônicos (Magalhães et al. 2013). Também foi demonstrado o papel de IL-17 em camundongos, correlacionando a produção dessa citocina com um perfil anti-inflamatório, controlando a produção de IFN γ e TNF α indiretamente, ao reduzir a produção de IL-12 (Guedes et al. 2010).

A maioria dos estudos feitos com infecções experimentais é padronizada utilizando cepas únicas, e pouco se sabe da diferença na ativação celular induzida por cepas de grupos distintos e se a provável seleção responsável pela presença única de cepas TcII em pacientes crônicos pode-se dever a alterações imunológicas. Assim sendo, nossa hipótese é que cepas pertencentes a grupos distintos infectam diferentemente células humanas, causando alterações imunológicas que podem influenciar no curso da infecção.



2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (Hotez et al. 2007). Existem cerca de 10 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo e mais de 25 milhões de pessoas em risco de infecção (WHO 2010). Somente no Brasil, estima-se que mais de US\$1,3 bilhão em salários e produtividade industrial já foram perdidos devido ao grande contingente de trabalhadores incapacitados pela doença de Chagas (DNDi 2011).

Em regiões geográficas distintas, a prevalência da forma clínica e mortalidade da doença de Chagas são diferentes. Essa divergência geográfica pode estar relacionada, em parte, a aspectos genéticos e competência imune da população humana local, mas alguns autores acreditam que a sua causa primária seja a diversidade genética do parasito (Buscaglia & Di Noia 2003).

Dessa forma, acreditamos que a tentativa de entender os aspectos imunológicos da infecção das diferentes cepas de *T. cruzi* em células humanas, seja extremamente importante para o conhecimento da biologia de *T. cruzi*, sendo também uma ferramenta útil para contribuir para o melhor entendimento da evolução das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.



3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da infecção com a cepa Y e com o clone Colombiana 1.7 de *Trypanosoma cruzi* em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos.

3.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar a frequência de monócitos humanos infectados com as diferentes cepas;
- ii. Avaliar a intensidade de infecção de monócitos humanos infectados com as diferentes cepas;
- iii. Avaliar a frequência das subpopulações CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁻ após exposição às cepas escolhidas.
- iv. Avaliar a expressão de moléculas de ativação por monócitos (TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80 e CD86) em humanos após infecção *in vitro* com a cepa Y e o clone Colombiana 1.7;
- v. Avaliar a expressão de citocinas imunorregulatórias (IL-12, TNF α e IL-10) induzidas pelas cepas escolhidas, por monócitos humanos;
- vi. Avaliar a expressão de moléculas de co-estimulatórias (CD69, HLA-DR, CD28 e CTLA-4) por linfócitos humanos após exposição *in vitro* por tripomastigotas da cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7;
- vii. Avaliar a expressão de molécula associada à atividade citotóxica (Granzima A) por linfócitos após a infecção pelas cepas escolhidas;
- viii. Avaliar a expressão de citocinas modulatórias (IFN γ , TNF α , IL-17 e IL-10) por linfócitos humanos após exposição às cepas escolhidas.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Doadores

Para a realização deste trabalho, foi coletado sangue de 9 indivíduos com sorologia negativa para *T. cruzi*. Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética COEP e aprovado, sob parecer de número ETIC 077/06.

4.2 Linhagens celulares para culturas de *T. cruzi*

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

Para o repique, as células foram lavadas com 10 mL de PBS (tampão salina fostato - Sigma) e então adicionado 1mL de tripsina (Sigma). As células foram, então, incubadas por 3 minutos em estufa úmida a 5% de CO₂, 37 °C. Após incubação com tripsina, as células foram recolhidas em tubo *Falcon* e centrifugadas a 128 g 10 minutos 4 °C e então contadas em câmara de Newbauer. Após a contagem, 2,0 x 10⁷ células eram colocadas novamente em cultura, conforme descrito, para proceder à manutenção da cultura.

4.3 Obtenção de parasitos

Foram utilizados tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 obtidos do sobrenadante de cultura de células VERO. Cerca de 2 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 x 10⁷ tripomastigotas das respectivas cepas de *T. cruzi* obtidos de sangue desfibrinado de camundongos infectados experimentalmente, ou de estoques mantidos a -80 °C congelados em DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma). Após acrescentar meio RPMI (Sigma) suplementado com 1% de SFB inativado e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL - GIBCO) as culturas de células infectadas foram mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado no quarto dia de infecção. A partir do quinto dia de cultura, os tripomastigotas começavam a ser liberados e o sobrenadante, contendo os parasitos, foi centrifugado a 1000 g, por 10 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi

desprezado e o precipitado ressuspenso com meio para 1 mL. Os parasitos foram contados, utilizando-se a câmara de Newbauer, e, então, utilizados nos ensaios de infecção.

4.4 Infecção das células para análise da diferença de infectividade entre as cepas de *T. cruzi* e expressão de moléculas de superfície e citocinas

O sangue retirado dos doadores foi dividido em grupos de acordo com o tempo de infecção, conforme o quadro 1, abaixo:

| Grupo infectado com tripomastigotas da cepa Y | Grupos infectados com tripomastigotas do Clone Colombiana 1.7 |
|--|--|
| 3 horas | 3 horas |
| 72 horas | 72 horas |

Quadro 1: Grupos experimentais de acordo com a cepa utilizada e o tempo de infecção.

Para que fosse possível a identificação dos monócitos infectados *in vitro* foi utilizado o CFDASE (5-(e-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Esse composto é internalizado pelas células e clivado por proteases endógenas, quando passa a emitir fluorescência. Além disso, após a clivagem, o CFSE fica impossibilitado de sair da célula onde se associa a proteínas do citoesqueleto. Para realizar a marcação, os tripomastigotas foram ressuspenso para a concentração de 6×10^7 parasitos/mL de RPMI, e o marcador CFSE (Molecular Probes) foi adicionado ao tubo na concentração final de $5 \mu\text{M}$. Após a incubação a 37°C por 15 minutos, os parasitos foram lavados com 10mL de PBS acrescido de 10% de SFB a 4°C 1000 g. Após outras duas lavagens com PBS, os tripomastigotas foram utilizados para a infecção *in vitro* do sangue total na concentração de dez tripomastigotas por célula. As infecções foram realizadas em tubos *Falcon* de 50mL por 3 e 72 horas em estufa úmida a 5% de CO_2 e 37°C . Após a infecção, os tubos contendo tripomastigotas foram lavados com 10mL PBS 1x e então centrifugados a 1000 g, 10 minutos a 4°C . Em todos os tubos foram adicionados 2mL de meio completo composto por RPMI, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL), 1% de L-glutamina (200nM - Sigma) e 10% de soro humano inativado (Sigma), e as células incubadas em estufa úmida a 5% de CO_2 , 37°C por 12 ou 68 horas. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionada brefeldina-A ($1 \mu\text{l/mL}$) aos tubos que são novamente incubados por mais 4 horas. Após a segunda incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 200 g, 10 minutos a 4°C . Ao fim da lavagem, as hemácias foram lisadas utilizando a solução comercial RBC “Lysis buffer” (BioLegend) em uma concentração 20mL de solução para 1mL de sangue total e os tubos

incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrida a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS1x e centrifugadas a 200 g 10 minutos 4 °C para a retirada das hemácias lisadas. Após a lise as células foram então transferidas para placas de 96 poços fundo em U para as análises de moléculas de superfície e citocinas; a cada poço foram adicionadas 2.5×10^5 células, que corresponde a 250 µl.

4.5 Reação de imunofluorescência para análise em citômetro de fluxo

Após o tempo de cultura, as células foram incubadas por 15 minutos a 4 °C com os anticorpos dirigidos contra moléculas de superfície diluídos em tampão PBS suplementado com 0,25% de BSA e 2mM de azida.

Posteriormente, as células submetidas apenas à marcação de superfície foram lavadas por duas vezes com PBS, a 4 °C, 200 g e fixadas pela adição de 150 µl solução de formaldeído 2% por 20 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 200 g, por 8 minutos a 4 °C. Os pellets foram ressuspensos com formaldeído 2% para um volume final de 400 µl e as células transferidas para tubos apropriados para a aquisição em citômetro de fluxo.

Aquelas células que foram submetidas à marcação intracitoplasmática foram permeabilizadas com solução tampão de saponina 0,5% em PBS durante 15 minutos a 4 °C, centrifugadas e, incubadas com anticorpos anti-citocinas diluídos no mesmo tampão utilizado para permeabilização por 30 minutos a 4 °C.

Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS1x e centrifugadas a 200 g, 8 minutos a 4 °C. Em seguida as células foram fixadas com formaldeído 2% e transferidas para tubos de citometria como descrito acima.

Os anticorpos utilizados durante o trabalho estão organizados no quadro 2.

| Anticorpo | Fluorocromo | Marca | Lote | Clone | Volume utilizado |
|------------------|--------------------|--------------|-------------|---------------------|-------------------------|
| IgG1/Ig2a | Fitc/Pe | BioLegend | 75238 | MOPC-21/ MOPC173 | 1,5µl/well |
| TNF α | Pe | eBioscience | E02153-1630 | MAb11 | 1,5µl/well |
| CTLA-4 | Pe | eBioscience | E025720 | eBio20A | 1,5µl/well |
| CD4 | Pe | eBioscience | E10207-101 | RPA-T4 | 1,5µl/well |
| IL-12 | Pe | eBioscience | E026304 | eBioHP40 | 1,5µl/well |
| TLR-4 | Pe | eBioscience | E016986 | HTA125 | 1,5µl/well |
| CD69 | Pe | eBioscience | E031947 | FN50 | 1,5µl/well |
| TLR2 | Pe | eBioscience | E016433 | TL2.1 | 1,5µl/well |
| Granzima A | Pe | Pharmingen | 75238 | MOPC-21 | 1,5µl/well |
| IL-10 | Pe | eBioscience | E02098-1630 | JES3-9D7 | 1,5µl/well |
| CD14 | APC | bioLegend | B136142 | M5E2 | 1,5µl/well |
| TNF α | APC | bioLegend | B136042 | MAb11 | 1,5µl/well |
| CD28 | APC | bioLegend | B143374 | CD28.2 | 1,5µl/well |
| CD8 | Pe-Cy7 | bioLegend | B140129 | Sk1 | 1,5µl/well |
| HLA-DR | Pe-Cy7 | bioLegend | B147634 | L243 | 1,5µl/well |
| CD80 | Pe-Cy7 | bioLegend | B132813 | 2D10 | 1,5µl/well |
| IL-17 | Pacific Blue | bioLegend | B128394 | BL168 | 1,5µl/well |
| IFN γ | Pacific Blue | bioLegend | B141650 | 45.B3 | 1,5µl/well |
| CD86 | Pacific Blue | bioLegend | B138152 | IT2.2 | 1,5µl/well |
| CD4 | APC-Cy7 | bioLegend | B139849 | OKT4 | 1,5µl/well |
| CD16 | APC-Cy7 | bioLegend | B140788 | 3G8 | 1,5µl/well |

Quadro 2: Lista de anticorpos utilizados nos experimentos.

4.6 Análises em citômetro de fluxo

As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACScanto), que permite a detecção pela dispersão do raio laser que incide sobre uma célula incubada com anticorpo fluorescente. Foram adquiridas uma média de 30.000 células para cada amostra. Para a realização das análises foi utilizado o programa Flow-Jo.

Utilizando o Flow-Jo selecionamos a população a ser estudada de acordo com cada objetivo específico. Para a análise da porcentagem de monócitos CFSE+ foi selecionado a subpopulação de monócitos CD14+ e então pedido o histograma de CFSE (Figura 1A). Para o monócitos foi pedido as moléculas de interesse a partir da subdivisão em CD14+CFSE+ e CD14+CFSE- ou a partir das subpopulações CD16+ e CD16- (Figura 1B). Para a análise de linfócitos foi selecionada a população no gráfico de tamanho versus granulosidade e pedido a molécula de interesse contra CD4 ou CD8 (Figura 1C).

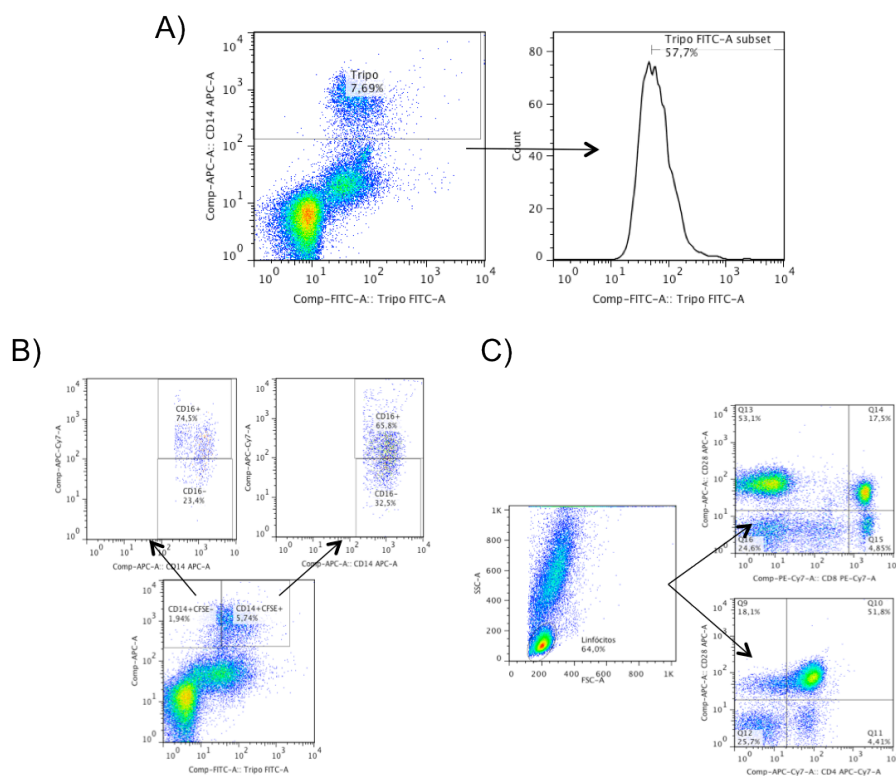


Figura 1: Estratégia de análise utilizada na dissertação. A) Análise de monócitos CD14+CFSE+. B) Análise das subpopulações de monócitos. C) Análise de linfócitos.

4.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados pelo teste t pareado ou não pareado quando a distribuição foi normal e pelo teste Wilcoxon ou Mann-Whitney quando não normal do programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.



5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise de frequência de células CD14+CFSE+

Tripomastigotas da cepa Y e o clone Colombiana 1.7 foram previamente marcadas com CFSE, o que permitiu a avaliação de células CD14+CFSE+ após 3 e 72 horas de infecção. Observou-se que cerca de 70% das células CD14+ estavam expressando também CFSE. Não foi observada diferença significativa entre a percentagem de células CD14+CFSE+ nas amostras infectadas com a cepa Y e o clone Colombiana 1.7. Entretanto pode-se observar uma diminuição da frequência de células CD14+CFSE+ quando infectadas pelo clone Colombiana 1.7, comparando-se o tempo de 72 horas com o tempo de 3 horas de infecção. O mesmo não foi observado quando a infecção foi realizada pela cepa Y (Figura 2A). Também foi avaliada a intensidade média de fluorescência das células CD14+CFSE+ infectadas com os diferentes isolados e após os diferentes tempos. Não foi observada diferença significativa quando se comparou cada cepa nos diferentes tempos de cultura (Figura 2B).

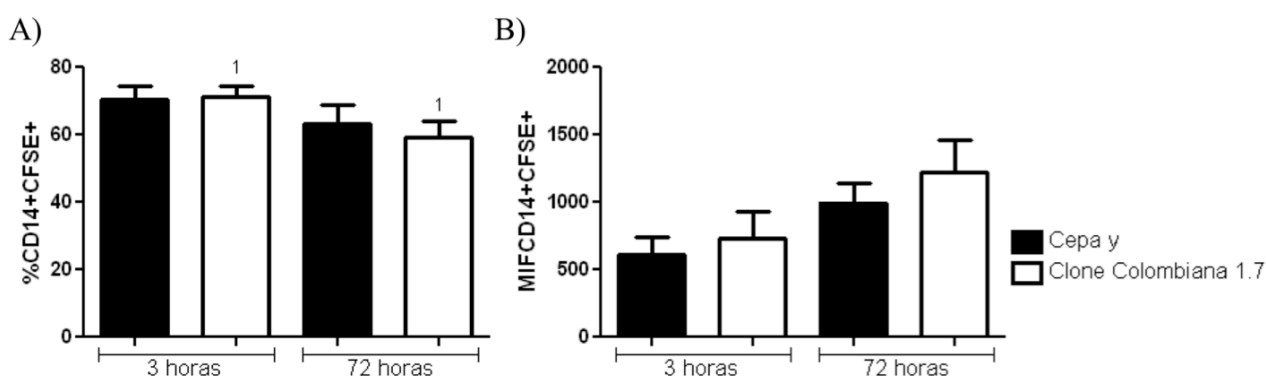


Figura 2: Avaliação da frequência e intensidade média de fluorescência de células CD14+CFSE+ infectadas com os diferentes isolados e em diferentes tempos de cultura. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em cada gráfico, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de células CD14+CFSE+. 1 - valor de $p=0,03$. B) Intensidade média de fluorescência (MIF) de CD14+CFSE+.

5.2 Análise da expressão de CD16 em subpopulações de monócitos

Foi realizada a separação da população de células CD14+ em subpopulações CD16+ e CD16-, uma vez que a subpopulação CD16+ já foi apontada como uma população que apresenta expansão após quadros de inflamação. Acredita-se que a subpopulação CD16+ também apresente uma expressão diferencial de citocinas, expressando maior quantidade de HLA-DR e sendo chamada de uma população pró-inflamatória (Belge et al. 2002). Foi observado um aumento na frequência de células

CD14+CD16+ após 72 horas infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 em comparação com 3 horas de infecção na subpopulação CFSE+ bem como em CFSE- (Figura 3A e B). Em contraste, foi observada uma diminuição na frequência de células CD16- após 72 horas de infecção pelas duas cepas em comparação com 3 horas de infecção, nas duas subpopulações, CFSE+ e CFSE- (Figura 3C e D).

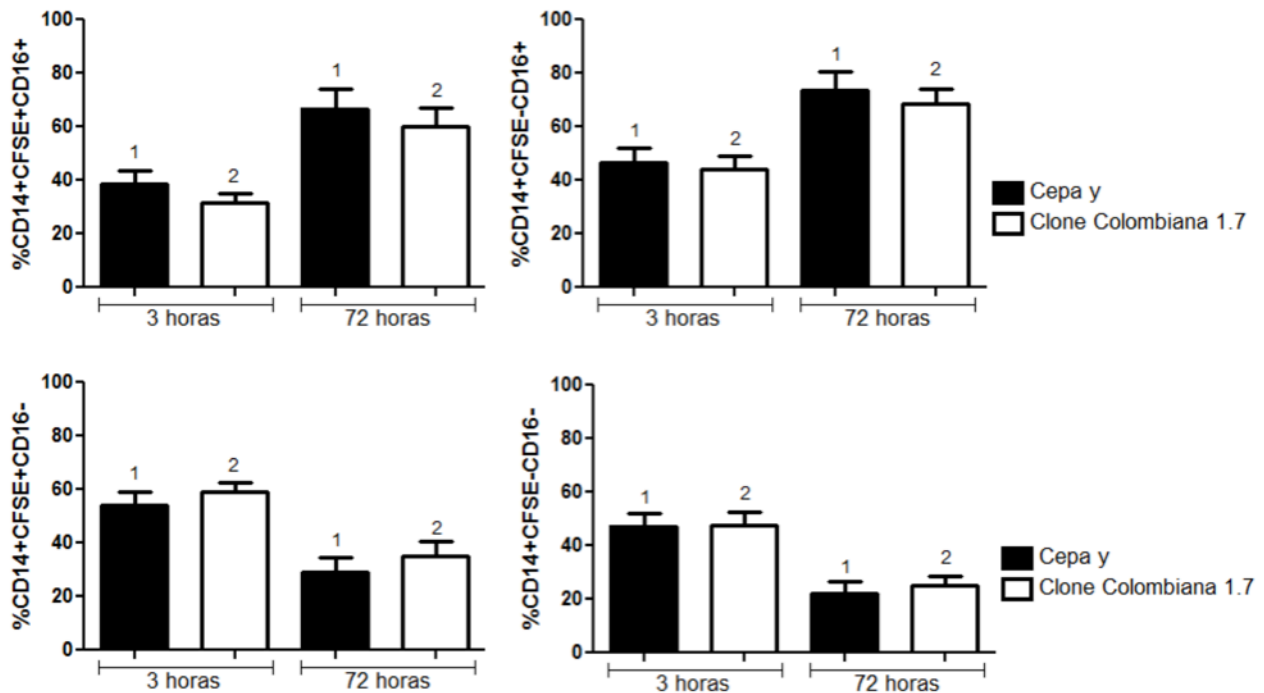


Figura 3: Avaliação da frequência de células CD14+CD16+ infectadas com os diferentes isolados e em diferentes tempos de cultura. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em cada gráfico, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de células CD14+CFSE+CD16+. Valor de p 1=0,005, 2=0,001 B) Frequência de células CD14+CFSE-CD16+. Valor de p 1=0,007, 2=0,007. C) Frequência de células CD14+CFSE+CD16-. Valor de p 1=0,005, 2=0,001. D) Frequência de células CD14+CFSE-CD16-. Valor de p 1=0,002, 2=0,003.

5.3 Análise da expressão de TLR2 em monócitos

Na análise da expressão de TLR2, foi observado um aumento na frequência de expressão desse receptor após 72 horas de infecção em monócitos CD16+CFSE+ no grupo infectado pela cepa Y, em comparação com 3 horas de infecção pela mesma cepa; o mesmo não ocorreu após infecção pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 4A). Também foi possível observar uma maior expressão de TLR2 após 72 horas de infecção pela cepa Y em relação ao mesmo tempo de infecção pelo clone Colombiana 1.7. (Figura 4A) Não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão de TLR2 por monócitos CFSE+CD16- (Figura 4B). Assim como não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão do TLR2 por monócitos CFSE-, quer fossem CD16+ ou CD16- (Figura 4C e D).

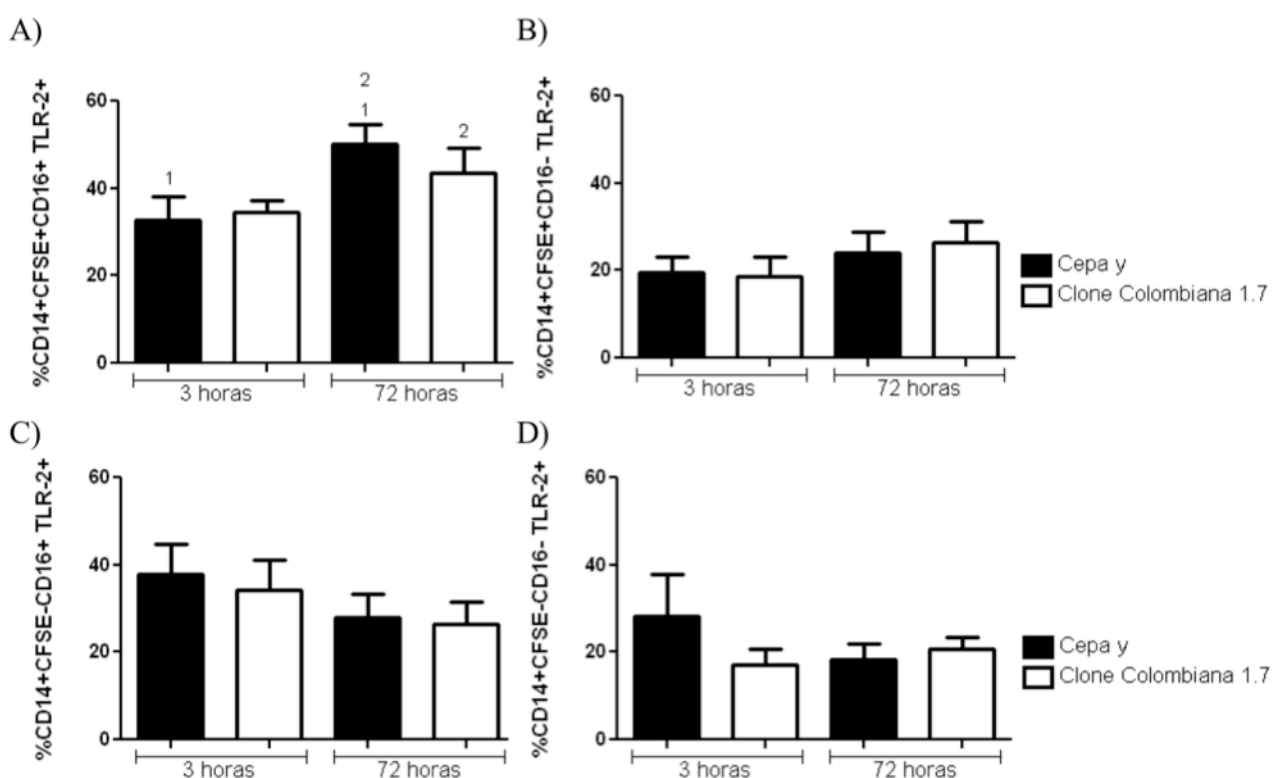


Figura 4: Frequência de expressão de TLR2. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de TLR2 em células CD14+CFSE+CD16+. Valor de p 1=0,03 e 2=0,04 B) Frequência de TLR2 em células CD14+CFSE+CD16- C) Frequência de TLR2 em células CFSE-CD16+. D) Frequência de TLR2 em células CFSE-CD16-.

Foi observado um aumento da intensidade média de fluorescência (MIF) de expressão de TLR2 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7. O mesmo não foi observado após a infecção pela cepa Y em relação ao tempo de 3 horas, (Figura 5A). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos infectados por Y e Colombiana 1.7 entre si na população CFSE+CD16+, em 3 e 72 horas de infecção (Figura 5A). Em relação à intensidade média de fluorescência de TLR2, foi observado um aumento após 72 horas de infecção pela cepa Y nos monócitos CFSE+CD16- comparando-se ao tempo de 3 horas. Entretanto, não houve diferença significativa na MIF após a infecção pelo clone Colombiana 1.7 na mesma população (Figura 5B). Também não foram observadas diferenças significativas na intensidade média de fluorescência em monócitos CFSE-, tanto na população CD16+ quanto em CD16-, fosse comparando a infecção por 3 e 72 horas entre Y e Colombiana 1.7, ou analisando as cepas separadamente nos diferentes tempos (Figuras 5C e D).

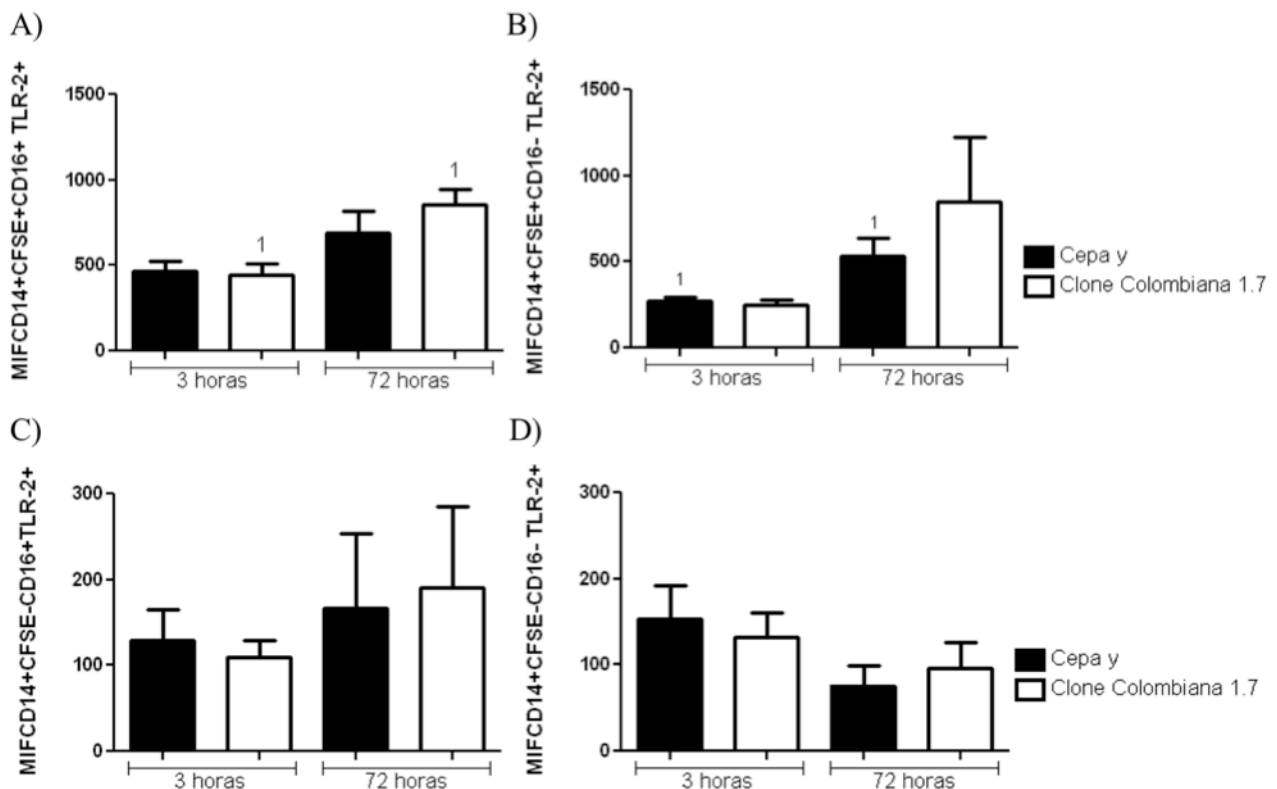


Figura 5: Intensidade média de fluorescência de expressão de TLR2. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) MIF de TLR2 em células CFSE+CD16+. Valor de $p=0,003$. B) MIF de TLR2 em células CFSE+CD16-. Valor de $p=0,02$. C) MIF de TLR2 em células CFSE-CD16+. D) MIF de TLR2 em células CFSE-CD16-.

5.4 Análise da expressão de TLR4 em monócitos

Na análise de frequência de expressão de TLR4 não foi encontrada diferença significativa na população de monócitos CFSE+, fossem eles CD16+ ou CD16-, tanto quando foi analisada a infecção por Y e Colombiana 1.7 em 3 e 72 horas, quanto quando analisada a infecção por cada cepa separadamente (Figura 6A e B). O mesmo ocorreu quando analisada a população CFSE-CD16+ (Figura 6C). Na população CFSE-CD16-, foi observada uma maior expressão de TLR4 pelos monócitos infectados com a cepa Y comparada ao clone Colombiana 1.7 após 3 horas de infecção. O mesmo não foi observado após 72 horas. Foi observada também uma maior expressão de TLR4 pelo clone Colombiana 1.7 em 72 horas de infecção em relação ao tempo de 3 horas, o que não ocorreu com o grupo infectado pela cepa Y (Figura 6D).

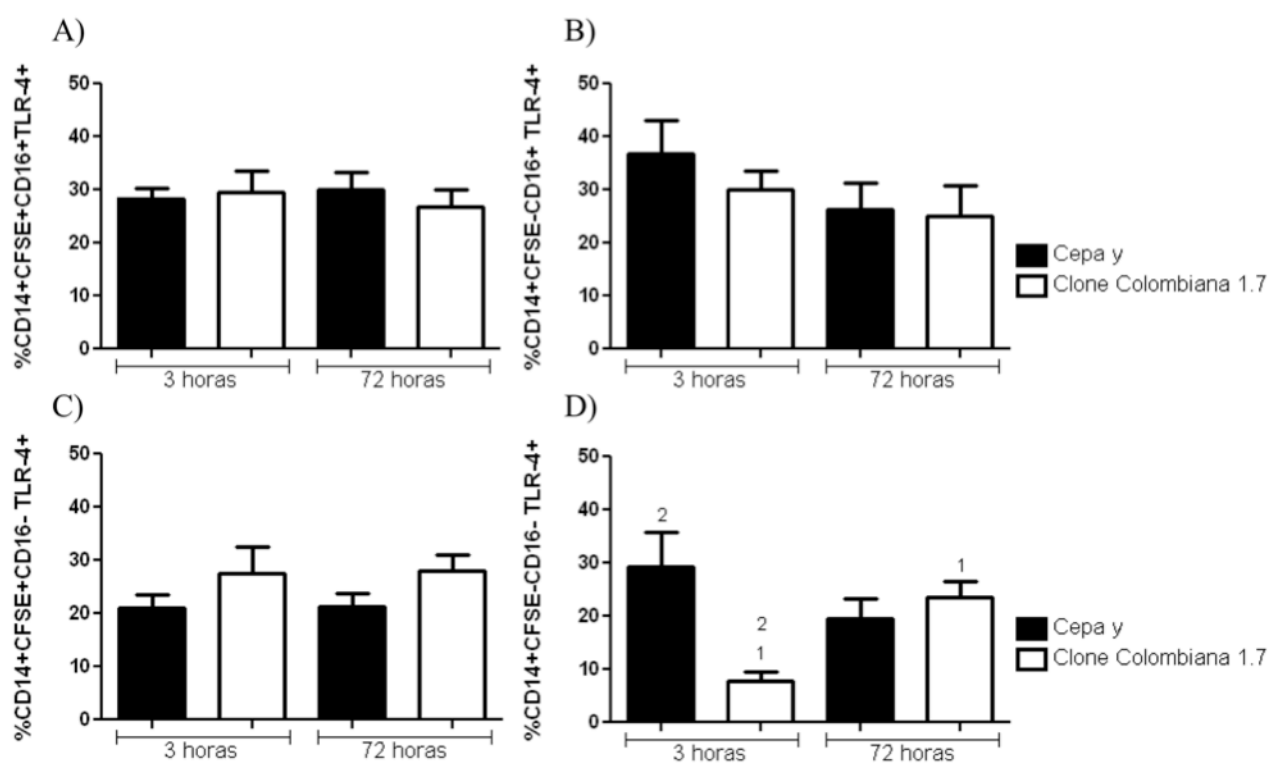


Figura 6: Frequência de expressão de TLR4. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de TLR4 em células CD14+CFSE+CD16+. B) Frequência de TLR4 em células CD14+CFSE+CD16- C) Frequência de TLR4 em células CFSE-CD16+. D) Frequência de TLR4 em células CFSE-CD16-. Valor de p 1<0,001 e 2=0,01.

Quando se analisou a intensidade média de fluorescência de TLR4 não foi observada diferença significativa na população de monócitos CFSE+CD16+ tanto ao observamos a infecção por Y e Colombiana 1.7 separadamente nos diferentes tempos de infecção, quanto ao analisar as duas cepas entre si em 3 e 72 horas de infecção (Figura 7A). Para a população de monócitos CFSE+CD16-, ocorreu um aumento na intensidade média de fluorescência após 72 horas de infecção pela cepa Y e também pelo clone Colombiana 1.7, comparado com o tempo de infecção de 3 horas. Não se encontrou diferença significativa quando comparados Y e Colombiana 1.7 entre si após 3 ou 72 horas de infecção (Figura 7B). Nas populações de monócitos CFSE-CD16+ e CFSE-CD16- não foram observadas diferenças estatísticas em Y e Colombiana 1.7, independentemente se analisadas entre si ou separadamente, após 3 e 72 horas de infecção (Figuras 7C e D).

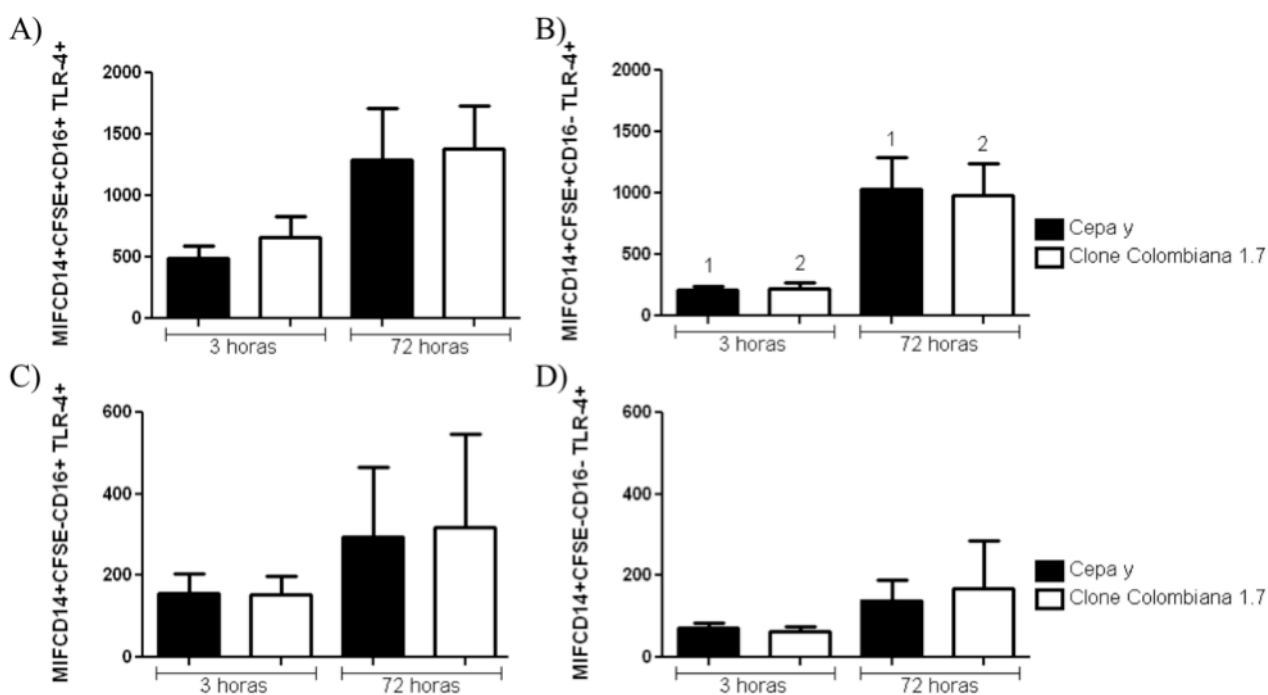


Figura 7: Intensidade média de fluorescência de TLR4. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) MIF de TLR4 em células CFSE+CD16+. B) MIF de TLR4 em células CFSE+CD16-. Valor de $p_1=0,003$ e $p_2=0,006$. C) MIF de TLR4 em células CFSE-CD16+. D) MIF de TLR4 em células CFSE-CD16-.

5.5 Análise da expressão de HLA-DR em monócitos

Não foram observadas diferenças significativas na frequência de expressão de HLA-DR em monócitos CFSE+ e CFSE- após a infecção por 3 e 72 horas pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 8A e B). Também não houve diferença estatística para intensidade média de fluorescência de expressão de HLA-DR (Figura 8C e D).

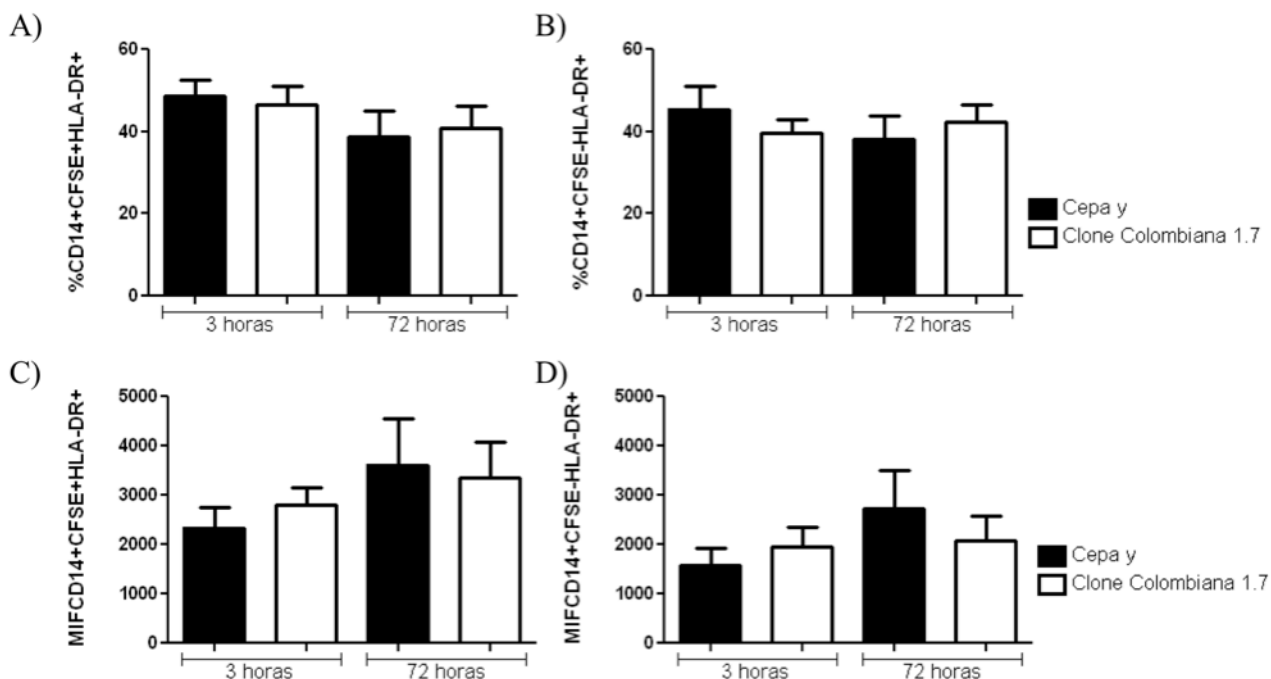


Figura 8: Frequência de expressão de HLA-DR. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de HLA-DR em células CD14+CFSE+. B) Frequência de HLA-DR em células CD14+CFSE-. C) Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em células CD14+CFSE+. D) Intensidade média de fluorescência de HLA-DR em células CD14+CFSE-.

5.6 Análise da expressão de CD80 em monócitos

Houve um aumento na frequência de expressão de CD80 por monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 comparando-se ao tempo de 3 horas. No entanto, o mesmo não foi observado após infecção pela cepa Y. Quando comparadas infecções pelas cepas entre si nos dois tempos, não houve diferença significativa (Figura 9A). Também não foram observadas diferenças significativas em relação à expressão de CD80 por monócitos CFSE+CD16- entre os grupos infectados pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 9B). Ao analisar a expressão de CD80 por monócitos CFSE-CD16+, percebeu-se redução na expressão após 72 horas de infecção pela cepa Y comparando-se a 3 horas de infecção, diferentemente de infecção pelo clone Colombiana 1.7, onde não houve diferença estatística. Não foram observadas diferenças significativas quando comparados os dois grupos de cepas entre si (Figura 9C). Contudo, foi encontrada uma diminuição na expressão de CD80 por monócitos CFSE-CD16- após 72 horas de infecção pela cepa Y, comparando-se a 3 horas de infecção, bem como após a infecção pelo clone Colombiana 1.7. Quando comparadas as cepas entre si, nos diferentes tempos de infecção, não houve diferença significativa nessa população celular (Figura 9D).

Quando analisada a intensidade média de fluorescência de expressão de CD80, não foi encontrada diferença significativa em monócitos CFSE+CD16+ após a infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 por 3 e 72 horas de infecção (Figura 10A). Entretanto, em monócitos CFSE+CD16- foi observado um aumento na intensidade média de fluorescência após 72 horas de infecção pela cepa Y, o mesmo não foi encontrado após infecção pelo clone Colombiana 1.7. Não houve diferença significativa quando comparadas as cepas entre si (Figura 10B). Quando analisada a população de monócitos CFSE- não foram encontradas diferenças estatísticas, fosse em células CD16+ ou CD16- após 3 e 72 horas de infecção pelas duas cepas.

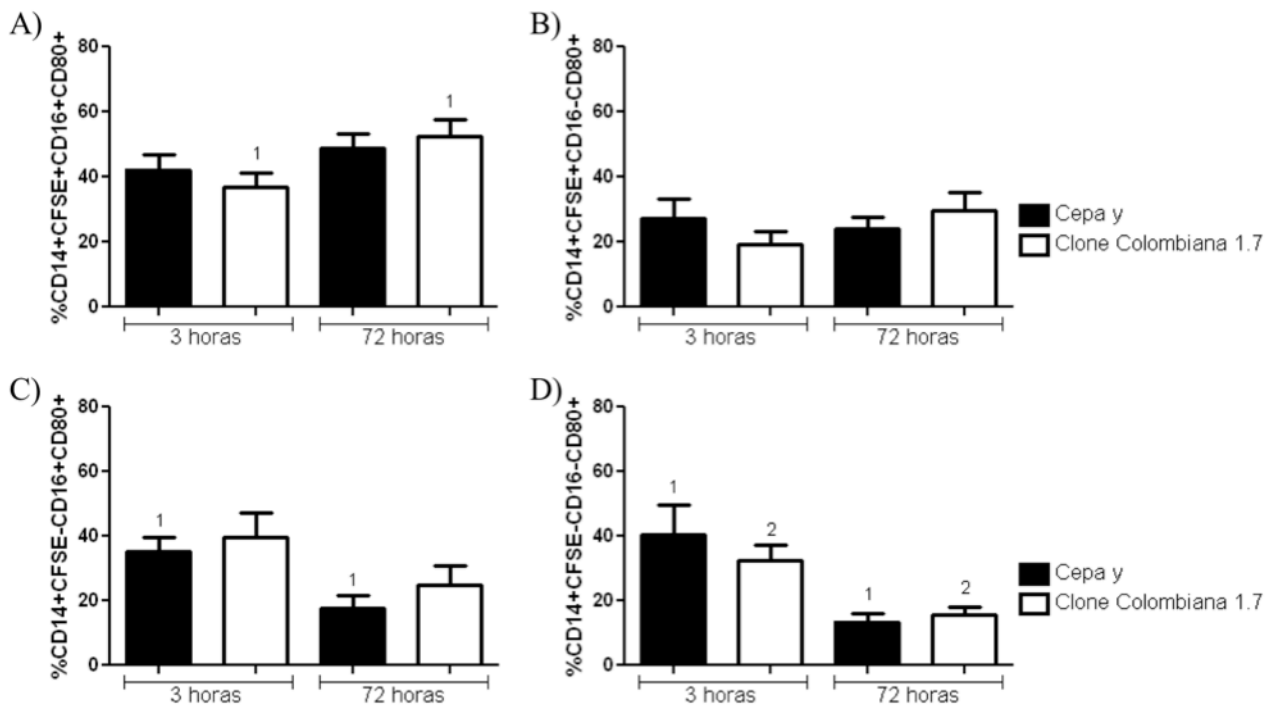


Figura 9: Frequência de expressão de CD80. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de CD80 em células CD14+CFSE+CD16+. Valor de p 1=0,03. B) Frequência de CD80 em células CD14+CFSE+CD16-. C) Frequência de CD80 em células CFSE-CD16+. Valor de p 1=0,01. D) Frequência de CD80 em células CFSE-CD16-. Valor de p 1=0,02 e 2=0,01.

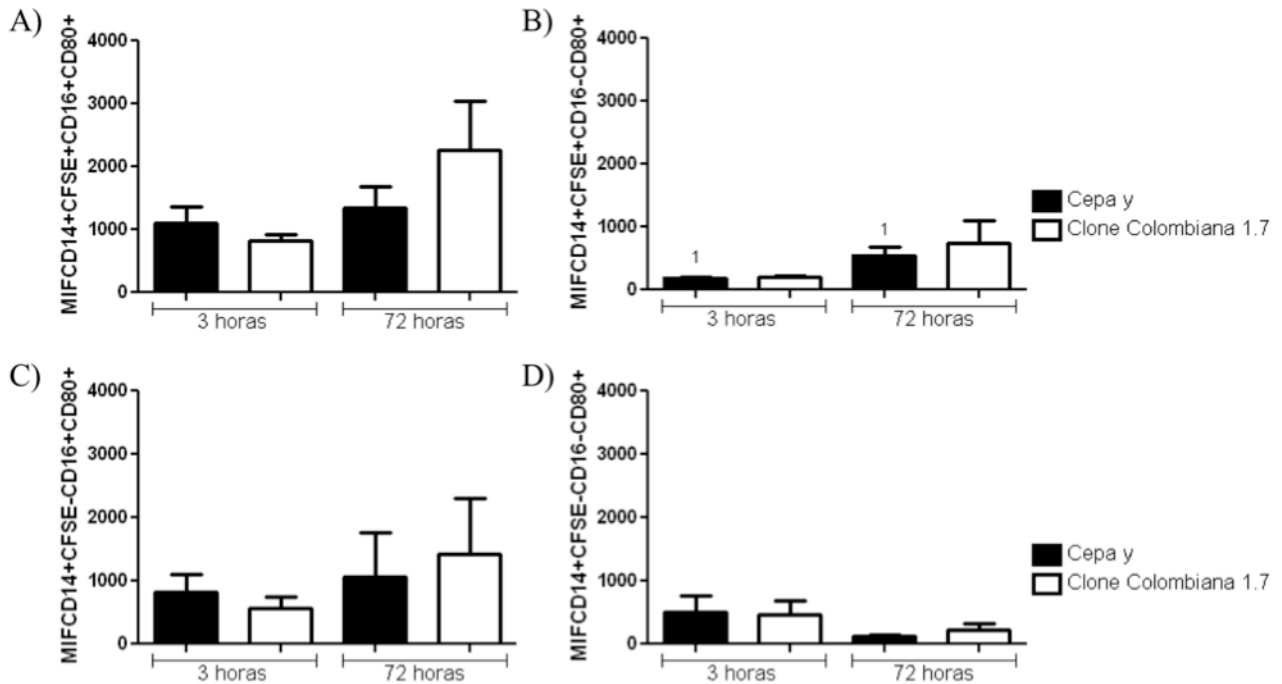


Figura 10: Intensidade média de fluorescência de expressão de CD80. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) MIF de CD80 em células CFSE+CD16+. B) MIF de CD80 em células CFSE+CD16-. Valor de $p = 0,009$. C) MIF de CD80 em células CFSE-CD16+. D) MIF de CD80 em células CFSE-CD16-.

5.7 Expressão de CD86 em monócitos

Foi observado um aumento na frequência de expressão de CD86 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 comparando-se a 3 horas de infecção. Todavia, essa diferença não pode ser observada após infecção com a cepa Y. Também não houve diferença significativa entre as duas cepas com 3 ou 72 horas de infecção (Figura 11A), bem como não foi observada qualquer diferença significativa na expressão de CD86 por monócitos CFSE+CD16- após a infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 11B). Observou-se, também, uma diminuição na frequência de expressão de CD86 em monócitos CFSE-CD16+ após 72 horas de infecção pela cepa Y comparando-se a 3 horas de infecção, o que não aconteceu após a infecção pelo clone Colombiana 1.7. A expressão de CD86 por monócitos CFSE-CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 foi maior do que a expressão dessas células quando infectadas pela cepa Y no mesmo tempo de infecção, o que não ocorreu após 3 horas de infecção (Figura 11C). Não houve diferença significativa quando analisada a população de monócitos CFSE-CD16- (Figura 11D).

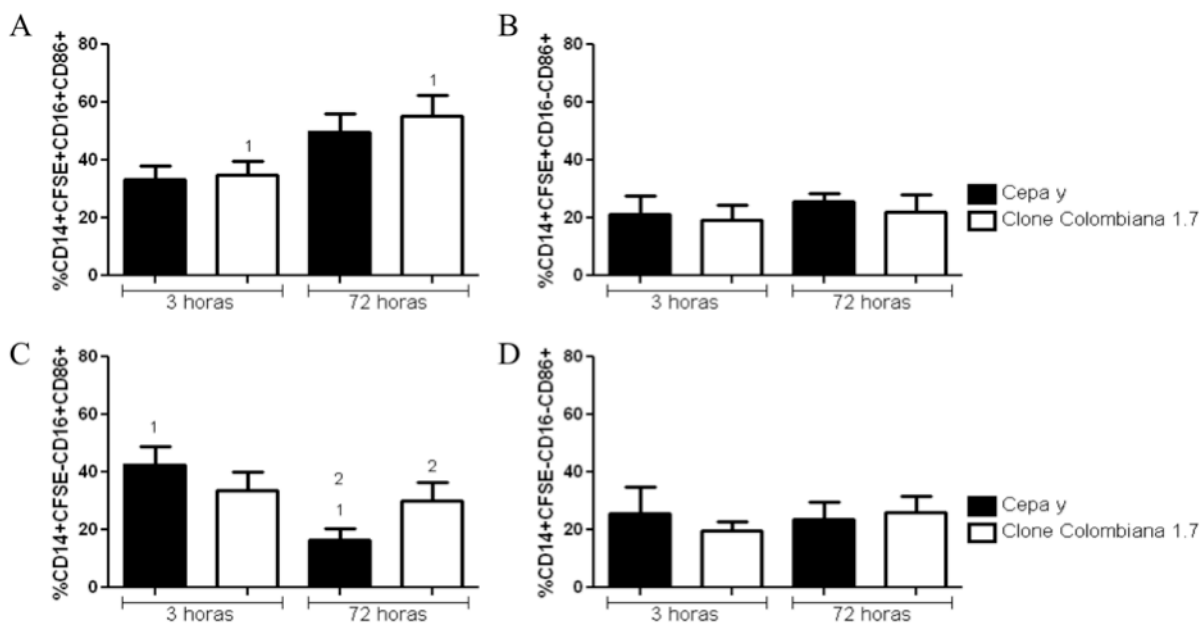


Figura 11: Frequência de expressão de CD86. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de CD86 em células CD14+CFSE+CD16+. Valor de $p_1=0,02$. B) Frequência de CD86 em células CD14+CFSE+CD16-. C) Frequência de CD86 em células CFSE-CD16+. Valor de $p_1=0,004$ e $p_2=0,04$. D) Frequência de CD86 em células CFSE-CD16-.

A intensidade média de fluorescência de expressão de CD86 em monócitos CFSE+CD16+ infectados com o clone Colombiana 1.7 foi maior após 72 horas do que 3 horas de infecção, o que não aconteceu quando infectados com a cepa Y. Também foi possível observar uma maior intensidade média de fluorescência de expressão de CD86 após 72 horas de infecção por Colombiana 1.7 comparado ao mesmo tempo de infecção pela cepa Y; entretanto essa diferença não foi observada após 3 horas de infecção (Figura 12A). Um aumento na intensidade média de fluorescência de expressão de CD86 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção foi observado tanto para a cepa Y quanto para o clone Colombiana 1.7. Também foi observada uma maior intensidade média de fluorescência de CD86 no grupo infectado por 3 horas pela cepa Y comparado ao mesmo tempo de infecção pelo clone Colombiana 1.7, mas o mesmo não pode ser observado para 72 horas de infecção (Figura 12B). Não houve, também, diferenças significativas quando analisadas as populações de monócitos CFSE-, tanto CD16+ quanto CD16- (Figuras 12C e D).

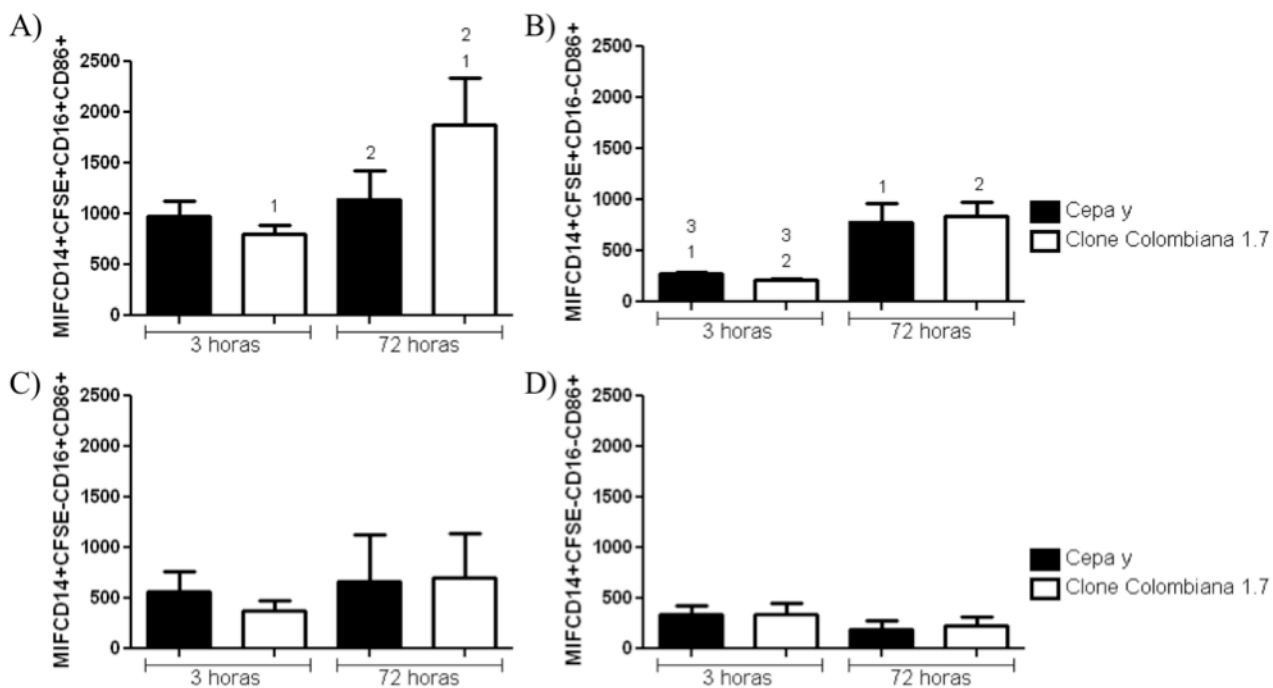


Figura 12: Intensidade média de fluorescência de CD86. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) MIF de CD86 em células CFSE+CD16+. Valor de p 1=0,02 e 2=0,04. B) MIF de CD86 em células CFSE+CD16-. Valor de p 1=0,006, 2<0,001 e 3=0,02. C) MIF de CD86 em células CFSE-CD16+. D) MIF de CD86 em células CFSE-CD16-.

5.8 Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas.

O Quadro 3 resume os resultados obtidos pela análise da expressão de moléculas de ativação após infecção com a cepa Y e o clone Colombiana 1.7, por 3 e 72 horas, em populações CD16+ e CD16- de monócitos.

| Cepa Y | Clone Colombiana 1.7 |
|---|--|
| ↑ %TLR2 em CFSE+CD16+ em relação a Colombiana após 72h | ↓ %TLR2 em CFSE+CD16+ em relação a Y após 72h |
| ↑ %TLR4 em CFSE-CD16- em relação a Colombiana após 3h | ↓ %TLR4 em CFSE-CD16- em relação a Y após 3h |
| ↓ %CD86 em CFSE-CD16+ em relação a Colombiana após 72h | ↑ %CD86 em CFSE-CD16+ em relação a Y após 72h |
| ↓ MIF CD86 em CFSE+CD16+ em relação a Colombiana após 72h | ↑ MIF CD86 em CFSE+CD16+ em relação a Y após 72h |
| ↑ MIF CD86 em CFSE+CD16- em relação a Colombiana após 72h | ↓ MIF CD86 em CFSE+CD16- em relação a Y após 72h |

Quadro 3: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas (p<0,05).

5.9 Expressão de IL-12 em monócitos

Após análise da expressão de IL-12 não foram observadas diferenças estatísticas na frequência de expressão dessa citocina, tanto para monócitos CFSE+ quanto para CFSE-, após a infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 por 3 e 72 horas (Figura 13A e B). Percebeu-se um aumento na intensidade média de fluorescência de IL-12 em monócitos CFSE+ após 72 horas de infecção pela cepa Y comparando-se a 3 horas de infecção, o que não foi observado após infecção pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 13C). Foi observado, também, um aumento na intensidade média de fluorescência de expressão de IL-12 após 72 horas de infecção pela cepa Y comparando-se ao tempo de 3 horas de infecção; o mesmo efeito foi observado após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 13D).

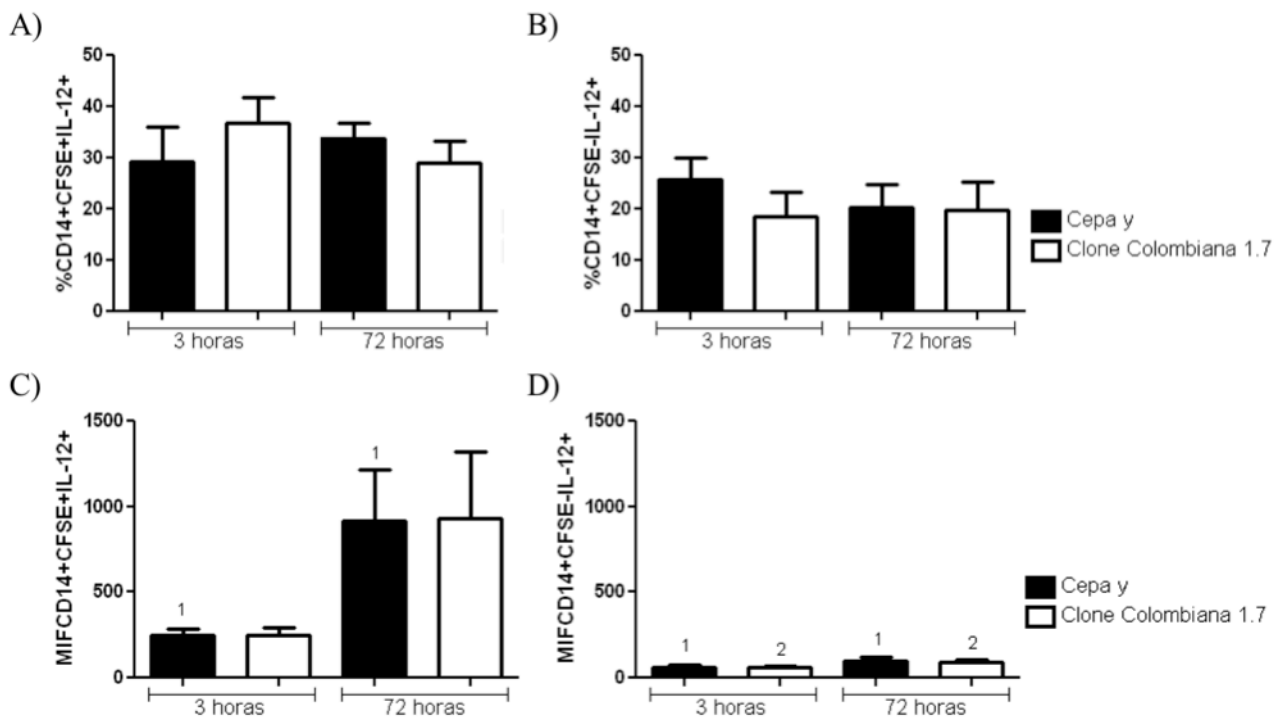


Figura 13: Frequência de expressão de IL-12. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de expressão de IL-12 em monócitos CFSE+. B) Frequência de expressão de IL-12 em monócitos CFSE-. C) MIF de IL-12 em monócitos CFSE+. Valor de $p_1=0,04$. D) MIF de IL-12 em monócitos CFSE-. Valor de $p_1=0,03$ e $p_2=0,03$.

5.10 Expressão de TNF α por monócitos

Não foi observada diferença significativa na frequência de expressão de TNF α em monócitos CFSE+ após a infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 por 3 ou 72 horas (Figura 14A). Entretanto, houve uma diminuição da frequência de expressão de TNF α por monócitos CFSE- após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7, comparando-se a 3 horas; o mesmo não foi observado para a infecção pela cepa Y (Figura 14B). Em relação à intensidade média de fluorescência de expressão de TNF α em monócitos CFSE+ e CFSE-, não foram observadas diferenças significativas após a infecção por 3 ou 72 horas, seja com a cepa Y ou com o clone Colombiana 1.7 (Figura 14C e D).

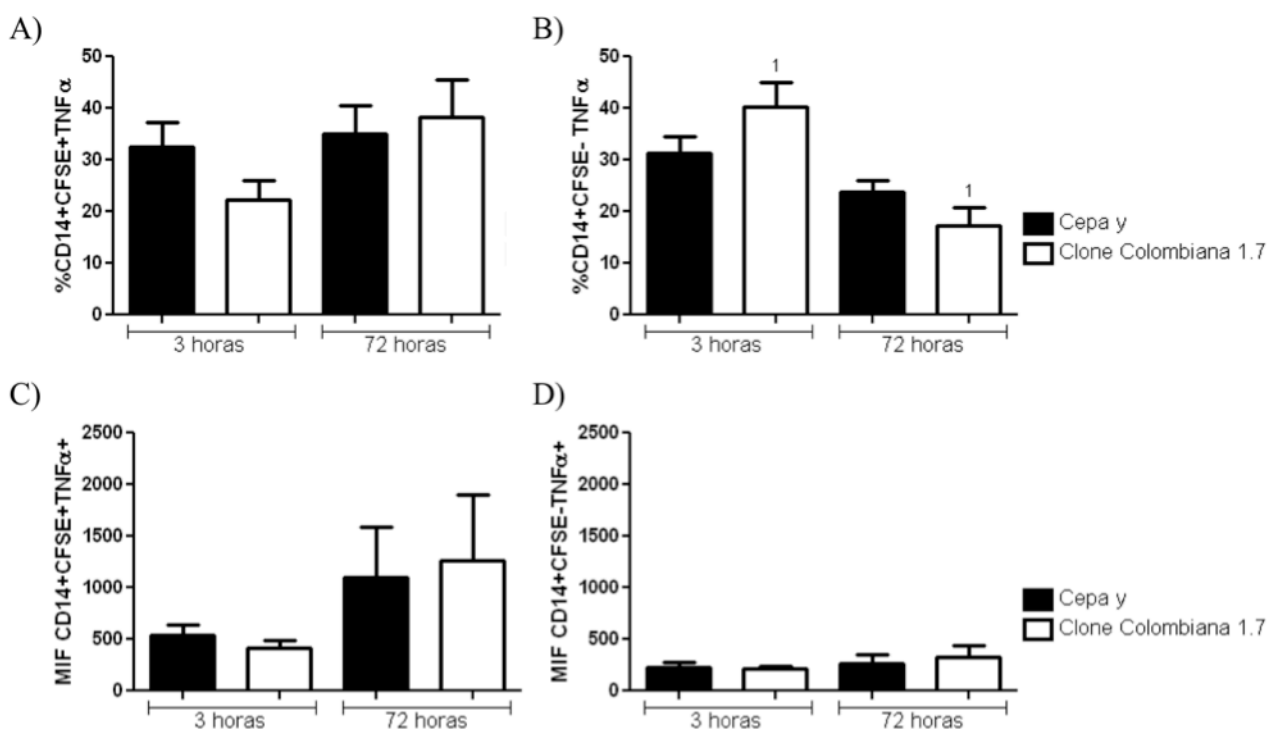


Figura 14: Frequência de expressão de TNF α . Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de expressão de TNF α em monócitos CFSE+. B) Frequência de expressão de TNF α em monócitos CFSE-. Valor de p 1=0,002. C) MIF de TNF α em monócitos CFSE+. D) MIF de TNF α em monócitos CFSE-.

5.11 Expressão de IL-10 por monócitos

Foi observada uma maior expressão de IL-10 em monócitos CFSE+ infectados após 3 horas pelo clone Colombiana 1.7 em comparação à infecção pela cepa Y no mesmo tempo de infecção. O mesmo não foi observado quando a infecção foi realizada por 72 horas (Figura 15A). Não houve diferença significativa quando se comparou a infecção pelas cepas individualmente após 3 ou 72 horas de infecção (Figura 15A). Todavia, foi observada uma diminuição na frequência de expressão de IL-10 por monócitos CFSE- após 72 horas de infecção pela cepa Y comparando-se a 3 horas de infecção, assim como após o mesmo tempo de infecção pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 15B). Não observou-se diferença estatística na intensidade média de fluorescência de IL-10 para a população de monócitos CFSE+ (Figura 15C). Contudo, foi observado um aumento na intensidade média de fluorescência de IL-10 em monócitos CFSE- após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 comparando-se a 3 horas de infecção. O mesmo não foi observado para a infecção pela cepa Y (Figura 15D).

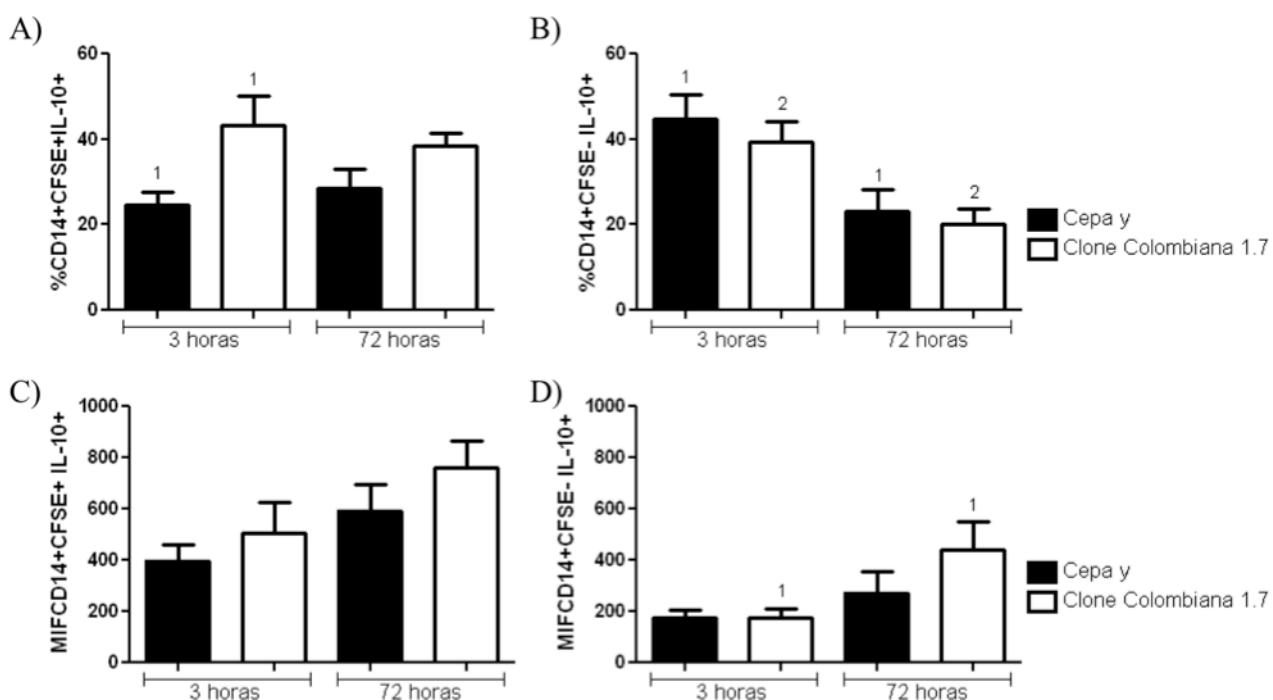


Figura 15: Frequência de expressão de IL-10. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. As duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de expressão de IL-10 em monócitos CFSE+. Valor de $p = 0,01$. B) Frequência de expressão de IL-10 em monócitos CFSE-. Valor de $p = 0,01$ e $2 = 0,008$. C) MIF de IL-10 em monócitos CFSE+. D) MIF de IL-10 em monócitos CFSE-. Valor de $p = 0,02$.

5.12 *Resumo dos dados obtidos para expressão de citocinas nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas.*

O quadro 4 resume os resultados obtidos pela análise da expressão de citocinas após infecção com a cepa Y e o clone Colombiana 1.7, por 3 e 72 horas em monócitos.

| Cepa Y | Clone Colombiana 1.7 |
|---|--|
| ↓ % de IL-10 em CFSE+ em relação a Colombiana 1.7 após 3h | ↑ % de IL-10 em CFSE+ em relação a Y após 3h |

Quadro 4: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de ativação nas diferentes populações de monócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas ($p < 0,05$).

5.13 *Razão entre citocina pró-inflamatória e citocina anti-inflamatória*

A fim de analisar se o microambiente gerado durante a infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 fosse predominantemente pró ou anti-inflamatório, foi realizada a razão entre a citocina TNF α (conhecida por ser uma citocina de caráter pró-inflamatório) e a citocina IL-10 (conhecida por ser uma citocina de caráter anti-inflamatório). Pode-se observar uma maior razão TNF α /IL-10 em monócitos CFSE+ após 3 horas de infecção pela cepa Y em comparação à infecção realizada pelo clone Colombiana 1.7 após o mesmo tempo de infecção (Tabela 3A). Não foram observadas, porém, diferenças após 72 horas de infecção em monócitos CFSE-; assim como não foi possível observar diferença significativa entre a razão TNF α /IL-10 quando a infecção foi realizada pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 após os dois tempos de infecção ou comparando-se as cepas no mesmo tempo (Quadro 5B).

| A) | | Razão TNF α /IL10 3hrs | Razão TNF α /IL10 72hrs |
|-------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Dados CFSE+ | Cepa Y | 1,40 \pm 0,71 * | 1,72 \pm 1,47 |
| | Clone Colombiana 1.7 | 0,60 \pm 0,43 * | 1,03 \pm 0,47 |
| B) | | Razão TNF α /IL10 3hrs | Razão TNF α /IL10 72hrs |
| Dados CFSE- | Cepa Y | 0,83 \pm 0,48 | 1,40 \pm 0,96 |
| | Clone Colombiana 1.7 | 0,93 \pm 0,27 | 0,91 \pm 0,32 |

Quadro 5: Razão entre a frequência de expressão de TNF α e IL-10 em monócitos. O primeiro valor representa a média das razões e o segundo valor o desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) A) Razão entre a frequência de expressão de TNF α e IL-10 em monócitos CFSE+. B) Razão entre a frequência de expressão de TNF α e IL-10 em monócitos CFSE-.

5.14 Avaliação da expressão de CD69 em linfócitos

Foi avaliada a frequência de expressão de CD69 em linfócitos CD4 e CD8. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de CD69 em nenhuma população de linfócitos estudada após 3 ou 72 horas de infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 16A e B).

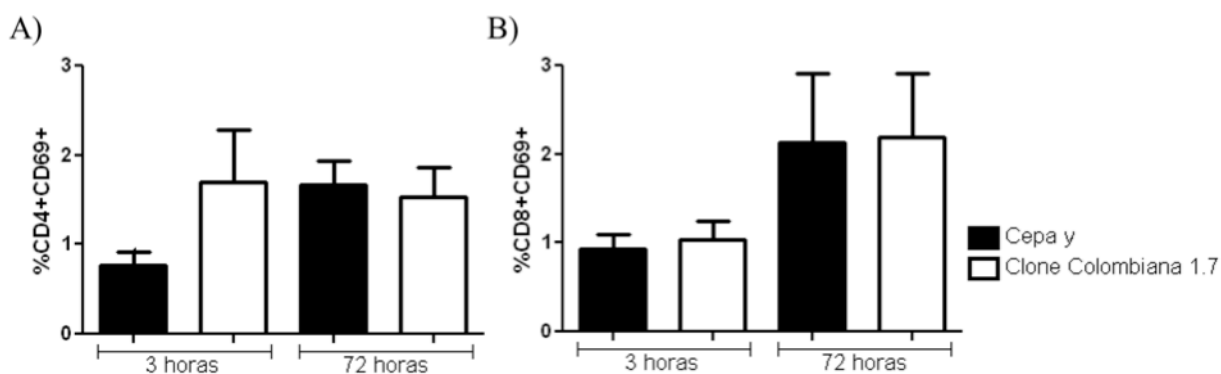


Figura 16: Avaliação da frequência de expressão de CD69 em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de CD69 em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de CD69 em linfócitos CD8.

5.15 Avaliação da frequência de expressão de HLA-DR em linfócitos

Foi avaliada a frequência de expressão de HLA-DR em linfócitos CD4+, sem, no entanto, encontrar diferença significativa na expressão de HLA-DR após a infecção por 3 ou 72 horas pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 17).

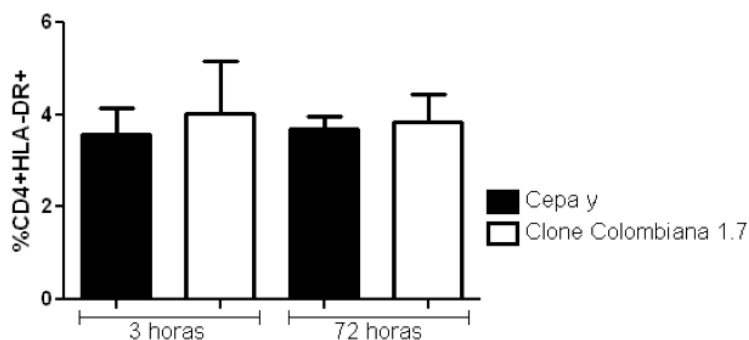


Figura 17: Avaliação da frequência de expressão de HLA-DR em linfócitos CD4+. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. As duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas.

5.16 Avaliação da frequência de expressão de CD28 e CTLA-4 em linfócitos

Após avaliação da frequência de expressão de CD28 em linfócitos CD4+ e CD8+, não foi encontrada diferença significativa na expressão de CD28 em nenhuma das populações de linfócitos estudadas, independente do tempo de infecção ou da cepa de *T. cruzi*. (Figura 18A e B). Foi avaliada, também, a expressão de CTLA-4 em linfócitos. Não houve diferença significativa na frequência de expressão de CTLA-4 em linfócitos CD4+ após a infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 por 3 ou 72 horas (Figura 19A). Entretanto, pode-se observar uma diminuição na frequência de expressão de CTLA-4 por linfócitos CD8+ após 72 horas de infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 comparado a 3 horas de infecção pela mesma cepa. Não houve diferenças significativas quando comparadas as cepas entre si (Figura 19B).

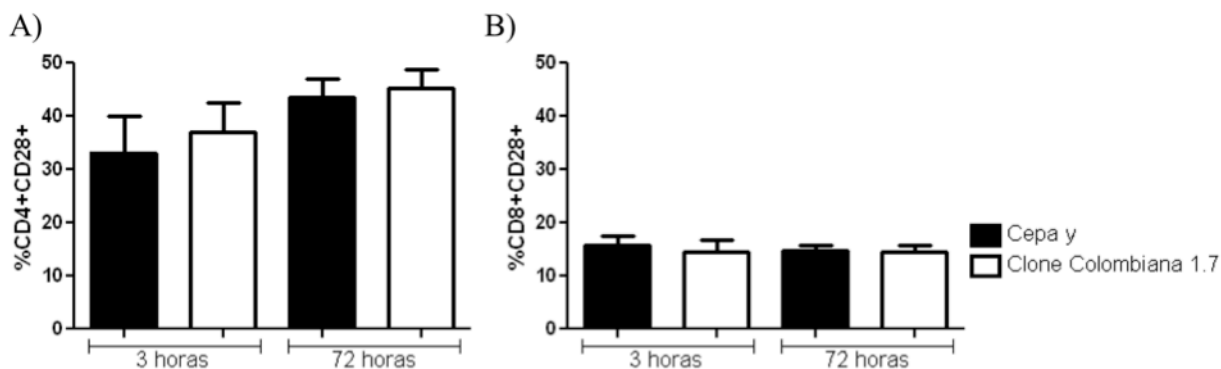


Figura 18: Avaliação da frequência de expressão de CD28 em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de CD28 em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de CD28 em linfócitos CD8.

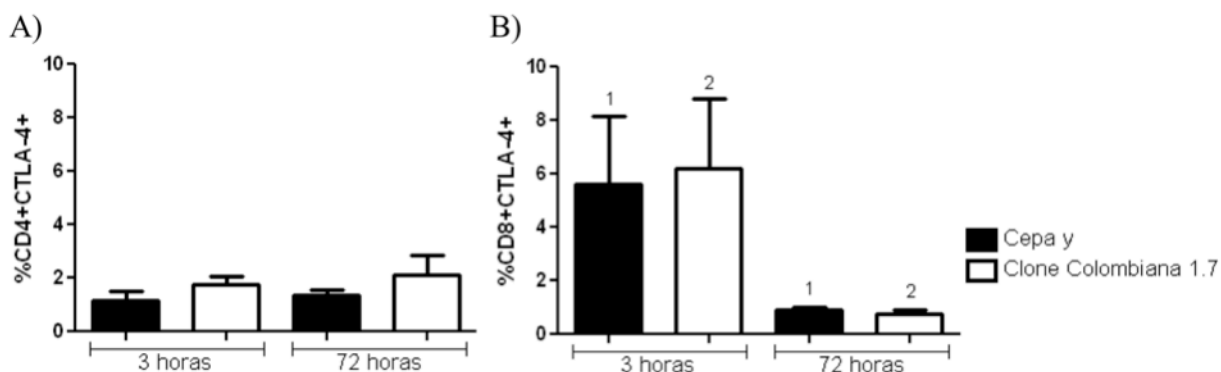


Figura 19: Avaliação da frequência de expressão de CTLA-4 em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. A) Frequência de expressão de CTLA-4 em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de CTLA-4 em linfócitos CD8. Valor de p 1=0,01 e 2=0,02.

5.17 Avaliação da frequência de expressão de Granzima A em linfócitos

Foi avaliada a frequência de expressão de Granzima A em linfócitos CD4+ e CD8+, mas sem observar diferença significativa na expressão de Granzima A em nenhuma das populações de linfócitos estudadas, após 3 ou 72 horas de infecção pela cepa Y ou clone Colombiana 1.7 (Figura 20A e B).

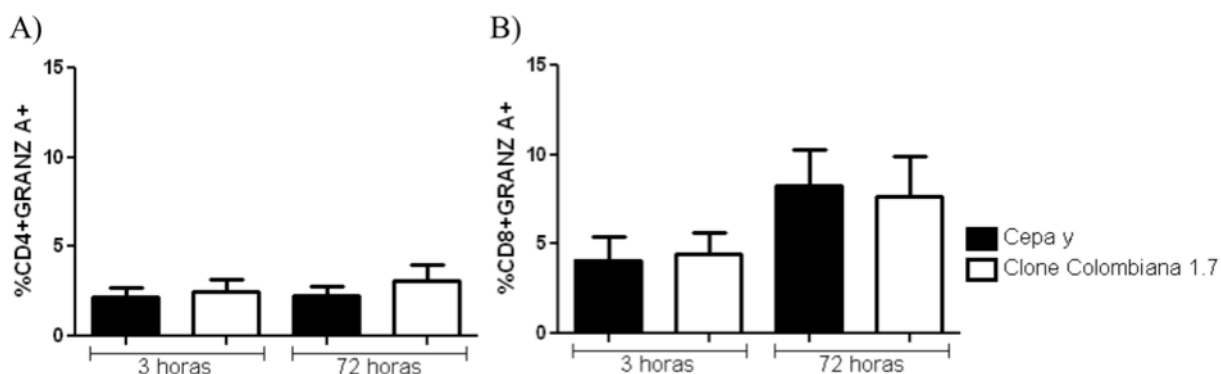


Figura 20: Avaliação da frequência de expressão de Granzima A em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de Granzima A em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de Granzima A em linfócitos CD8.

5.18 Avaliação da frequência de expressão de IFN γ e TNF α em linfócitos

Não foram encontradas diferenças significativas quando analisada a frequência de expressão de IFN γ em linfócitos CD4+ ou CD8+, após a infecção por 3 ou 72 horas pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 21A e B). O mesmo ocorre para a análise da frequência de expressão de TNF α em linfócitos CD4+ e CD8+ (Figura 22A e B).

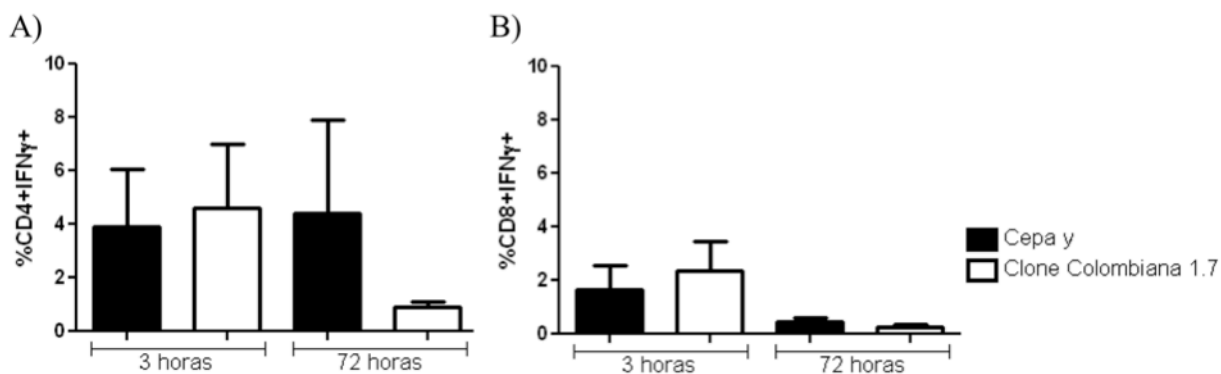


Figura 21: Avaliação da frequência de expressão de IFN γ em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de IFN γ em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de IFN γ em linfócitos CD8.

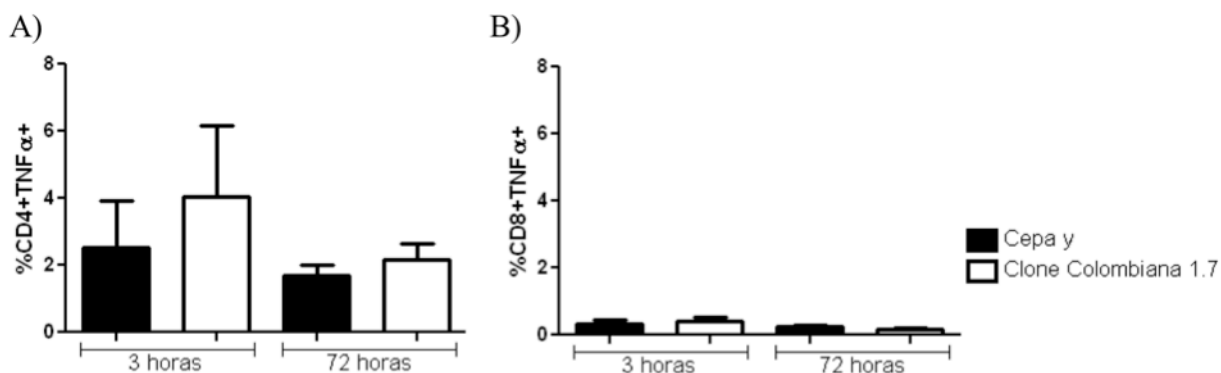


Figura 22: Avaliação da frequência de expressão de TNF α em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de TNF α em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de TNF α em linfócitos CD8.

5.19 Avaliação da frequência de expressão de IL-17 em linfócitos

Não houve diferença significativa entre a frequência de expressão de IL-17 em linfócitos CD4+ após 3 ou 72 horas de infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 23A). O mesmo ocorre para a avaliação da frequência de expressão de IL-17 em linfócitos CD8+ (Figura 23B).

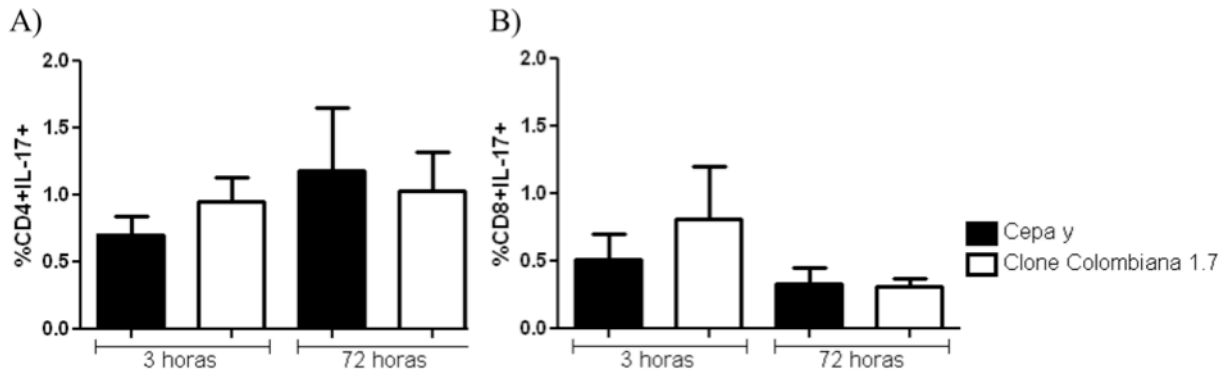


Figura 23: Avaliação da frequência de expressão de IL-17 em linfócitos. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. Em todos os gráficos, as duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. A) Frequência de expressão de IL-17 em linfócitos CD4. B) Frequência de expressão de IL-17 em linfócitos CD8.

5.20 Avaliação da frequência de expressão de IL-10 em linfócitos CD4+

Foi possível observar um aumento na expressão de IL-10 em linfócitos CD4+ após 72 horas de infecção pela cepa Y em comparação com 3 horas de infecção pela mesma cepa, o que não ocorreu quando a infecção foi pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 24). Não foram encontradas diferenças significativas quando analisadas as cepas entre si durante 3 ou 72 horas de infecção (Figura 24).

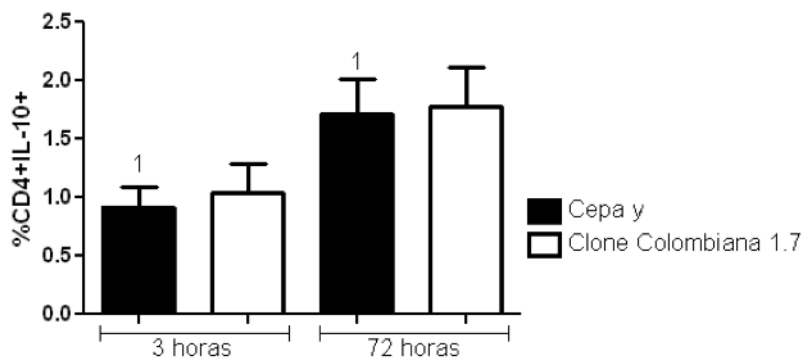


Figura 24: Avaliação da frequência de expressão de IL-10 em linfócitos CD4+. Os tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 foram previamente corados com CFSE e submetidos a 3 e 72 horas de infecção. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. Barras pretas correspondem a células infectadas pela cepa Y e barras brancas correspondem à infecção pelo clone Colombiana 1.7. As duas primeiras barras representam uma infecção por 3 horas e as duas últimas uma infecção de 72 horas. Números iguais representam diferenças significativas. Valor de $p=0,02$.

5.21 Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de superfície (ativação e co-estimulatórias) e citocinas em linfócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas.

O quadro 6 resume os resultados obtidos pela análise da expressão de *moléculas de superfície (ativação e co-estimulatórias)* e citocinas após infecção com a cepa Y e o clone Colombiana 1.7, por 3 e 72 horas em linfócitos.

| Cepa Y | Clone Colombiana 1.7 |
|----------------------------|----------------------------|
| ↓ %CTLA-4 em CD8+ após 72h | ↓ %CTLA-4 em CD8+ após 72h |

Quadro 6: Resumo dos dados obtidos para expressão de moléculas de superfície (ativação e co-estimulatórias) e citocinas em linfócitos, após a infecção com os diferentes isolados, por 3 e 72 horas.



6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Diversos estudos apontam para a importância na variabilidade genética de *T. cruzi* como fator de grande influência no curso da doença de Chagas. Acredita-se, que fatores imunes dos hospedeiros, juntamente com fatores relacionados à diversidade das cepas, possam fornecer importantes pistas do desenvolvimento das diferentes formas clínicas observadas no curso da doença. Em um esforço conjunto da comunidade científica, foram realizadas duas reuniões a fim de esclarecer e padronizar a classificação das cepas do parasito. Ficou convencionada, então, a separação de *T. cruzi* em seis grupos, Tc I a VI (Anonymous 1999 e Zingales et al. 2009). As cepas utilizadas neste trabalho (clone Colombiana 1.7 e cepa Y) foram isoladas de pacientes e correspondem, respectivamente, aos grupos Tc I e Tc II na classificação proposta por Zingales e colaboradores (2009). No Brasil, as cepas pertencentes ao grupo TcI correspondem, basicamente, ao ciclo silvestre, enquanto as cepas pertencentes ao grupo TcII correspondem ao ciclo de transmissão doméstica (Anonymous 1999). Apesar da presença de populações de vetores e reservatórios naturalmente infectados por cepas do tipo TcI e TcII, cepas TcI ainda não foram isoladas de pacientes chagásicos crônicos (Freitas et al. 2005). A análise molecular de cepas de *T. cruzi* obtidas de um surto de doença de Chagas aguda em Santa Catarina, identificou um padrão misto de cepas TcI/TcII no vetor *Triatoma tibiamaculata* presente na região, enquanto as cepas isoladas dos pacientes apresentavam somente o perfil Tc II (Steindel et al. 2004). Estes dados nos leva a questionar sobre uma provável seleção *in vivo* de parasitos TcII ao longo da infecção em humanos. No nosso estudo, acompanhamos uma infecção *in vitro* por 3 e 72 horas em células do sangue periférico humano, em que os tripomastigotas foram marcados com CFSE, o que permitiu que fosse separada a frequência de células que estavam marcadas com o corante CFSE, e portanto, em interação direta com o parasito, daquelas que não apresentavam a marcação. Entretanto, as células CFSE-, apesar da ausência de efeitos diretos pela presença do parasito, sofrem influência gerada pelo microambiente da infecção, sendo que estas células podem ainda ter entrado em contato direto com antígenos solúveis do parasito.

Pena e colaboradores em 2011 realizaram uma infecção em macrófagos murinos e humanos com cepas de perfil misto (TcI/TcII) naturalmente obtidas (a partir de vetores naturalmente infectados com perfil misto de cepas TcI/TcII) ou preparadas artificialmente (misturando-se em laboratório cepas de perfil TcI e TcII) e após sucessivas passagens de 3, 7 e 14 dias observaram uma maior infectividade de cepas TcII, assim como uma maior habilidade replicativa e um menor tempo de duplicação intracelular. Entretanto, no nosso estudo não houve diferenças na frequência de células

CD14+CFSE+ submetidas a infecção pela cepa Y comparadas àquelas submetidas a infecção pelo clone Colombiana 1.7, bem como quando analisada a intensidade média de fluorescência de células CD14+CFSE+. Este fato pode-se relacionar a uma limitação metodológica da citometria de fluxo. Sabemos que as células CD14+CFSE+ estavam expressando o corante intracelular de tripomastigotas, todavia, não podemos afirmar que estas células apresentavam formas tripomastigotas, ou ainda formas amastigotas em seu interior. Somente podemos afirmar que estas células estavam em íntima interação com o parasito, o que não necessariamente caracteriza uma infecção. Dessa forma, podemos afirmar que a mesma frequência de células foi estimulada por parasitos da cepa Y e do clone Colombiana 1.7. No entanto, a infecção efetiva é determinada por uma série de outros fatores.

Uma maior interação de tripomastigotas com a célula do hospedeiro não necessariamente determina uma maior internalização dos mesmos. Em um estudo de infectividade entre cepas TcI (cepa G) e TcVI (CL) observou-se que a cepa CL apresenta uma maior infectividade comparada com a cepa G. Curiosamente, essas cepas expressam diferentemente as glicoproteínas gp35/50, gp82 e gp90, sendo a glicoproteína gp90 um dos principais componentes da superfície da cepa G (TcI), enquanto não foi detectada na cepa CL (TcVI). Sabendo que a mobilização de Ca^{2+} é um importante passo para a internalização de tripomastigotas, Ruiz e colaboradores (1998) observaram que a intensidade de resposta de Ca^{2+} gerada pela gp82 foi maior que a gerada pelas glicoproteínas gp35/50 e gp90. Contudo, quando analisada a habilidade de se ligar a células, a glicoproteína gp82 foi menos eficiente que gp90 e gp35/50 (Ruiz et al. 1998). Portanto, é plausível acreditar que, apesar do clone Colombiana 1.7 (TcI) ter se ligado a células CD14+ na mesma frequência que a cepa Y (Tc II), ela apresente uma menor capacidade de invasão por, assim como outras cepas TcI, expressar prioritariamente a glicoproteína gp90 e, conseqüentemente, induzir uma menor mobilização de Ca^{2+} na célula alvo. Recentemente, foi descrito que a cepa Y apresenta 2 subpopulações (Y82 e Y30), sendo que Y82 expressa majoritariamente gp82 e Y30 expressa gp30. Gp30 é também uma glicoproteína capaz de realizar a mobilização eficiente de Ca^{2+} , entretanto, sabe-se que somente gp82 é eficiente na infecção de mucosa por via oral (Cortez et al. 2012).

Na figura 2A, podemos observar que houve uma diminuição da frequência de células CD14+CFSE+ infectadas pelo clone Colombiana 1.7 após 72 horas em comparação com após 3 horas de infecção pela mesma cepa, o que está de acordo com o discutido acima, uma vez que, sendo *T. cruzi* um parasito intracelular obrigatório em mamíferos, a viabilidade de formas tripomastigotas no exterior da célula fica prejudicada com o tempo de cultura. Logo, aqueles parasitos que não conseguiram infectar eficientemente os monócitos morrem no exterior da célula,

após 72 horas de cultura, ou então são lavados do meio. Outra hipótese é que os monócitos infectados pelo clone Colombiana 1.7 eliminaram mais eficientemente a infecção após 72 horas em comparação com 3 horas, diminuindo assim a frequência de células CFSE+. Porém, apesar da diminuição das células CFSE+, não houve diminuição na intensidade de fluorescência de CFSE+, sugerindo que apesar do número de células CFSE+ ter diminuído após 72 horas de cultura, a quantidade de parasitos no total da amostra não sofreu alteração. Isso pode se dever a replicação do parasito dentro dos monócitos que continuaram infectados.

Pena e colaboradores (2011) observaram que, após a infecção em macrófagos humanos, houve um aumento na frequência de macrófagos infectados após 72 horas em relação a 4 horas de infecção, quando a infecção foi realizada por cepas TcII (dentre elas a cepa Y), bem como quando realizada por cepas de perfil misto (TcI e TcII). Entretanto, quando a infecção foi realizada por cepas TcI não foi observado aumento significativo (Pena et al. 2011). A diferença dos dados obtidos neste trabalho e dos dados de Pena e colaboradores (2011) pode se dever à população celular estudada, sendo que neste trabalho utilizamos monócitos enquanto Pena e colaboradores utilizaram macrófagos diferenciados derivados de monócitos do sangue periférico. Os autores também observaram que o tempo de duplicação dos parasitos de cepas TcII é menor em comparação com os parasitos TcI. Desta forma, é possível acreditar que em longo prazo, após sucessivas passagens, a diferença na frequência de parasitos se tornaria mais clara, como observado no mesmo artigo quando a infecção foi realizada em macrófagos murinos após sucessivas passagens em 3, 7 e 14 dias. Outra possibilidade para explicar a diminuição da percentagem de células infectadas após 72 horas com os parasitos do clone Colombiana 1.7 é que as células infectadas poderiam ter morrido, o que acarretaria numa diminuição percentual da população infectada. Pretendemos avaliar futuramente essas diferentes possibilidades, determinando se foi internalização deficiente, morte celular ou eliminacao do parasito.

O estudo de frequência de células CFSE+ foi feito em células CD14+ uma vez que monócitos são as células preferencialmente infectadas por *T. cruzi* no sangue periférico humano (Souza et al. 2004). Como citado anteriormente, sabemos que a população de monócitos do sangue periférico pode ser subdivida em CD14+CD16- e CD14+CD16+, e que esses monócitos CD16+ ou CD16- apresentam uma expressão diferencial de citocinas. Os monócitos CD14+CD16+HLA-DR++ são classificados como monócitos pró-inflamatórios, devido a sua habilidade de produzir TNF α , e sua baixa produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 em comparação com a população clássica de monócitos, enquanto os monócitos CD14+CD16+HLA-DR+ são classificados como pré-macrófagos (Belge, 2002 e Ziegler-Heitbrock et al. 1996).

Um estudo demonstrou que a subpopulação CD14+CD16+HLA-DR++ (que corresponde a 10% de todos os monócitos em indivíduos saudáveis) foi responsável pela produção de 30% de TNF α por monócitos após o estímulo com LPS e até 60% após estímulos diferentes de bactérias (Belge et al. 2002). Acredita-se que essas duas populações de monócitos são representadas em camundongos por monócitos GR1+ e GR1-. Gonçalves e colaboradores (2011) observaram que monócitos GR1+ de camundongos infectados por *Leishmania major* são rapidamente recrutados aos sítios de infecção e matam eficientemente os parasitos. Assim, considerando-se as diferenças funcionais entre os monócitos CD16+ e CD16-, dividimos nossas análises nessas duas diferentes sub-populações. Analisamos então, primeiramente, a frequência de células CD14+CD16+ ou CD14+CD16- expressando ou não CFSE para determinar se as possíveis diferenças ocorriam em populações infectadas com o parasito ou se haveria algum efeito indireto na expressão de moléculas de ativação ou citocinas por células não infectadas.

Interessantemente, podemos observar uma clara expansão da população CD14+CD16+ após 72 horas de infecção em comparação com 3 horas de infecção tanto pela cepa Y quanto pelo clone Colombiana 1.7. Consequentemente, é observada uma diminuição da frequência de expressão de células CD14+CD16-. Esta é a primeira vez que observamos expansão de células CD14+CD16+ após a infecção por *T. cruzi*. Estes dados corroboram dados encontrados na literatura, que demonstram a expansão de células CD14+CD16+ após infecções crônicas (Fingerle et al. 1993, Blumenstein et al. 1997, Nockher and Scherberich 1998). Não foi observada uma expansão diferencial quando a infecção foi realizada pela cepa Y em comparação com a infecção realizada pelo clone Colombiana 1.7. Interessantemente, essa expansão não se deve à infecção direta por *T. cruzi*, uma vez que as células CFSE- também sofreram expansão. Gonçalves e colaboradores (2011) trabalhando com subpopulações de monócitos de camundongo (Gr1+ e Gr1-) também observaram um aumento significativo de monócitos Gr1+ após 24 de infecção por *Leishmania major*. Embora a hipótese da expansão seja atraente, inclusive por encontrar suporte na literatura, é possível que tenha havido uma morte da população CD14+CD16-, o que também levaria a alterações percentuais nas populações. Assim, estudos adicionais precisam ser realizados para testar essas hipóteses.

Em seguida, analisamos a expressão de Receptores do Tipo Toll. Sabe-se que a sinalização via TLR2 através da ligação com o antígeno do parasito Tc52 estimula a maturação de células dendríticas e aumenta a sobrevivência de camundongos imunizados (Ouiassi et al 2002). É possível observar, na figura 4A, uma maior frequência de TLR2 por monócitos CD16+ após 72 horas de infecção pela cepa Y em comparação com a infecção realizada pelo clone Colombiana 1.7. Contudo, esse aumento na frequência de infecção não é seguido por um aumento na intensidade

média de fluorescência.

Como observado na figura 5A, não há diferença na intensidade média de fluorescência entre as duas cepas em monócitos CFSE+CD16+. Deve-se mencionar que, quando medimos frequência de expressão de uma dada molécula (TLR2, por exemplo) estamos medindo a frequência de células expressando TLR2, enquanto o dado de intensidade de fluorescência nos indica quanto aquela molécula está sendo expressa pelas células. Portanto quando vemos uma maior frequência de monócitos CFSE+CD16+ expressando TLR2 após 72 horas de infecção pela cepa Y em comparação com o clone Colombiana 1.7, mas não temos a mesma diferença na intensidade de expressão, sabemos que apesar de TLR2 estar sendo expresso por uma frequência maior de monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pela cepa Y em comparação com a infecção pelo clone Colombiana 1.7, essa molécula está sendo expressa com intensidade semelhante pelas células infectadas com as diferentes cepas. Quando analisada a intensidade média de fluorescência de TLR2, pudemos observar um aumento de TLR2 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em comparação com 3 horas de infecção. Enquanto, aumento semelhante foi observado após a infecção pela cepa Y somente na subpopulação de monócitos CFSE+CD16-. Este dado sugere uma possível ativação diferencial das duas subpopulações (CD16+ e CD16-) pelas duas cepas, sendo a cepa Y relacionada à ativação de monócitos CD16- e o clone Colombiana 1.7 relacionado à ativação de monócitos CD16+. A ativação diferencial de monócitos CD16+ e CD16- demonstra a grande importância de estratificar essas subpopulações no estudo de diferentes cepas de *T. cruzi*. As figuras 4 e 5 evidenciam que monócitos CFSE+ e CFSE- tiveram expressão e intensidade de fluorescência de TLR2 similar. Essa ativação de TLR2 em células não infectadas, assim como em células infectadas, pode ser explicada pelo fato de que TLR2 reconhece a proteína Tc52 liberada por tripomastigotas, além de âncoras GPI (Campos et al. 2001 e Ouaisi et al. 2002).

Posteriormente, analisamos a expressão de TLR4 sabendo que o papel desse receptor na doença de Chagas ainda não foi comprovado diretamente, permanecendo controverso. Sabe-se que indivíduos que são heterozigotos para uma variante que leva à diminuição de sinal de TLR2 e TLR4 apresentam menor risco de desenvolver cardiopatia chagásica crônica (Ramasawmy et al. 2009). Todavia, foi demonstrado que camundongos deficientes de TLR4 são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Oliveira et al. 2004). Nos nossos resultados, observamos uma maior frequência de expressão de TLR4 por monócitos CFSE-CD16- após 3 horas de infecção pela cepa Y em comparação com a infecção pelo clone Colombiana 1.7. Essa maior expressão de TLR4 após a infecção pela cepa Y em 3 horas não se repete após 72 horas de infecção uma vez que ocorre um

aumento na expressão de TLR4 após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em relação à mesma cepa após 3 horas de infecção, na mesma subpopulação (Figura 6D). A expressão de TLR4 por monócitos CFSE- é possível uma vez que essa molécula se liga a GPI livres, portanto não sendo necessária a presença do parasito para sua ativação (Oliveira et al. 2004). Oliveira e colaboradores (2010) propuseram que TLR4 poderia ter um papel importante no controle do parasitismo, atuando como fator tripanosomacida. No entanto, o receptor atuaria de forma local, em um mecanismo dependente da produção de NO e ROS. Para que o TLR4 atuasse de forma a matar o parasito seria necessário então uma co-localização de TLR4 com o lisossomo contendo formas tripomastigotas (Oliveira et al. 2010). Este mecanismo, portanto, não está relacionado com a diferença observada na figura 6D, uma vez que só foi observada diferença na expressão de TLR4 em células CFSE-, que não apresentam parasito em seu interior. Assim, é possível que a alteração nos níveis de expressão de TLR4 esteja relacionada a outros mecanismos que não a morte direta do parasito. Quando analisada a intensidade média de fluorescência de TLR4 podemos observar uma maior intensidade de expressão de TLR4 após 72 horas de infecção pelas duas cepas (Figura 7) sugerindo que um maior tempo de cultura seria necessário para ativação de TLR4.

Analizamos, então, a ativação de monócitos através da avaliação de expressão da molécula HLA-DR. Sabe-se que monócitos de pacientes crônicos com a forma clínica indeterminados apresentam uma diminuição na expressão de HLA-DR após infecção *in vitro* por tripomastigotas da cepa Y, que pode estar relacionada com a modulação da resposta inflamatória por linfócitos T, observada em pacientes indeterminados com a doença de Chagas (Souza et al. 2004). Não foi observada diferença estatística na frequência de expressão ou intensidade média de expressão de HLA-DR após a infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 8). Vitelli-Avelar e colaboradores (2006) realizaram um estudo em pacientes no início da infecção crônica e observaram uma expansão de monócitos pró-inflamatórios CD14+CD16+HLA-DR++ que pode estar relacionada com patologia cardíaca durante a fase crônica tardia, enquanto que a expansão de células “macrófago-like” CD14+CD16+HLA-DR+ pode ser benéfica, limitando a patologia e estabelecendo uma fase indeterminada persistente (Vitelli-avelar et al. 2006). Entretanto, por limitações metodológicas não foi possível estratificar, em nosso estudo, a população de monócitos expressando HLA-DR em monócitos CD16+ e CD16- como feito anteriormente. Apesar da ausência de diferença de expressão de HLA-DR não podemos afirmar que não houve aumento na expressão de HLA-DR após a infecção pelas cepas, uma vez que não temos dados da expressão de HLA-DR em células não infectadas no presente trabalho. Assim, é possível que, embora não tenhamos observado diferenças entre as cepas, a infecção possa ter levado a uma diminuição da

expressão de HLA-DR, como anteriormente observado, em relação a células não infectadas.

A expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) fornecem o segundo sinal, necessário para ativação de células T (Wang & Chen 2004) e sua expressão tem sido também associada à ativação de monócitos (Souza et al. 2007). Já foi demonstrado pelo nosso grupo que pacientes cardíacos apresentam uma diminuição de expressão de CD86 após infecção *in vitro* com tripomastigotas de *T. cruzi*, enquanto células de pacientes indeterminados apresentam uma maior frequência de células expressando CD80 em comparação com o grupo controle (Souza et al. 2004). Nossos resultados mostram um aumento da frequência de expressão de CD80 em monócitos CFSE+CD16+ após a infecção por 72 horas pelo clone Colombiana 1.7 em relação a 3 horas de infecção (Figura 9A). Pudemos observar, também, uma diminuição na frequência de expressão de CD80 por células CFSE-CD16- após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em reação a 3 horas de infecção (Figura 9D). Em contraponto, houve uma diminuição na frequência de expressão de CD80 após 72 horas de infecção pela cepa Y por monócitos CFSE-CD16- (Figura 9C), assim como um aumento na intensidade média de expressão de CD80 após 72 horas de infecção pela cepa Y em relação a 3 horas de infecção (Figura 10B). Desta forma, percebemos que, enquanto a expressão de CD80 é aumentada em monócitos CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7, esse aumento ocorre após a infecção pela cepa Y na subpopulação CD16-. A ativação diferencial das subpopulações CD16+ e CD16- após a infecção com a cepa Y ou com o clone Colombiana 1.7 também pode ser observada na análise da expressão de CD86. Na figura 11A observamos uma maior frequência de expressão de CD86 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7, em comparação com 3 horas de infecção, assim como foi observado para expressão de CD80.

Quando analisada a frequência de expressão de CD86 em monócitos CFSE-CD16+ podemos observar uma maior frequência de expressão desta molécula após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em comparação com a infecção realizada pela cepa Y no mesmo tempo. Observamos, ainda uma diminuição na frequência de expressão de CD86 por monócitos CFSE-CD16+ após 72 horas de infecção pela cepa Y em comparação a 3 horas de infecção pela mesma cepa. Na intensidade média de expressão de CD86 observamos, mais uma vez, uma maior intensidade de expressão de CD86 em monócitos CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em relação a cepa Y no mesmo tempo e também em relação ao próprio clone após 3 horas de infecção (Figura 12A). Na intensidade de expressão de CD86 por monócitos CFSE+CD16-, observamos maior expressão após a infecção de 3 horas pela cepa Y em comparação com a infecção pelo clone Colombiana 1.7. Esses dados demonstram claramente uma diferença de

ativação entre as subpopulações, sendo a subpopulação CD14+CD16+ ativada pela infecção pelo clone Colombiana 1.7 e a subpopulação CD14+CD16-, ativada após a infecção pela cepa Y. Essa diferença nos ensina o quão importante é a estratificação entre essas subpopulações para a análise da ativação de monócitos por diferentes cepas de *T. cruzi*. Sabe-se que CD86 apresenta maior afinidade que CD80 a CD28 em comparação com CTLA-4 (Linsley et al. 1994), logo, uma maior expressão de CD86 pelo clone Colombiana 1.7 em relação a cepa Y por monócitos CFSE+CD16+ (Figura 12A) pode estar relacionada a uma resposta mais controlada de linfócitos T. A expressão de CD80 e CD86, independente da ativação de TLRs, já foi demonstrada em camundongos por Gonçalves e colaboradores (2011) que observou que a ativação de monócitos GR1+ (homólogos a monócitos CD16+ em humanos) é realizada de uma maneira independente de TLR em *Leishmania*. Assim, o fato de essas diferenças na ativação não estarem diretamente associadas a diferenças de expressão de TLR não é de todo inesperada.

Carvalho e colaboradores, em 2008, estudando a infecção de células dendríticas por *Leishmania braziliensis*, observou que as células dendríticas não infectadas (CFSE-) apresentaram uma maior expressão de moléculas de ativação (CD80 e CD86) e maior produção de IL-12 e TNF α , propondo que as células dendríticas infectadas apresentam um perfil semi-maduro, mais provável de induzir tolerância, enquanto aquelas células CFSE- são as responsáveis por estimular uma resposta T efetiva. Em contrapartida, no nosso estudo, foi observada uma expressão de marcadores de ativação igual ou maior em células CFSE+ do que em células CFSE-. Enquanto podemos observar uma diminuição na frequência de expressão de CD80 por monócitos CFSE-CD16- após 72 horas de infecção na cepa Y, (Figura 9) essa diminuição não é observada para células CFSE+, seja na população CD16+ ou CD16-. Ao contrário, observa-se um aumento na frequência de expressão de CD80 em CFSE+CD16+ após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 (Figura 89). Essa diferença na frequência de expressão de CD80 após 72 horas de infecção entre os monócitos CFSE+ e CFSE- demonstra a importância da presença do parasito, seja na ligação com a célula e até mesmo sua infecção, para a ativação efetiva da célula. Acreditamos que, diferentemente das células dendríticas CFSE+ estudadas por Carvalho e colaboradores, os monócitos CFSE+ após a infecção por tripomastigotas da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 são plenamente capazes, e provavelmente os principais responsáveis pela ativação de células T, uma vez que apresentam expressão de marcadores de ativação, assim como também expressam em grande intensidade IL-12 e TNF α , até mesmo em maior intensidade quando em comparação com monócitos CFSE- (Figuras 13 e 14). A expressão de TLRs e de moléculas de ativação diferencial em células CFSE+ e CFSE- demonstra a importância de estratificar tais subpopulações uma análise de marcadores imunológicos, uma vez

que a diferença observada pode-se dever a ativação de células não infectadas.

É amplamente conhecida a importância da expressão de IL-12 para ativação de um perfil Th1 efetor, que leva a produção de IFN γ e conseqüentemente à indução de NO por monócitos para a morte do parasito. Nos nossos dados, foi possível observar que, apesar da frequência de monócitos produzindo IL-12 após 3 e 72 horas de infecção pelas duas cepas (Y e clone Colombiana 1.7) não apresentar diferença significativa, a média de fluorescência de IL-12 foi muito maior em células CFSE+, reforçando seu importante papel na ativação de linfócitos T na infecção por *T. cruzi* (figuras 13C e D). Pode-se, também, observar um aumento na intensidade média de fluorescência de IL-12 após 72 horas de cultura, tanto após a infecção pela cepa Y (em monócitos CFSE+ e CFSE-) quanto após a infecção pelo clone Colombiana 1.7 (em monócitos CFSE-). Esse resultado, juntamente com os dados mostrados nas figuras 9A, 10B, 11A e 12A e B que mostram o aumento da frequência e intensidade de fluorescência de CD80 e CD86 em monócitos CFSE+, corroboram a idéia de que estes monócitos infectados representam a maior fonte de células capazes de ativar uma resposta T efetora.

Sabemos que a expressão de TNF α por macrófagos e monócitos tem importante papel na ativação de células NK, levando estas a produzir IFN γ (Silva et al. 1992). IFN γ por sua vez é importante no controle da parasitemia, e atuará ativando macrófagos e levando à produção de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para o parasito (Silva et al. 1992, Cardillo et al. 1996, Holscher et al. 1998). Por outro lado, estudos *in vitro* apontam que as citocinas IL-10 e TGF β inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN γ (Silva et al. 1991 e Roffe et al. 2012). Contudo, durante a fase crônica, uma modulação desta resposta inflamatória, e a expressão de citocinas anti inflamatórias, principalmente IL10, é essencial para evitar o desenvolvimento de patologia. Vários estudos apontaram a presença de um ambiente balanceado, durante a fase crônica, associado à forma clínica indeterminada, enquanto um ambiente com uma resposta majoritariamente inflamatória foi associado à presença de patologia com as formas clínicas cardíacas e digestivas. (Dutra et al. 2009). Já foi demonstrado que um polimorfismo funcional relacionado com baixa produção de IL-10 está associado com a susceptibilidade de desenvolver cardiopatia, e também que a menor expressão de IL-10 está associada a pior prognóstico clínico entre cardiopatas (Costa et al. 2009).

No nosso trabalho, analisamos a expressão de TNF α por monócitos infectados pelas duas cepas e observamos uma menor frequência de expressão dessa citocina após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em comparação com a expressão após 3 horas de infecção. Ao analisar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 por monócitos infectados, observamos uma maior

frequência de expressão de IL-10 após 3 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 em comparação com a infecção realizada pela cepa Y no mesmo tempo, em monócitos CFSE+. Nos monócitos CFSE-, observamos uma diminuição na frequência de expressão de IL-10 após 72 horas em relação à expressão após 3 horas de infecção realizada pelas duas cepas. A fim de relacionar os dados de expressão da citocina inflamatória TNF α com a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi realizada a razão entre a expressão dessas duas citocinas. Foi possível observar que, apesar da infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 apresentarem mesma frequência de expressão e intensidade média de fluorescência de TNF α (Figuras 14 e 15), a maior produção de IL-10 pelo clone Colombiana 1.7 após 3 horas de infecção em comparação pela cepa Y em monócitos CFSE+ (Figura 15A), altera o balanço de citocinas pró e anti inflamatórias, como observado na tabela 3, representativa da razão entre TNF α e IL-10. A razão é maior para a cepa Y em células CFSE+ em comparação com o clone Colombiana 1.7, levando ao favorecimento de um ambiente mais inflamatório quando a infecção é realizada pela cepa Y. Guedes e colaboradores (2009), utilizando cães da raça Beagle como modelo experimental para a doença de Chagas, acompanharam o curso da infecção por cepas do tipo Tc II, entre elas a cepa Y, durante a evolução entre as fases aguda e crônica, e observaram que cães que apresentavam um perfil de citocinas com alta produção de TNF α e IFN γ e baixa produção de IL-10 por monócitos do sangue periférico durante os primeiros momentos de infecção (fase aguda) desenvolviam cardiopatia durante a fase crônica. (Guedes et al. 2009). Deste modo, um ambiente pró-inflamatório com baixa produção de IL-10 é importante para controlar a parasitemia durante a fase aguda, mas não é suficiente para a eliminação do parasitismo tecidual, e uma vez na fase crônica este perfil está relacionado ao desenvolvimento de cardiopatia. Neste mesmo trabalho, os autores observaram, ainda, uma associação à virulência observada *in vitro* e o desenvolvimento de patogênese durante a fase crônica. Após 72 horas de infecção pelo clone Colombiana 1.7 observamos uma diminuição da produção de TNF α por monócitos CFSE- em comparação com 3 horas de infecção; entretanto, também foi observada uma diminuição na frequência de expressão de IL-10, pela mesma população de monócitos, não influenciando, portanto, a razão entre essas citocinas (Figuras 14B e 15B). Na infecção realizada pela cepa Y, ocorre fato semelhante para a expressão de IL-10 (Figura 15B), mas não houve alteração significativa na frequência de expressão de TNF α , o que levou à diminuição na razão TNF α IL-10, observada no quadro 4B.

A importância de células T foi comprovada em diversos estudos *in vivo*, (Vieira et al. 2012; Domingues et al. 2012; Mariano et al. 2008; Padilla et al. 2008). As células T CD8+ são o principal tipo celular ativo no sítio inflamatório de camundongos infectados (Silvério et al. 2012). A ativação

de células T leva a secreção de citocinas importantes no controle parasitário. Sabe-se que a ativação de células T depende da ativação de TCR seguida da sinalização co-estimulatória, mediada, principalmente, por moléculas da família B7 nas APCs e por moléculas da família CD28 (CD28 e CTLA-4) na superfície dos linfócitos T.

No nosso estudo, não observamos diferenças na expressão de CD69, um marcador de ativação recente, por linfócitos CD4 e CD8 após a infecção por 3 ou 72 horas pelas duas cepas. O mesmo foi observado na frequência de expressão de HLA-DR, um marcador de ativação mais “tardio”, pelas duas cepas. Apesar da infecção pela cepa Y e pelo clone Colombiana 1.7 não apresentar diferença na ativação de linfócitos T, não podemos afirmar que a infecção pelas duas cepas não alterou a expressão dessas moléculas, uma vez que não temos dados de doadores não infectados no nosso estudo. Analisamos em seguida, a expressão das moléculas co-estimulatórias CD28 e CTLA-4 por linfócitos T CD4 e CD8. Sabe-se que a expressão de CTLA-4, associada ao controle da resposta imune, está diminuída em paciente chagásicos cardiopatas (Souza et al. 2007). Foi observada uma diminuição na frequência de expressão de CTLA-4 por linfócitos T CD8+ após 72 horas de infecção pelas duas cepas em comparação com 3 horas de infecção. Essa diminuição sugere uma perda na capacidade de regulação da ativação de linfócitos T CD8+. Sabemos que CD86 apresenta uma maior afinidade a se ligar a CTLA-4 (Linsley et al. 1994), e a menor expressão dessa molécula por monócitos CFSE+CD16+ infectados por 72 horas pela cepa Y juntamente com a diminuição da frequência de expressão de CTLA-4 após 72 horas pode sugerir uma perda ainda maior na capacidade de regulação de linfócitos T quando a infecção é realizada pela cepa Y. Este é um achado interessante, uma vez que a cepa Y é sabidamente uma cepa virulenta (como mostrado em modelos experimentais) e, a falta de controle de células T CD8+ pode estar associada à sua habilidade em induzir patologia. Também interessante que essa diferença tenha sido observada em células T CD8+, possivelmente as mais ativadas em nosso modelo, uma vez que utilizamos parasitos vivos, ao invés de antígenos solúveis. Apesar de não termos observado alteração na expressão de CD69 e HLA-DR, pode-se tomar a diminuição da expressão de CTLA-4 como um indicativo de ativação.

Posteriormente, analisamos a expressão da molécula citotóxica Granzima A. Em modelos experimentais foi demonstrado que camundongos *knock out* para Granzima A são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Muller et al. 2003). Nos nossos dados, não observamos diferenças significativas na expressão de Granzima A por linfócitos CD4 ou CD8 após a infecção por 3 e 72 horas pelas duas cepas. Entretanto não podemos afirmar que a infecção não alterou a expressão de Granzima A, uma vez que não temos dados de doadores não infectados. Nosso grupo observou

maior expressão de Granzima A em células CD4+, mas não em CD8+, em pacientes em fase aguda, em comparação com doadores não infectados (Andrade 2012).

A expressão de citocinas por linfócitos T têm grande importância no controle do parasito, Guedes e colaboradores (2012) observaram que camundongos livres de cardiomiopatia produzem maiores quantidades de IL-10 por linfócitos T CD4+, enquanto camundongos com cardiomiopatia moderada e severa produzem maiores quantidades de TNF α e IFN γ . Neste mesmo estudo, foi correlacionada a baixa produção de IL-17 por células T CD4+ com cardiomiopatia severa em camundongos (Guedes et al. 2012). Miyazaki e colaboradores (2010) também observou, em modelo experimental, que a produção de IL-17 é importante para proteção de patologia durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Miyazaki et al. 2010). Dados do nosso grupo também mostraram um aumento na expressão de IL-17 por linfócitos de pacientes indeterminados, sugerindo um papel protetor para essa citocina (Magalhães et al. 2013).

Na análise da expressão de citocinas IFN γ , TNF α ou IL-17 (Figuras 21, 22 e 23) por células T CD4+ ou CD8+ não observamos diferença após a infecção pela cepa Y ou pelo clone Colombiana 1.7. Pena e colaboradores (2011) observaram que a presença de IFN γ nas culturas não altera a infecção e o desenvolvimento de tripomastigotas de cepas TcI e TcII em macrófagos humanos. A baixa expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias por linfócitos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* por parasitos da cepa Y de *T. cruzi* foi anteriormente descrita por Souza et al (2007). É possível que, pelo fato dessas células não terem sido primadas, não tenha havido tempo suficiente em cultura para sua ativação. Assim, a pequena quantidade de células específicas presentes na cultura, acompanhada de uma ativação “deficiente”, poderia explicar a baixa expressão dessas citocinas e, conseqüentemente, a ausencia de diferenças entre as duas cepas.

Nossos dados demonstram como a infecção por diferentes cepas pode alterar o perfil imunológico durante a infecção *in vitro* de células do sangue periférico de humanos. Este trabalho foi o primeiro a relacionar a importância das subpopulações CD16+ e CD16- em monócitos durante as fases iniciais da infecção por *T. cruzi*, assim como, foi também pioneiro em demonstrar ativação de monócitos após a infecção com diferentes cepas. Assim sendo, nosso estudo demonstra a importância de trabalhar com diferentes cepas, e fornece informações sobre a dinâmica de seleção de cepas durante a infecção por *T. cruzi* em humanos.



7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A infecção pela cepa Y leva ao desenvolvimento de um ambiente mais inflamatório:

- Menor expressão de IL-10 por monócitos;
- Maior razão $TNF\alpha/IL-10$;
- Menor expressão de CD86 por monócitos $CD14^+CD16^+$.

A infecção pelo clone Colombiana 1.7 leva ao desenvolvimento de um ambiente mais regulador:

- Maior expressão de IL-10 por monócitos;
- Menor razão $TNF\alpha/IL-10$;
- Maior expressão de CD86 por monócitos $CD14^+CD16^+$.

A infecção pelas duas cepas leva a uma perda na capacidade de regulação da ativação de linfócitos T $CD8^+$:

- Menor expressão de CTLA-4 por linfócitos $CD8^+$ após a infecção pelas duas cepas.

Os dados obtidos neste trabalho estão representados na figura abaixo.

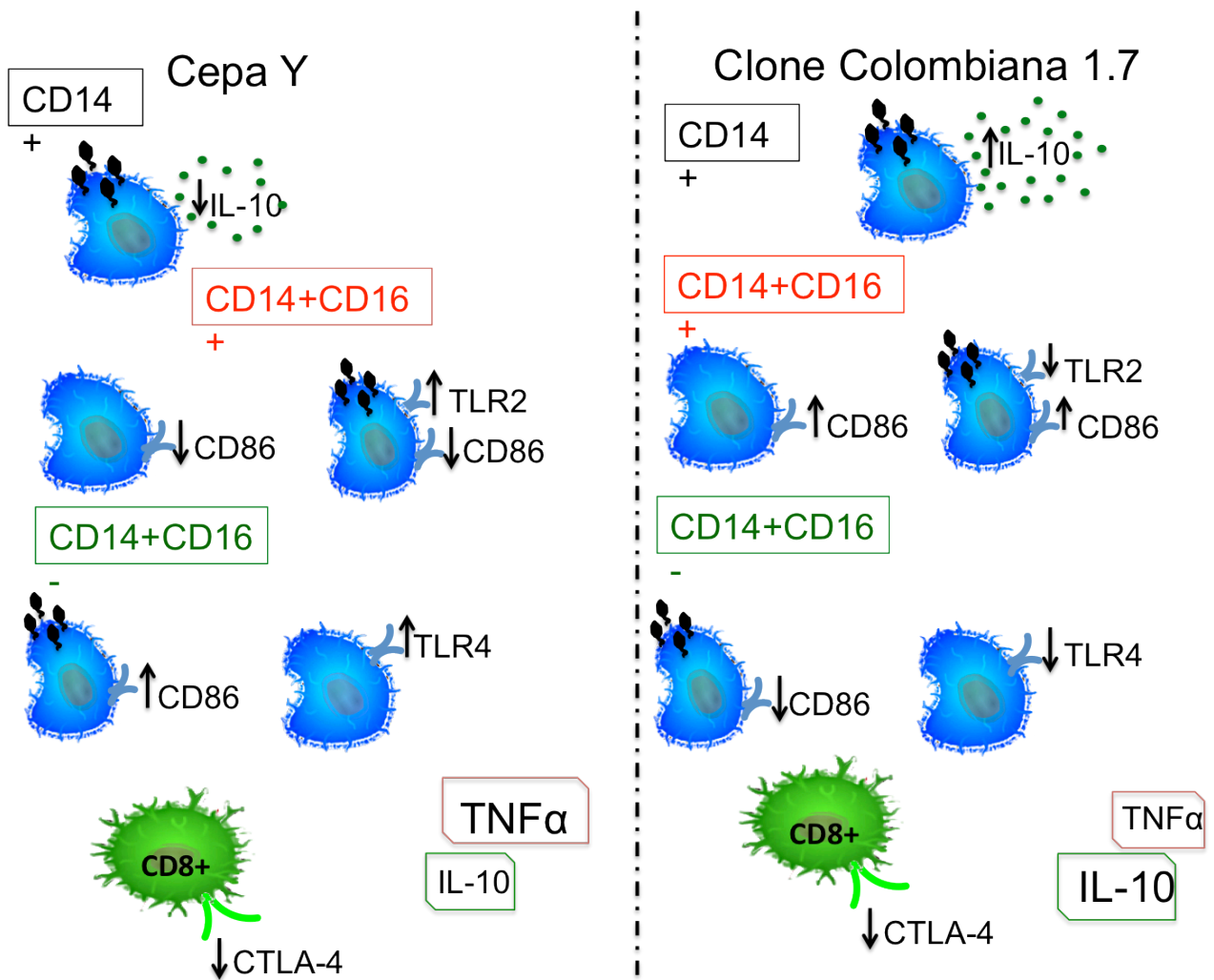


Figura 25: Esquema representativo dos dados obtidos na dissertação.

As observações resumidas acima permitem concluir que a infecção por parasitos da cepa Y e do clone Colombiana 1.7 levam a alterações fenotípicas e funcionais em monócitos e linfócitos humanos.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abrahamsohn IA, Coffman RL 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*; 84:231–44.
- Alvarenga E, Bronfen E 1997 Metaciclologênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor, *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30(3):247-250
- Andrade DV 2012. Aspectos imunorregulatórios nas fases aguda e crônica recente da doença de Chagas: expressão de citocinas e análise de potencial citotóxico, master dissertation. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 87p.
- Andrade SG 1974. Caracterização de cepas de *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3: 65-121.
- Andrade LO & Andrews NW 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology* doi:10.1038/nrmicro1249
- Andrade SG, Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
- Andrade ZA 1999 Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:71-80
- Anonymous 1999 Recommendations from an international symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 94:429-432.
- ANVISA (Agencia nacional de vigilância sanitária) Informe Técnico - nº 35 (2008).
- Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Gironès N, Gea S 2012. Nonimmune cells contribute to crosstalk between immune cells and inflammatory mediators in the innate response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Parasitology Research* doi 10.1155/2012/737324.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A 2006 Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology* 177: 3515–3519
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Heitbrock-Ziegler L 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol* 168: 3536-3542.
- Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle-Rowson G 1997. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 8:73.
- Brener Z 1969. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol* 63:215-220.
- Brener Z 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 82: 205-213
- Burleigh BA, Woolsey AM, 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* 4(11), 701-711
- Buscaglia CA, Di Noia JM. 2003 *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection* 5 419-427

- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, et al. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchor from a protozoan parasite. *J Immunol* 167: 416-423
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and Immunity*, v.64 128-134
- Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. etiologic agent of a new human morbid entity 1909. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1:159–218.
- Carvalho LP, Pearce EJ, Scott P 2008. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, while bystander dendritic cells are activated to promote T cells responses. *J. immunol.* 181(9): 6473-6480
- Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, Macedo S, Atayde VD, Kawashita S, Briones MRS, Yoshida N 2012. Differential Infectivity by the Oral Route of *Trypanosoma cruzi* Lineages Derived from Y strain. *PLoS Negl Trop Dis* 6(10): e1804.
- Costa GC, Rocha MOC, Moreira PR, Menezes CAS, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO 2009. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *The Journal of Infectious Disease* 199:451-4
- Dias JCP 1992. Epidemiology of Chagas disease. In S Wendel, Z Brener, MS Camargo, A Rassi (eds), *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBTBrazil'92, São Paulo, p.49-80
- DNDi – Drugs for neglected Disease, 2011
- Dominguez MR, Ersching J, Lemos R, Machado A, Rodrigues O, De Vasconcelos MM, Ronnie J 2012. Re-circulation of lymphocytes mediated by shingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite. *Vaccine*, v.30 2882-2891.
- Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro MEM e Yoshida N. 1995. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol* 73: 285-289.
- Dutra WO Martins-Filho OA, Cançado JR, et al. 1994. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 6:499-506
- Dutra WO, Gollob KJ 2008 Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21:287-292
- Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, Costa GC, Silveira ABM, Reis DA, Gollob KJ 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz Vol 104: 208-218.*
- Dvorak JA & Hyde TP (1973) *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol* 34: 268–283.
- Fernandes MC & Andres NW 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev* 26: 734-747
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstin M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW 1993. The novel subset of CD14+CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82:31170.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM 2005 Real time PCR strategy for the

- identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected humans tissues. *Int J Parasitol.* 35: 411-417.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, et al. 2006 Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2(3): e24
- Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H et al. 2005 Acute Chagas disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigen. *Acta Cardiol* 60: 33-7
- Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA 2004. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* 201: 9-25.
- Gonçalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM 2011. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J. Exp. Med.* Vol 208 No 6 1253-1265
- Gorla D, Noireau F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America 2010. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research. 1st edition. Burlington (VA): Elsevier INC; p.209-31
- Guedes PMM, Veloso VM, Afonso LCC, Caliari MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Matta MAV, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvão LMC, Bahia MT 2009. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN γ , TNF α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130:43-52.
- Guedes PMM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS 2010. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 4(2): e604
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 7:535-539
- Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD et al. 1997. Association of an increase in CD8+ T cells with presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 56:485-489
- Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub G, Brombacher F 1998 Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*, v66 1208-1215.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, et al 2007. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357: 1018-27
- Janeway CA Jr., Medzhitov R 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- Jones EM, Colley DJ, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL 1993 Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Me.d Hyg.* 48:348-357
- Kawashita C, Sanson GFO, Fernandes O, Zingales B, Briones MRS 2001. Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraespecific evolution. *Mol Biol Evol* 18: 2250-2259

- Linsley PS & Ledbetter JA 1993. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 11: 191-212.
- Linsley PS, Greene JL, Bradley W, Bajorth J, Ledbetter JA, and 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.
- Lopes ER, Rocha A, Meneses AC, Lopes MAB, Fatureto MC, Lopes GP, Chapadeiro E 1989. Prevalência de megas em necropsias realizadas no Triângulo Mineiro no período de 1954 a 1988. *Rev Soc Bras Med Trop* 22:211-215
- Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Póvoa MM, Rodrigues I 1986. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:462-470
- Magalhães LMD, Villani FNA, Nunes MCP, Gollob KJ, Rocha MOC, Dutra WO 2013. High Interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *The Journal of Infectious Disease* 207: 661-5
- Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS 2008. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection* v10, p825-833
- Marganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C, and Fresno M 2008. Rab5 activation by toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. *Traffic*, vol. 9, no. 8, pp. 1299-1315
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel CB e Simões VM, 2007. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease, *Circulation*; 115; 1109-1123.
- Martin D & Tarleton R 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews* 201: 304-317
- Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT et al. 2006 CD8+ T cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog* 2(8): e77
- Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, et al. 1978 Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821
- Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H 2010. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* v185 – 1150-1157.
- Moncayo A. 2003 Chagas disease: Current epidemiological trend after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591
- Morel C, Chiari E, Camargo EA, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814
- Mortara RA, Procópio DO, Barros HC, Verbisck NV, Andreoli WK, Silva RB, da Silva S 1999 Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:135-137
- Neira I, Silva, FA, Cortez M e Yoshida N. 2003. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial

cells. *Infect Immun* 71: 557-561

- Nockler WA and Scherberich JE 1998. Expanded CD14+CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* 66:2782.
- Oliveira A-C, Peixoto RJ, Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, et al. 2004. Expression of functional TLR4 confers pro-inflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173: 5688–5696.
- Oliveira AC, Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, Silva RN, Neves FS, Cavalcanti GS, Boscardin S, Nunes MP, Santiago MF, Nóbrega A, Rodrigues MM, Bellio M. Impaired innate immunity in TLR4-/- mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in TLR4-, TLR2-, TLR9- or Myd88- deficient mice. *PLoS Pathog* 6(4): e1000870. Doi 10.1371
- Ouaissi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, et al. 2002. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168: 6366–6374.
- Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL 2008. CD8+ T cells in infection. *Curr Opin Immunol* 21(4): 385-390
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood Journal* 74: 2527-2534.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003 Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol* 129: 79-90.
- Pena DA, Eger I, Nogueira L, Heck N, Menin A, Báfica A, Steindel M 2011 Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* Population Following Macrophage Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 204:478–86.
- Prata A 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92-100
- Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC et al. 2009. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic chagas cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, vol. 199, no. 12 1838-1845.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas D, Marin-Neto JA, Morillo CA 2010. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e899.
- Rassi Jr A, Rassi A, Rezende JM 2012. American trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am* 26: 275-291
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr et al. 1993 Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8 lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 637-44
- Riley JL, Mao MS, Kobayashi M, Biery J, Buchard G et al 2002 Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11790-11795
- Romanha AJ, da Silva Pereira AA, Chiari E, Kilgour V 1979. Isoenzyme patterns of cultures *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol* 62: 139-142.
- Roffê E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, Antonelli LR, Murphy PM 2012. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* v188 649-660.

- Ruiz RC, Favoreto Jr S, DORTA ML, Oshiro MEM, Ferreira AT, Manquie PM, Yoshida, N 1998. Infective of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signaling activity. *Biochem. J.* 330: 505-511
- Schenkman S, Yoshida N e Cardoso de Almeida ML. 1988b. Glycophosphatidylinositol – anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 29:141-152.
- Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, Corrêa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Favato D, Martins-Filho OA 2003. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal of Immunology* v58-655-663.
- Silva JS, Twadzik DR, Reed SG 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGFβ). *Journal of Experimental Medicine*, v174-539-545.
- Silva JS, Morrisey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulaton of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*. V63-4862-4867
- Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA, 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:111-115.
- da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, et al. 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* 38:1256-1264
- Silvério JC, Pereira IS, Cipitelli MC et al. 2012. CD8+ T cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *T. cruzi* elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathogens*. V8, e 1002645.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996 DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152
- Souza PEA; Rocha MOC; Rocha-Vieira E; Menezes CAS; Chaves ACL; Gollob KJ; Dutra WO 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
- Souza PEA, Rocha MOC, Menezes CAS, Coelho JS, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO 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
- Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, et al. 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectos, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60:25-32
- Tardieux I, Webster P, Racesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE e Andrews NW 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *trypanosoma* invasion of mammalian cells. *Cell* 71:1117-1130.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 115-119
- Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 25: 85-104

- Tibayrenc M, Ayala FJ 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 7:228-232
- Tibayrenc M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol and Dis* 28:2-12
- Vieira PMA, Francisco AM, Souza SM, Malaquias LCC, Reis AB, Giunchetti RC, Veloso VM, Lana M, Tafuri WI, Carneiro CM 2009. *Trypanosoma cruzi*: Serum levels of nitric oxide and expression of inducible oxides in myocardium and splees of dogs in acute stage of infection with metacyclic or blood Trypomastigotes. *Experimental Parasitology* v121 – 76-82.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Moreira MCV, Filho GB, Pena SDJ 2000 Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *American Journal of Pathology* 156:1805-1809
- Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS 1994 Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* - induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* 62: 5177–5182.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Aelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JCP, Elói-Santos SM e Martins-Filho OA 2006. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25 high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clinical and Experimental Immunology* 145: 81-92
- Wang S e Chen L 2004. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol. Immunol.* 1:37-42
- WHO, 2010 “Chagas disease (American trypanosomiasis),” *Factsheet*, no 340.
- Zhang L, & Tarleton RL 1999 Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486.
- Ziegler-Heitbrock HW 1996. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17:424-8
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schimitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 11e74-80.
- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR 1999 Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 159-164.
- Zingales B, Andrade SG, Briones, MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha A, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG 2009 A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1054.