



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**AMANDA CATARINY DE OLIVEIRA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
BENZONIDAZOL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CLONES ISOLADOS  
DE CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*, DE DIFERENTES  
BIODEMAS, SUSCETÍVEIS E RESISTENTES À  
QUIMIOTERAPIA.**

Salvador, BA

2017

**AMANDA CATARINY DE OLIVEIRA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
BENZONIDAZOL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CLONES ISOLADOS  
DE CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*, DE DIFERENTES  
BIODEMAS, SUSCETÍVEIS E RESISTENTES À  
QUIMIOTERAPIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Sonia Gumes Andrade

Salvador, BA

2017

## AGRADECIMENTOS

- À **Deus** por ter me proporcionado força e saúde para alcançar meus objetivos
- À **minha orientadora Dr<sup>a</sup> Sonia Gumes Andrade**, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos não somente teóricos, mas também da ética profissional.
- Ao **Dr<sup>o</sup> Zilton Andrade e à Dr<sup>a</sup> Marcia Souza**, pelas contribuições científicas.
- Aos pesquisadores do LACEI, **Dr<sup>a</sup> Fabiola Cardillo**, sempre solícita a responder as dúvidas e pela amizade, respeito e carinho sempre demonstrados. E o **Dr<sup>o</sup> Thiago Marconi Cardoso** pela contribuição nos experimentos desenvolvidos, apoio científico e amizade.
- Aos queridos amigos do LACEI, **Cayo Amaral Abreu**, pelo companheirismo e confiança desde os tempos da graduação. **Maiara Bonfim** pela cumplicidade e pela presteza em todos os momentos. **Marcos Lázaro** meu eterno professor, pela confiança e dedicação. E **Alessandro Martins** pelo agradável convívio.
- À **Dinalva França de Jesus**, pelas culturas utilizadas neste trabalho, pela palavra amiga nos momentos certos.
- À **Fatima Magalhães**, pelo suporte dado ao laboratório e pela amizade.
- Ao **Preciano Correia**, pela dedicação e cuidado à manutenção do laboratório.
- A todos os meus amigos do LAPEX, em especial, **Elisangela Trindade, Kelvin Edson, Michael Macedo, Carol Casaes, Yuri Tabajara, Ana Cristina Gonzalez**, pela amizade e por sempre estarem disponíveis em ajudar.
- Ao **Antônio Carlos**, pelo carinho, amizade e Zelo.
- As secretárias, **Dilma Amparo e Valdelice Silva** pela ajuda nas questões administrativas.
- A todos os funcionários do biotério pelo cuidado e carinho junto aos animais utilizados na realização deste trabalho. Em especial, **Silviane da conceição**.
- A equipe técnica do Laboratório de Histotecnologia e Plataforma de Citometria de Fluxo do CPqGM, pela dedicação no processamento das amostras.
- A equipe da Pós-graduação, em especial **Dilceia Reis, Aline Luz e Juci**, pelo excelente tratamento desprendido, pela organização, paciência e auxílio nas questões administrativas.

- Ao **corpo docente** do curso de Pós-Graduação em Imunologia pela contribuição na minha formação e exemplo de ética profissional.
- Aos meus pais, **Valdomiro Borges e Maria Imperatriz**, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida, por sempre estarem ao meu lado dando suporte aos meus objetivos.
- Ao meu irmão, **Tiago Oliveira** pela amizade e carinho sempre demonstrados.
- Ao meu noivo, **Tiago Landim** por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda prestada.
- A **todos os meus familiares e amigos**, obrigada por toda amizade e compreensão nos momentos de ausência.
- A **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz** (Fiocruz- Unidade Bahia) por toda infra-estrutura essencial na minha formação profissional e no desenvolvimento dessa Dissertação e, de todos os meus trabalhos já realizados e em andamento.
- A **Capes e CNPq**, pelo financiamento do projeto.

**“A força não provém da capacidade física.  
Provém de uma vontade indomável.”**

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

A resposta imunológica após infecção pelo *Trypanosoma cruzi* desencadeia diversos mecanismos, desta forma células imunológicas tanto da resposta inata quanto da resposta adaptativa estão envolvidas na patogenia da Doença de Chagas (DC), sendo a persistência parasitaria o principal fator para o aumento da gravidade desta doença. Tem sido demonstrado que o Benzonidazol, além de atuar eliminando o parasito pode influenciar na resposta imunológica do hospedeiro. O principal objetivo do estudo foi avaliar a influência do tratamento com o Benzonidazol sobre a resposta imunológica em camundongos infectados com clone da cepa Y (suscetível) e clones da cepa Colombiana (resistente). Foram utilizados 280 camundongos, subdivididos em grupos experimentais: Não Infectado e não tratado (NT); Tratado não infectado (TNI); Infectado com Clone C2/C5 da cepa Colombiana e tratado (COL C2 T/ COL C5 T); Infectado com Clone C2/C5 da cepa Colombiana e não tratado (COL C2 NT/ COL C5 NT); Infectado com Clone C5/C7 da cepa Y e tratado (Y C5 T/ Y C7 T); Infectado com Clone C5/C7 da cepa Y e não tratado (Y C5 NT/ Y C7 NT). O tratamento foi até a 60<sup>o</sup> dose (100mg/kg/dia de BZ). Foi analisado nos diferentes grupos experimentais: parasitemia, taxa de mortalidade, intensidade das lesões necrótico-inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético, níveis de anticorpos específicos, citocinas, quantificação de populações celulares no baço e testes de cura. Observamos lesões mais intensas nos grupos de animais não tratados. A citocina IFN- $\gamma$  foi mais elevado nos grupos infectados com os clones da cepa Y e a TNF- $\alpha$  foi mais elevada nos pontos iniciais. As células de perfil TCD4+CD25+FOXP3+, foram mais elevada nos grupos de animais tratados e estes grupos apresentaram maior expressão de TCD8+ na fase mais tardia. Os grupos infectados com os clones da cepa Y demonstraram menor expressão dos marcadores: CD11cCD80, CD11cCD86, CD11bCD80 e CD11bCD86. O Bz pode influenciar a resposta de algumas populações celulares e a resistência/susceptibilidade das cepas ao tratamento, pode alterar a dinâmica do tratamento e resposta imunológica.

**Palavras-chave:** *T.cruzi*, Benzonidazol, Resposta Imunológica, Clones, Suscetibilidade e Resistência.

## ABSTRACT

The immune response after infection by *Trypanosoma cruzi* triggers several mechanisms, in this way immune cells of both the innate response and the adaptive response are involved in the pathogenesis of Chagas Disease (DC), and the parasite persistence is the main factor to increase the severity of this disease. It has been demonstrated that benznidazole, besides acting to eliminate the parasite, can influence the immune response of the host. The main objective of the study was to evaluate the influence of benznidazole treatment on the immune response in mice infected with strain Y clones (susceptible) and strain Colombian clones (resistant). We used 280 mice, subdivided into experimental groups: Not Infected and untreated (NT); Non-Infected and treated (TNI); Infected with Clone C2 / C5 from the Colombian strain and treated (COL C2 T / COL C5 T); Infected with Clone C2 / C5 from Colombian strain and untreated (COL C2 NT / COL C5 NT); Infected with Clone C5 / C7 from strain Y and treated (Y C5 T / Y C7 T); Infected with Clone C5 / C7 from Y strain and untreated (Y C5 NT / Y C7 NT). The treatment was up to the 60th dose (100mg / kg / day BZ). It was analyzed in the different experimental groups: parasitemia, mortality rate, inflammatory lesions in heart and skeletal muscle, specific antibody levels, cytokines, quantification of spleen cell populations and cure tests. We observed more intense lesions in the groups untreated. The cytokine IFN- $\gamma$  was higher in the groups infected with clones of the Y strain and the TNF- $\alpha$  was higher at the initial points. The TCD4 + CD25 + FOXP3 + cells were higher in the groups of treated animals and these groups had higher TCD8 + expression in the later phase. The groups infected with clones of the Y strain showed lower expression of the markers: CD11cCD80, CD11cCD86, CD11bCD80 and CD11bCD86. Bz may influence the response of some cell populations and the resistance / susceptibility of the strains to the treatment, may change the treatment dynamics and immune response.

**Keywords:** *T. cruzi*, Benznidazole, Immune Response, Clones, Susceptibility and Resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Grupos Experimentais	29
Figura 1 A	Análise da parasitemia dos animais infectados com clones das cepas Colombiana e Y do <i>T. cruzi</i> .	33
Figura 1 B	Índice de mortalidade nos animais infectados com clones das cepas Colombiana e Y do <i>T. cruzi</i> .	33
Tabela 2	Títulos de anticorpos IgG com 30 doses de tratamento em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com clones das cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento.	34
Tabela 3	Títulos de anticorpos IgG com 60 doses de tratamento em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com clones das cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento.	34
Figura 2	Estratégia de análise por citometria de fluxo da frequência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e B do baço de camundongos Swiss.	35
Figura 3	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos T no baço de camundongos Swiss não isogênicos, que apresentaram o marcador CD4 <sup>+</sup> .	36
Figura 4	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos T no baço de camundongos Swiss não isogênicos, que apresentaram o marcador CD8 <sup>+</sup> .	37
Figura 5	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos B no baço de camundongos Swiss não isogênicos, que apresentaram os marcadores B220 (CD45R) e CD38.	38
Figura 6	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos T regulatórios no baço de camundongos Swiss não isogênicos, que apresentaram o marcador CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> .	39
Figura 7	Avaliação da quantitativa da população de CD11c <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> no baço de camundongos Swiss não isogênicos.	40
Figura 8	Avaliação da quantitativa da população de CD11b <sup>+</sup> CD80 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> no baço de camundongos Swiss não isogênicos.	41
Figura 9	Cinética dos níveis plasmáticos de IL-2, em camundongos	42



	Swiss não isogênicos.	
Figura 10	Cinética dos níveis plasmáticos de IL-10, em camundongos Swiss não isogênicos.	43
Figura 11	Cinética dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , em camundongos Swiss não isogênicos.	44
Figura 12	Cinética dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , em camundongos Swiss não isogênicos.	45
Tabela 4	Índices de cura, de camundongos infectados pelos Clones da cepa Colombiana e Y, tratados com Benzonidazol.	46
Figura 13	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados com clones da cepa Colombiana e não tratados com Benzonidazol.	47
Figura 14	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados com clones da cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol.	48
Figura 15	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados com clones da cepa Y e não tratados com Benzonidazol.	49
Figura 16	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados com clones da cepa Y e tratados com Benzonidazol.	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
Bio ou BIO	Biotina
BZ	Benzonidazol
CD	Grupo de diferenciação
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
NT	Não Infectado e não Tratado
COL C2 T	Clone C2 Cepa Colombiana tratado
COL C5 T	Clone C5 Cepa Colombiana tratado
COL C2 NT	Clone C2 Cepa Colombiana não tratado
COL C5 NT	Clone C5 Cepa Colombiana não tratado
DAF	Fator acelerador de decaimento
DC	Doença de Chagas
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTU's	Discrete Typing Units
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína
Foxp3	do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
<i>ICAM-1</i>	do inglês, Intercellular Adhesion Molecule
GITR	do inglês, <i>glucocorticoid-induced TNFR related protein</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDNA	DNA mitocondrial do parasita
LFA	Leukocyte Function Associated Antigen
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
µm	Micra
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NK	Linfócito Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PE	Ficoeritrina
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNI	Tratado não infectado
T.cruzi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Treg	Linfócito T regulatório
RFLP	Random Amplification Of Polymorphic DNA
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
WHO	World Health Organization
YC5 NT	Clone C5 Cepa Y não tratado

YC5 T  
YC7 NT  
YC7 T

Clone C5 Cepa Y tratado  
Clone C7 Cepa Y não tratado  
Clone C7 Cepa Y tratado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 O <i>Trypanossoma Cruzi</i> .....	12
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>T. Cruzi</i> . .....	13
2.2.1 Biodemas .....	13
2.2.2 Zimodemas .....	14
2.2.3 Esquizodemas .....	14
2.2.4 Atual Consenso.....	15
2.3 ESTRUTURA CLONAL DAS CEPAS E A HETEROGENEIDADE DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS .....	16
2.5 FASES DA DOENÇA DE CHAGAS .....	17
2.5.1 Fase Aguda .....	17
2.5.2 Forma Indeterminada.....	18
2.5.3 Fase Crônica .....	18
2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO <i>T.cruzi</i> .....	19
2.6.1 Resposta Imune Inata.....	19
2.6.2 Resposta Imune Adaptativa.....	22
2.7 QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS .....	23
2.8 BENZONIDAZOL E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	24
3 HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO .....	26
4 OBJETIVOS .....	27
4.1 OBJETIVO GERAL .....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
5 CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Dinâmica de células imunológicas em camundongos Swiss, infectados com clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Biodemas I e III), após tratamento com Benzonidazol. ....	28
5.1 INTRODUÇÃO .....	28
5.2 METODOLOGIA .....	29
5.3 RESULTADOS.....	33
5.4 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO GERAL.....	58
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em 1909, o médico e pesquisador Carlos Chagas, descreveu a doença de Chagas (DC) que hoje também é conhecida como Tripanossomíase Americana. No mesmo momento da descoberta da doença, Chagas descreveu o agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi* e sua forma de transmissão (CHAGAS, 1909).

A DC era uma doença exclusiva dos países do cone Sul, estas ainda são áreas que apresentam maiores taxas de incidência e prevalência, visto que, estão ligadas à condições de moradia, educação e higiene. Porém, atualmente outros países antigamente não endêmicos têm apresentado casos da DC (BRICENO-LEON, 2009; SOSA, 2010; ZELEDON 2012).

Desde 1909 até os dias atuais, diversos estudos tem proporcionado uma melhor compreensão dos mecanismos da doença, como: resposta à quimioterapia, mecanismos imunológicos, genética do parasita e características bioquímicas. Entretanto, diversos pacientes chagásicos ainda carecem de tratamento de forma eficiente, onde seja alcançada a cura parasitológica e a redução das lesões inflamatórias.

O tratamento medicamentoso, esta focado ainda em dois fármacos o Nifurtimox (BOCK *et al.*, 1972) e o Benzonidazol (RICHLE, 1973). No Brasil, somente o Benzonidazol é utilizado para o tratamento da DC. Estudos demonstram que as cepas do *T.cruzi*, variam quanto à resistência/ susceptibilidade aos fármacos (ANDRADE e FIGUEIRA 1977; ANDRADE *et al.*, 1985). Essas variações foram correlacionadas aos tipos biológicos (Biodemas). As cepas do Tipo I (Y e Peruana) apresentam alta suscetibilidade, as de Tipo II (cepas de São Felipe e Mambaí) média suscetibilidade e as de Tipo III (Colombiana e Montalvânia) alta resistência.

Embora os resultados dos estudos para avaliação da quimioterapia em DC apresentem variações quanto a susceptibilidade entre as populações de *T.cruzi*, é de interesse se investigar qual o fator, ou os fatores que estariam influenciando nos diferentes perfis de resposta ao tratamento evidenciado nas cepas de diferentes Biodemas (Tipo I , Tipo II e Tipo III) e, o papel do Benzonidazol sobre a resposta imunológica de camundongos infectados com diferentes clones de cepas de *T.cruzi*.

Diversos estudos tem demonstrado à interação entre o Benzonidazol e a resposta imunológica (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2002; VIOTTI *et al.*, 2011). Seja o aumento da ação das citocinas como o IFN- $\gamma$ , em animais tratados e desta forma aumentando os índices de cura (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001). Ou até na redução de apoptose, assim como elevação da expansão de células T CD8 + de memória efetora, quando comparados animais tratados com animais não tratados (OLIVIERI *et al.*, 2002).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Trypanossoma Cruzi

O *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à classe Zoomastigofora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, Subgênero *Schyzotripanum* (MYLER, 1993; CORLISS, 1994).

Quanto às formas evolutivas, o *T.cruzi* pode apresentar três formas distintas, que são:

1. Amastigota – forma intracelular, sem flagelo, com cinetoplasto localizado ao lado do núcleo. Esta é a forma de reprodução no hospedeiro vertebrado.
2. Epimastigota– encontrada no tubo digestivo do vetor, local da sua replicação, não infectante para os vertebrados. Apresenta morfologia fusiforme e cinetoplasto junto ao núcleo. Possui flagelo e membrana ondulante
3. Tripomastigota– forma extracelular circulante no sangue dos vertebrados. Apresenta flagelo e membrana ondulante. O cinetoplasto fica localizado na extremidade posterior do parasito. Esta é a forma infectante para os vertebrados.

O *T.cruzi* é transmitido através de triatomíneos, insetos conhecidos como barbeiros, sendo estes de diferentes gêneros, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. São encontrados nos territórios desde o sul dos Estados Unidos à Argentina (VINHAES e DIAS, 2000; FRÍAS-LASSERRE, 2010).

O ciclo de desenvolvimento do *T.cruzi* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando as formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes do vetor, penetram na pele lesionada ou mucosa do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo do vetor. Os triatomíneos podem se infectar ao sugarem o sangue de um hospedeiro vertebrado

infectado, no qual ingerem formas tripomastigotas sanguícolas, iniciando-se uma nova fase de desenvolvimento (REY, 2001).

A transmissão do *T.cruzi* ocorre não somente pelos vetores, pode ser transmitido por transfusão sanguínea, congênita, transplante de órgãos, ingestão de alimentos contaminados e envolvendo acidentes em laboratório (DIAS 2000).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *T. Cruzi*.

Desde a descoberta da doença de Chagas por Carlos Chagas, existe uma preocupação em isolar as formas do parasita, seja de hospedeiros vertebrados ou de insetos vetores e manter em laboratório por passagens em animais ou em culturas. Estes isolados são denominados Cepas (LUMSDEN, 1977). As Cepas do *T.cruzi* são classificadas de acordo com as características biológicas (Biodemas), características bioquímicas (Zimodemas) e características genéticas (Esquizodemas).

### 2.2.1 Biodemas

Estudos sobre o comportamento biológico das cepas do *T.cruzi* tais como: parasitemia, morfologia no sangue periférico, tropismo tissular, virulência e patogenicidade, permitiram agrupar os isolados em três Biodemas: I, II e III (ANDRADE, 1974).

As cepas do Biodema tipo I protótipo Y e Peruana, são caracterizadas por macrófagotropismo na fase inicial da infecção, ocorre parasitismo em diversos órgãos, principalmente no baço, fígado e linfonodos. Apresentam picos parasitêmicos em torno do 7º dia após infecção e alta mortalidade precocemente. Mais tardiamente na fase aguda, observam-se lesões inflamatórias no coração e musculo esquelético (ANDRADE, 1974).

As cepas do Biodema tipo II representados por isolados obtidos da Bahia, 12SF e 21SF, são caracterizadas por uma infecção de curso lento, com picos irregulares entre 20 e 25 dias. Lesões predominantes em miocárdio onde se observa um



processo intenso de miocardite, assim como lesões em músculo esquelético e músculo liso (ANDRADE, 1974).

Durante a infecção pelas cepas do Biodema tipo III, a parasitemia evolui lentamente, sendo os maiores picos entre 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após infecção, baixas taxas de mortalidade. As cepas deste Biodema parasitam principalmente o músculo esquelético (ANDRADE, 1974).

### **2.2.2 Zimodemas**

A classificação em Zimodemas leva em consideração os padrões isoenzimáticos, através da análise eletroforética de enzimas multilocus em gel de amido. As enzimas utilizadas nessa classificação são: AST (aspartato amino-transferase), ALT (alanina aminotransferase), PGM (fosfoglugomutase), GPI (glicose fosfoisomerase), ME (enzima málica) e G6PD (glicose 6-fosfato desidrogenase). Esses padrões foram estabelecidos por MILES *et al.* (1980), utilizando 3 zimodemas Z1, Z2, Z3 e por ROMANHA (1982) utilizando 4 zimodemas ZA, ZB, ZC, ZD.

Os Biodemas também podem ser correlacionados com zimodemas específicos, (ANDRADE *et al.*, 1983) estabeleceram essa correlação onde as cepas do Biodema Tipo II correspondem ao Zimodema 2 e as do Tipo III correspondem ao Zimodema 1. Entretanto, as cepas do Biodema Tipo I, devido ao seu perfil peculiar, foram posteriormente identificadas em cepas da Bolívia (TIBAYRENC e MILES, 1983) e do Chile (MILES *et al.*, 1984), sendo correspondente ao Zimodema Z2b.

### **2.2.3 Esquizodemas**

A análise por meio de esquizodemas foi introduzida por MOREL *et al.* (1980) com intuito de caracterizar o *T.cruzi* de acordo com os caracteres genotípicos. A caracterização baseia-se na análise do DNA do cinetoplasto (kDNA). O kDNA é organizado em uma rede de círculos ligados entre si, que diferem em tamanho e função, denominadas de minicírculos e maxicírculos. Os minicírculos são compostos por regiões conservadas e variáveis, que não codificam peptídeos, e podem variar entre diferentes cepas ou isolados do parasita (SIMPSON, 1987).

São analisados fragmentos do kDNA resultantes da digestão por enzimas (endonucleases de restrição). Através dessa técnica podem-se gerar perfis de bandas cepa-específica, indicando diferentes graus de variabilidade intraespecífica nas sequências dos minicírculos do kDNA. (MOREL *et al.*, 1980).

#### 2.2.4 Atual Consenso

Em 2009, no segundo "Satellite Meeting" , a comunidade científica sentiu a necessidade de mais uma vez padronizar a classificação do *T.cruzi*. Esta nova nomenclatura também objetivou facilitar a comunicação entre os pesquisadores que trabalham com o *T.cruzi*. Nessa nova padronização o *T.cruzi* é dividido em seis grupos (*T. cruzi* I–VI) e cada grupo denominado DTU ("discrete typing unit"), definido como um conjunto de isolados geneticamente semelhantes (ZINGALES *et al.*, 2009).

2009 nomenclature for *Trypanosoma cruzi* divisions

DTU designation	Abbreviation	Equivalence to former <i>T. cruzi</i> grouping schemes
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I <sup>a,b</sup> and DTU I <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II <sup>a</sup> and DTU IIb <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT <sup>d</sup> , Z3-A <sup>e</sup> , DTU IIc <sup>e</sup> and <i>T. cruzi</i> III <sup>f</sup>
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 <sup>d</sup> , Z3-B <sup>e</sup> and DTU IIa <sup>c</sup>
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Bolivian Z2 <sup>d</sup> , rDNA 1/2 <sup>e</sup> , clonet 39 <sup>h</sup> and DTU II <sup>d</sup>
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguayan Z2 <sup>i</sup> , Zymodeme B <sup>j</sup> and DTU II <sup>e</sup>

(ZINGALES *et al.*, 2009)

#### 2.3 ESTRUTURA CLONAL DAS CEPAS E A HETEROGENEIDADE DO *Trypanosoma cruzi*.

A definição de clones no contexto utilizado para o *T.cruzi* ,é que Clone é um isolado originado através da diferenciação mitótica de um único parasito.

Segundo TIBAYRENC *et al.* (1986) o *T.cruzi* possui uma estrutura e evolução clonal. O modelo proposto explica que a reprodução sexual ou recombinação genética é um fenômeno raro, ou inexistente, apontando para o fato de que variações biológicas e genéticas encontradas podem ser explicadas pela evolução independente de múltiplas linhagens clonais. Esses parâmetros foram estabelecidos após análise e

caracterização isoenzimática (15 loci enzimáticos), com amostras originárias de diversos hospedeiros. Foram encontrados 43 grupos genéticos distintos, denominados clones naturais.

Outros estudos utilizaram a técnica de RFLP e RAPD, confirmam a heterogeneidade genética dentro da espécie (TIBAYRENC *et al.*, 1993; MACEDO e PENA, 1998; MCADAM *et al.*, 1998).

Essa ampla diversidade gênica pode influenciar nas diferenças biológicas. Sendo assim clones geneticamente mais próximos podem apresentar características biológicas e clínicas semelhantes e os clones geneticamente mais distantes podem apresentar essas características menos semelhantes (TIBAYRENC *et al.*, 1993). O que foi demonstrada através de diversos estudos as diferenças de acordo com os parâmetros de: virulência, capacidade de multiplicação no hospedeiro, patogenicidade, susceptibilidade frente a agentes quimioterápicos entre outras características causando implicações importantes na imunopatologia da doença de Chagas (BRENER e CHIARI, 1963; BRENER, 1969; ANDRADE, 1974; MILES *et al.*, 1980; ANDRADE *et al.*, 1991; DEVERA, 2003)

Por outro lado ANDRADE (1999) sugere a presença de clones principais numa mesma área endêmica, sendo esses responsáveis pelas manifestações da doença e resposta quimioterápica em pacientes destas áreas.

Um estudo utilizando a cepa parental 21SF, seus clones e subclones, demonstrou que havia uma grande similaridade genotípica e fenotípica entre a cepa e seus clones. Confirmando a existência de um clone principal, responsável pelas características intrínsecas das cepas do *T.cruzi* (CAMPOS e ANDRADE, 1996).

#### 2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo estão infectados com o *T.cruzi*, principalmente em 21 países endêmicos da América Latina (WHO, 2016).

A doença de Chagas ocorre, principalmente e historicamente, na região continental dos países da América Latina. Atualmente tem sido cada vez mais frequente a detecção de casos no Estados Unidos da América, Canadá, países Europeus e alguns países ocidentais do Pacífico, principalmente devido à mobilidade da população entre América Latina para outros países (BRICENO-LEON, 2009; SOSA, 2010; ZELEDON 2012)

No Brasil, dados atuais, demonstram redução da transmissão vetorial e aumento da transmissão oral, visto que os estados do Norte têm sido mais afetados. De acordo com o Ministério da Saúde, 75 % dos casos ocorridos no Brasil ocorreram no estado do Pará. Aproximadamente 50 % dos indivíduos apresentaram os sintomas de fase aguda. Estes casos foram detectados entre os meses de agosto e novembro para os anos de 2007 a 2013, período que coincide com os meses de safra do açaí no Pará (SAÚDE, 2015)

## 2.5 FASES DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta em três fases distintas, do ponto de vista clínico-patológico, que são: aguda, indeterminada e crônica (RASSI JR *et al.*, 2012)

### 2.5.1 Fase Aguda

A fase aguda pode ser do tipo assintomático ou sintomático. Quando apresenta sintomas, são eles: febre, mal-estar e fraqueza, dor de cabeça, aumento do baço, do fígado e linfonodos. Em crianças, pode se apresentar numa forma grave, com miocardite aguda, falência cardíaca e meningoencefalite (ANDRADE *et al.*, 1994). Além disso, a fase aguda pode ser identificada pelos sinais de porta de entrada da infecção que são: o sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral com adenite satélite pré-auricular) e o Chagoma de inoculação (presente na pele) (ROMAÑA, 1943; RASSI JR *et al.*, 2012)

Outra característica importante da fase aguda da doença é a alta parasitemia. A presença do parasito pode ser detectada no sangue periférico do hospedeiro, através do exame microscópico de um esfregaço de sangue fresco. Devido aos sintomas de fase aguda não serem, muitas vezes, percebidos, o tratamento

farmacológico adequado não é empregado a estes pacientes, o que dificulta a eliminação e/ou redução dos parasitos (DIAS e COURA, 1997).

### **2.5.2 Forma Indeterminada**

Esta é a fase, a qual cerca de 70 % dos pacientes da fase aguda progride. Caracterizada por um estado de aparente equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (BRASIL, 2009). Os Pacientes permanecem assintomáticos, com sorologia positiva, porém sem sinais físicos ou evidência clínica de comprometimento de órgãos (BRENER, 2000). Os fatores que estabelecem a fase indeterminada, o tempo de duração ou evolução não são bem estabelecidos (DIAS e COURA, 1997).

### **2.5.3 Fase Crônica**

A fase crônica pode ser dividida em três tipos: cardíaca, digestiva ou mista (acometimento cardíaco e digestivo).

#### Forma cardíaca

A cardiopatia crônica é a forma com a maior taxa de mortalidade e morbidade associada à doença de Chagas, devido aos danos no sistema de condução do coração e pela ocorrência de falência cardíaca nos casos mais severos. O paciente cardiopata Chagásico pode chegar à morte devido à insuficiência cardíaca, por arritmias severas e também por trombo-embolismos (DIAS e COURA, 1997).

O parasitismo intracelular gera miocardiopatia infamatória progressiva, fibrosante. Caracterizada também por destruição de nervos cardíacos, com intenso infiltrado mononuclear, com áreas de necrose e fibrose de células cardíacas, o que resulta na insuficiência cardíaca (ANDRADE *et al.*, 2000).

#### Forma Digestiva

As alterações no trato digestivo decorrem do comprometimento do sistema nervoso entérico, as células nervosas sofrem degeneração devido à intensa inflamação local.

As lesões são predominantes no esôfago e no cólon terminal (megaesôfago e megacólon), representam o comprometimento digestivo (DIAS e COURA, 1997; RASSI JR *et al.*, 2012).

A destruição dos plexos nervosos tem como consequência alterações nas secreções, na absorção e na atividade motora do aparelho digestivo. O megaesôfago é caracterizado pela falta de coordenação motora e dilatação esofágica, acarretando na dificuldade de deglutição. Por outro lado, no megacólon as lesões afetam os segmentos finais do reto e sigmoide e leva à constipação crônica (STEINDEL *et al.*, 2005; DUTRA e GOLLOB, 2008)

## 2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO *T.cruzi*

A resposta imunológica após a infecção pelo *T.cruzi* envolve tanto componentes do sistema imune inato quanto do adaptativo. Na porta de entrada do parasito, ocorre uma reação inflamatória decorrente da ativação do sistema Imune Inato. No entanto, a resposta imune adaptativa inicia nos linfonodos drenantes, resultando na ativação de diversas células e na produção de anticorpos específicos, estes começam a ser produzidos cerca de uma ou duas semanas após a infecção (OCHSENBEIN e ZINKERNAGEL, 2000).

Na fase aguda da doença a resposta imune pode ser eficiente no controle dos parasitas circulantes e dos intracelulares, porém não é eficiente em eliminar o agente patogênico, desta forma não consegue interromper a infecção. O parasita então persiste nos tecidos por um longo tempo, podendo expressar uma fase assintomática. A persistência parasitária tecidual tem sido relacionada à patogênese Chagásica experimental (LEON *et al.*, 2003; VIOTTI *et al.*, 2006; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; PORTELLA e ANDRADE, 2009)

### 2.6.1 Resposta Imune Inata

Diversos mecanismos estão envolvidos na resposta imune inata, como a ativação de células e dos componentes do sistema complemento (CUERVO *et al.*, 2011).

O sistema complemento é constituído por proteínas solúveis no plasma que podem ser ativadoras ou reguladoras, e por proteínas que são expressas na membrana celular. A ativação e funcionamento deste mecanismo de defesa é baseado em cascatas proteolíticas. Onde serão gerados diversos produtos proteolíticos que desempenham a função do sistema complemento. O complemento pode ser ativado por três vias diferentes: a clássica, a alternativa e a via das lectinas. O evento central da cascata e ativação do complemento é a proteólise da proteína C3 (ABBAS, 2012)

Diversos pesquisadores demonstraram que a forma tripomastigota do *T.cruzi* (forma infectante) são resistentes à ação lítica do complemento, o que difere da forma epimastigota que é destruída após ação do sistema complemento (NOGUEIRA *et al.*, 1975; TAMBOURGI *et al.*, 1993). O mecanismo de evasão da forma tripomastigota esta associada à presença da proteína regulatória semelhante à proteína DAF humana (proteína que desestabiliza a estrutura da C3 convertase). As proteínas T-DAF e a gp160 foram clonadas e apresentam homologia molecular com a proteína DAF humana (TAMBOURGI *et al.*, 1993). Por outro lado CESTARI *et al.* (2012) demonstraram outro mecanismo de evasão, onde é mediado por vesículas derivadas da membrana plasmática da célula do hospedeiro. Os tripomastigotas atuam induzindo a formação de vesículas, estas quando liberadas irão formar um complexo na superfície do parasito o que leva à desestabilização e inibição da C3 convertase. Porém, a capacidade de evasão depende das variações antigênicas associadas ao parasita (CESTARI *et al.*, 2013).

Além da ação do sistema complemento, podem-se destacar as células fagociticas como macrófagos e células dendriticas, células endoteliais, fibroblastos e células mesênquimais, visto que o *T.cruzi* pode infectar essas células e serem fagocitadas por macrófagos e células dendriticas. Esse mecanismo irá desencadear uma série de interações moleculares que estimularão células da imunidade inata e adaptativa gerando uma reação inflamatória local e sistêmica (ALIBERTI *et al.*, 1996).

As células fagociticas são as principais células na linha de defesa inicial. Essas células possuem receptores de reconhecimento padrão (PRR) capazes de reconhecer as moléculas denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os receptores do tipo Toll e do tipo NOD são exemplos de

importantes receptores da família PRR (CARNEIRO-SAMPAIO e COUTINHO, 2007).

A invasão dos macrófagos, promove a secreção da IL-12, esta citocina ativa as células NK a produzirem IFN- $\gamma$  (ALIBERTI *et al.*, 1996; CARDILLO *et al.*, 1996) e essas atuam também ativando os macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1992). Os macrófagos também podem secretar a TNF- $\alpha$ . Diversos pesquisadores demonstraram que a IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e a IL-12 podem desempenhar papéis protetores, visto que podem assegurar a indução de uma eficiente resposta adaptativa, porém a TNF- $\alpha$  também pode apresentar efeitos deletérios na resposta do hospedeiro (OSWALD *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 1997).

O macrófago por sua vez, pode apresentar amplificação nos mecanismos microbicidas através do aumento na produção de componentes oxidativos que atuam contra patógenos intracelulares (GAZZINELLI *et al.*, 1992). A IL-10 e TGF- $\beta$  desempenham um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, elas podem inibir *in vitro* a produção de NO e a atividade tripanomicida dos macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1992; ROFFE *et al.*, 2012).

As células dendríticas, são responsáveis pela ativação das células T antígeno-específicas. Estas são originadas na medula óssea e após serem maturadas, se distribuem em tecidos linfoides e não-linfoides (HART e MCKENZIE, 1990). Quando ativadas por diversos estímulos, essas células capturam e processam os antígenos, e podem migrar para baço ou para os linfonodos e assim, ativarem os Linfócitos T. A ativação dessas células decorrem da ligação do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) ao receptor das células T (TCR) e com moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 e adesão LFA e ICAM (HART e MCKENZIE, 1990; MCADAM *et al.*, 1998).

A persistência das lesões inflamatórias na Doença de Chagas pode estar relacionada com a atuação das células dendríticas. ANDRADE *et al.* (2000) observou a presença de células dendríticas intersticiais no miocárdio de cães infectados com *T. cruzi*, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção, sugerindo



que estas células são responsáveis pela estimulação antigênica inicial e tardia da doença, inferindo que essas células participam da manutenção da resposta imunológica.

### 2.6.2 Resposta Imune Adaptativa

A resposta adaptativa é definida pela ativação, expansão clonal de linfócitos antígenos específico e o aparecimento da memória imunológica (FEARON e LOCKSLEY, 1996). Na infecção pelo *T.cruzi* não é diferente de muitas infecções, ocorre uma intensa expansão de clones de células T e B e intensa produção de imunoglobulinas (ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1980; MINOPRIO *et al.*, 1986).

O papel dos linfócitos T CD4+ na resposta ao *T.cruzi* esta associada com a ativação imunológica de macrófago infectados e com a destruição de parasitas pelas células do perfil Th1, produtoras de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, ZHANG e TARLETON (1996) demonstraram que a resposta Th1 na DC é inicial, porém esta se extingue, e dá lugar à atividade das células do tipo Th2 que irá persistir durante a fase crônica. No entanto, foi demonstrado que no tecido cardíaco os linfócitos T CD8+ são as células em maior número (REIS *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1997). Tem sido demonstrado o papel das células T CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  no controle da infecção pelo *T.cruzi* (MARTIN e TARLETON, 2004; TZELEPIS *et al.*, 2007). Em contrapartida, os linfócitos T CD8+ produtores de granzimas A podem ser associados com a gravidade de lesões cardíacas na doença de Chagas crônica (REIS *et al.*, 1993; SILVERIO *et al.*, 2010).

As células T regulatórias, caracterizadas fenotipicamente pelos marcadores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp<sup>3</sup> (HORI *et al.*, 2003; RAMSDELL, 2003; SHEVACH e STEPHENS, 2006). Diversos pesquisadores demonstraram que essas células são produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$  (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006; BELKAID e OLDENHOVE, 2008; TOSELLO *et al.*, 2012). As células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp<sup>3</sup> na fase aguda da infecção, podem atuar na imunorregulação da resposta inflamatória, e desta forma desempenhar um papel na redução das lesões necróticas inflamatórias e elevar a sobrevivência dos camundongos (MARIANO *et al.*, 2008).

Na doença de Chagas experimental ocorre ativação e aumento policlonal dos linfócitos B tanto na fase aguda quanto crônica (D'IMPERIO *et al.*, 1985; MINOPRIO *et al.*, 1986). A ativação dessas células resulta numa hipergamaglobulinemia poliisotípica. A redução parasitemica pode ser relacionada com o aumento dos isotipos específicos de anticorpos das classes IgG1, IgG2a e IgG2b, estes estão envolvidos na eliminação das formas sanguíneas (BRODSKYN *et al.*, 1989 ; SILVERIO *et al.*, 2010).

## 2.7 QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

O objetivo do tratamento da doença de Chagas é a erradicação do *T.cruzi* e a redução do aparecimento de leões e complicações relacionadas à patologia (SAUDE, 1992).

A partir da descoberta em 1909 foram avaliadas uma série de compostos em animais e em pacientes (COURA e CASTRO, 2002). No período de 1912 a 1962, foi uma importante fase onde diversas drogas foram testadas em animais e pacientes chagásicos sem êxito: arsenicais, antimoniais, derivados do quinino, sulfas e antibióticos, diminuía a parasitemia e a letalidade da doença, porém não promoviam a cura parasitológica nas cepas avaliadas (BRENER, 2000). Pode destacar o ano de 1967, neste período foram introduzidos nitrofuranos, tais como Nitrofurazone, Nifurtimox e Benzonidazol (BOCK *et al.*, 1969).

O Benzonidazol e o Nifurtimox foram amplamente utilizados e aceitos devido à eficácia na fase aguda, atualmente no Brasil só o Benzonidazol é liberado para o tratamento.

O Benzonidazol e o Nifurtimox têm atividade tripanomicida tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra as formas do *T.cruzi*. O mecanismo de ação dessas drogas é relacionado há geração de radicais livres e metabólitos eletrofilicos (MAYA *et al.*, 2003). Os compostos gerados agem ligando-se a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (GOIJMAN e STOPPANI, 1985). Ambos apresentam baixa especificidade, o que favorece o aparecimento de efeitos adversos citotóxicos ao tratamento. Os efeitos mais comuns são: perda de peso, sonolência, dermatite, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (RASSI JR *et al.*, 2012).

Além dos efeitos tóxicos existe uma variação ao grau de susceptibilidade e resistência ao Benzonidazol de acordo com a cepa. As variações quanto ao grau de resistência e susceptibilidade foram relacionadas com os diferentes biotopos (ANDRADE e FIGUEIRA 1977). Estes estudos caracterizaram as cepas de Tipo I (Y e Peruana) como de alta suscetibilidade, as de Tipo II (cepas de São Felipe e Mambai) como de média suscetibilidade e as de Tipo III (Colombiana e Montalvânia) como de alta resistência.

Algumas pesquisas ainda versam na busca por tratamentos alternativos, a exemplo de princípios ativos presentes em plantas e produtos naturais, desta forma foram identificados compostos com atividade anti-*T. cruzi* como naftoquinonas, terpenóides, isoflavonas e alcalóides (HIGASHI e CASTRO, 1994; MORELLO *et al.*, 1994; BERNARDES *et al.*, 2006).

## 2.8 BENZONIDAZOL E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Estudos experimentais têm destacado o papel do Benzonidazol sobre o sistema imunológico (MURTA *et al.*, 1999; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; VIOTTI *et al.*, 2011).

MICHAILOWSKY *et al.* (2001), avaliaram o papel da IL-12 e IFN- $\gamma$  em animais infectados com cepas de diferentes graus de resistência ao BZ, constataram que existe uma menor capacidade de indução da citocina IL-12 pelas cepas mais resistentes. E que a IL-12 e o IFN- $\gamma$  podem auxiliar o efeito tripanomicida do Benzonidazol. ROMANHA *et al.* (2002) também avaliaram a interação entre o BZ e o IFN- $\gamma$ , o referido estudo comparou os índices de cura após tratamento em camundongos selvagens (não geneticamente modificados) com o de animais knockout (KO) para o IFN- $\gamma$ , e constataram que os animais selvagens tiveram maior índice de cura. Além disso, é descrito também que o BZ potencializa a fagocitose e a produção de citocinas que lisam o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de IFN- $\gamma$  (DIAZ DE TORANZO *et al.*, 1988). Por outro lado, infere-se que o tratamento do BZ na fase aguda da infecção pode reduzir a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos no baço, o que pode diminuir a necrose tissular e elevar os índices sobrevivência dos camundongos (LIMA *et al.*, 2001).

OLIVIERI *et al.* (2005) verificaram menores índices de apoptose em linfócitos duplo positivo CD4+/CD8+ em animais infectados e tratados. Outro órgão linfoide, o baço, pode ser influenciado pelo BZ, observou-se que em animais experimentais infectados com a cepa Y, ocorre a reversão total do aumento da massa absoluta do baço no 9º dia após tratamento e que a expansão dos linfócitos T foi revertida no 14º após tratamento (OLIVIERI *et al.*, 2006).

DOS SANTOS *et al.* (2009), realizaram um estudo experimental utilizando os diferentes genótipos clonais do *T. cruzi* e constataram que o tratamento com BZ é capaz de influenciar na expressão de diferentes classes de imunoglobulinas e que isto está associado com a fase da infecção

### **3 HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO**

O Benzonidazol fármaco de primeira escolha para o tratamento da Doença de Chagas e o único utilizado no Brasil, atua estimulando a expansão celular e induz ou reprime a produção de citocinas, desta forma o BZ pode influenciar os mecanismos imunoregulatórios e na resposta ao tratamento.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a resposta imunológica em camundongos infectados com clones do *T. cruzi* de diferentes Biodemas (Tipo I e Tipo III) suscetíveis e resistentes ao quimioterápico, procurando verificar a influência do tratamento com Benzonidazol sobre resposta imunológica na infecção pelo *T. cruzi*.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do Benzonidazol sobre a resposta imunológica em camundongos Swiss na fase aguda e crônica da infecção, infectados com clones das cepas Y e Colombiana;
- Avaliar os componentes celulares do processo inflamatório no coração e músculo esquelético, em animais infectados tratados e não tratados na fase aguda e crônica da infecção pelos clones das cepas Y e Colombiana, em comparação com animais tratados não infectados;
- Investigar as alterações sorológicas pelos níveis de anticorpos específicos através da imunofluorescência indireta (sorologia);
- Quantificar as populações celulares (linfócitos B,T regulatórias, CD4+,CD8+ e células dendríticas) no baço em animais infectados não tratados, infectados e tratados e nos tratados e não infectados;
- Investigar os níveis de citocinas circulantes durante o tratamento na fase aguda e na fase crônica da infecção, em todos os grupos experimentais;
- Correlacionar os resultados obtidos com o grau de resistência e susceptibilidade ao quimioterápico.

## **5 CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Dinâmica de células imunológicas em camundongos Swiss, infectados com clones de *Trypanosoma cruzi* (Biodemas I e III), após tratamento com Benzonidazol.**

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

### 5.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença infecciosa, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Há estimativas de que cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o *T.cruzi*, em sua maioria em países endêmicos da América Latina (WHO, 2016).

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda inicial, com presença de parasitas circulantes e muitas vezes com sintomas inaparentes. E uma fase crônica que pode ser caracterizada pelas formas clínicas: indeterminada, cardíaca digestiva ou mista. Na forma indeterminada apresenta poucas ou nenhuma alteração e somente a sorologia é positiva. Nas demais formas, a sorologia é concordante com os achados clínicos onde cerca de 30% dos indivíduos podem desenvolver alterações cardíacas e 10% desenvolver a forma digestiva ou mista (MACEDO, 1997; WHO, 2016)

O tratamento da DC é um problema que ainda carece de atenção, o Benzonidazol (BZ), é o fármaco mais utilizado com esta finalidade. Quando administrado precocemente e por tempo prolongado pode promover 50-70% de cura parasitológica, porém na fase crônica da infecção tem menores níveis de eficácia (DE ANDRADE *et al.*, 1996; DIAS e COURA, 1997; MACEDO, 1997; MORILLO *et al.*, 2015).

Nos indivíduos imunocompetentes, a defesa contra o parasita pode ser articulada por diversos mecanismos imunológicos, sendo estes relacionados com a ativação da imunidade inata e adaptativa. O processo inflamatório inicial envolve a presença de células NK, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DEUTSCHLANDER *et al.*, 1978; CARDILLO *et al.*, 1996; SARDINHA *et al.*, 2006). Numa segunda etapa, período intermediário e tardio da fase aguda, elementos celulares e humorais da imunidade adaptativa como: células T CD4, CD8 e B, assim como anticorpos,

começam atuar para conter a infecção e reduzir a parasitemia (ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1980; MINOPRIO *et al.*, 1986; BRODSKYN *et al.*, 1989 ; SILVERIO *et al.*, 2010). Por outro lado na fase crônica se mantém a resposta imune específica adquirida, com presença de células de memória e altos níveis sorológicos de citocinas (ARAÚJO-JORGE, 2000). Pode-se destacar o papel das citocinas na infecção, que podem conferir ao hospedeiro maior resistência, como IFN- $\gamma$  e IL-12 (ALIBERTI *et al.*, 1996; SARDINHA *et al.*, 2006).

Diversos pesquisadores têm demonstrado o sinergismo entre o sistema imunológico e o tratamento com BZ, diante disso propusemos investigar o efeito do BZ sobre células imunológicas das respostas inata e adaptativa, assim como na secreção de citocina na infecção experimental por clones das cepas do *T.cruzi*.

## 5.2 METODOLOGIA

**Animais-** No presente estudo, foram utilizados 280 camundongos Swiss Webster de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz/Bahia. Eles foram mantidos de acordo com as diretrizes éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais (CEUA-CPqGM-Fiocruz), e com Protocolo 003/15.

**Grupos Experimentais-** O protocolo dos grupos experimentais podem ser melhor descritos na Tabela 1.

Tabela1- Grupos Experimentais.

GRUPO	INÓCULO	CEPA/CLONE	Nº de Camundongos	Tratamento BZ 100mg/Kg/dia
NT		Não infectado	20	Não tratado
TNI		Não infectado	20	Tratado
COL C2 T	1X10 <sup>4</sup>	Clone C2 da cepa Colombiana	30	Tratado
COL C2 NT	1X10 <sup>4</sup>	Clone C2 da cepa Colombiana	30	Não tratado
COL C5 T	1X10 <sup>4</sup>	Clone C5 da cepa Colombiana	30	Tratado
COL C5 NT	1X10 <sup>4</sup>	Clone C5 da cepa Colombiana	30	Não tratado
YC5 T	1X10 <sup>4</sup>	Clone C5 da cepa Y	30	Tratado
YC5 NT	1X10 <sup>4</sup>	Clone C5 da cepa Y	30	Não tratado
YC7 T	1X10 <sup>4</sup>	Clone C7 da cepa Y	30	Tratado
YC7 NT	1X10 <sup>4</sup>	Clone C7 da cepa Y	30	Não tratado



**Tratamento-** Foram utilizados 100mg/kg/dia de Benzonidazol ([2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida]) para o tratamento dos camundongos. O tratamento foi realizado com 60 doses do medicamento, sendo iniciado no 3<sup>o</sup> dia (cepa Y) e 16<sup>o</sup> dia (cepa Colombiana) após a infecção, correspondendo à evolução da parasitemia nos respectivos grupos experimentais.

**Pontos de eutanásia** - A eutanásia foi iniciada a partir da 5<sup>o</sup> dose após o início do tratamento e, seguiram posteriormente até após 60<sup>o</sup> dose do quimioterápico. A sequência sistemática dos intervalos foi: 5<sup>o</sup> dose; 20<sup>o</sup> dose e fase tardia 30<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> doses. Em cada ponto 4 animais de cada grupo foram submetidos aos procedimentos experimentais.

**Parasitemia-** Foi avaliada diariamente a partir do 5<sup>o</sup> dia após a infecção em microscópio óptico pelo exame direto, entre lâmina e lamínula do sangue periférico de 5 camundongos de cada grupo. Posteriormente foi realizada uma média aritmética da contagem dos parasitos em 50 campos microscópicos (400X).

**Mortalidade** - Foi acompanhada diariamente durante o curso da infecção em todos os grupos experimentais através da mortalidade cumulativa.

**Imunofluorescência indireta (sorologia)-** O soro dos animais dos diferentes grupos representando a fase crônica foi coletado e estocado a uma temperatura de -20°C. Para a titulação dos anticorpos o soro foi diluído de forma seriada, em PBS, utilizando placas de múltiplos poços de fundo arredondado. O volume de 10 µL das diluições de cada poço foi distribuído nas lâminas contendo antígeno de *T.cruzi*. A titulação dos anticorpos foi feita pela diluição progressiva do soro, nos títulos de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. O *Cut-off* negativo adotado foi de 1:40. O anticorpo utilizado para o método foi IgG anti-camundongo ligado à fluoresceína (Sigma).

**Preparação Das Células Do Baço** - Os esplenócitos dos animais dos referidos grupos foram separados de forma mecânica e as células lavadas duas vezes por centrifugação em PBS 1X. Após as lavagens, o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Foram preparadas diluições contendo  $2 \times 10^6$  células em cada 100 µl. As células foram distribuídas em placas de 96 poços, na concentração de  $2 \times 10^6$ /poço.

**Marcação das moléculas de superfície e intracelular-** Alíquotas de 100µL das suspensões celulares foram então incubadas, por 20 minutos a 4<sup>o</sup> C e protegidos da

luz, com os seguintes anticorpos monoclonais (mAbs) anti-camundongos: anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-CD11b e anti-CD11c conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC); anti-CD3, anti-CD38 e anti-CD86, conjugados com ficoeritrina (PE) ; anti-CD25 e anti-CD80 conjugados a PE Cy5 , em seguida, as células foram lavadas por centrifugação e as células foram fixadas com 1% de paraformoldeído em PBS por 20 minutos, temperatura ambiente. Após esta incubação as células foram preparadas para marcação intracelular com o anticorpo monoclonal anti-Foxp3 PE foram lavadas e incubadas por 20 minutos com uma solução contendo detergente para permeabilização (“PermWash”– ebioscience), e posteriormente as células foram incubadas com anti-Foxp3 PE. As suspensões de células foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

**Dosagem das citocinas-** As citocinas IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram dosadas no soro dos camundongos de todos os grupos experimentais através do Kit Cytometric Bead Array - CBA (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Para a detecção das concentrações o Kit possui esferas ligadas a um anticorpo específico com intensidades de fluorescência distintas para cada citocina (FL3), e um anticorpo de detecção conjugado a ficoeritrina (PE - FL2). Uma curva padrão para cada citocinas foi utilizada como referência de concentrações conhecidas, e abrange um conjunto definido de concentrações de 20 a 5.000 pg/mL. Os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (BD FACSAarray) e a análise realizada pelo Software Flowjo Vx 0.7 considerando uma curva padrão (pg/mL).

**Estudo Histopatológico** - Os fragmentos de músculo esquelético e coração, foram coletados e fixados em formol Milloning, incluídos em parafina para obtenção de secções de 5  $\mu$ m e corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisados. Foram analisadas as secções de todos os grupos experimentais infectados e tratados nos diferentes pontos de eutanásia.

**Testes de cura-** A partir de 30 dias após o final do tratamento todos os camundongos sobreviventes foram submetidos aos seguintes testes de cura:

**Parasitemia após Imunossupressão** - Exame microscópio direto do sangue periférico, entre lâmina e lamínula. Os camundongos tratados com parasitemia negativa, foram tratados com Ciclofosfamida (Baxter, Estados Unidos) na dose de

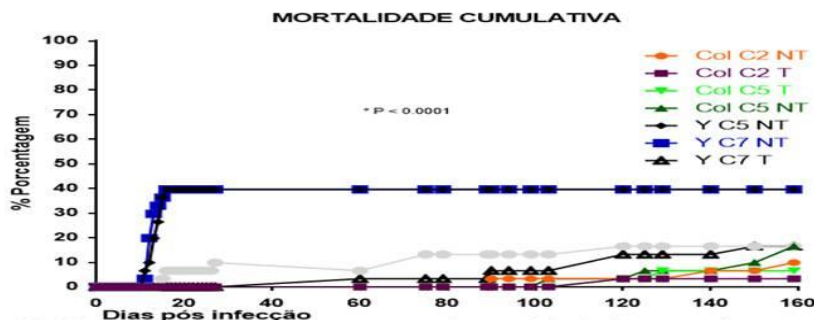
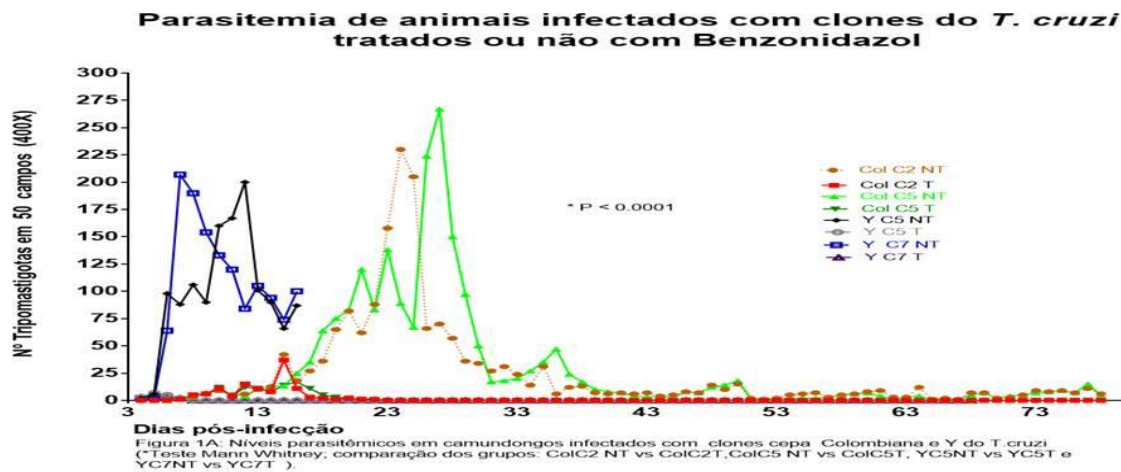
250 mg/kg de acordo com o esquema a seguir, para estimular a proliferação parasitária pela imunossupressão. Foram administradas 3 doses de Ciclofosfamida de 250 mg/kg em cada camundongo e realizada nova parasitemia segundo protocolo padronizado pelo laboratório.

**Hemocultura** - 0,5 mL de sangue dos animais sacrificados foi cultivado em meio Warren (WARREN, 1960) e mantido a uma temperatura de 37°C. Para detecção do *T.cruzi*, foram feitos exames microscópicos das culturas em 30, 60 e 90 dias de cultivo.

**Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)** – o soro dos animais eutanasiados para os testes de cura foi submetido ao ensaio de IFI, como descrito anteriormente.

### 5.3 RESULTADOS

- 1- Curvas parasitemicas dos grupos Infectados com os clones da Cepa Y e Colombiana tratados e não tratados (Figura 1A)-** Nos animais infectados com Clones da cepa Colombiana (C2 e C5) a parasitemia se tornou positiva no 7º dia após infecção, sendo os maiores picos entre o 25º a 27º dia, nos animais tratados a parasitemia negativou após a 4ª dose do BZ. Nos grupos infectados com Clones da cepa Y (C5 e C7), os animais ficaram positivo em torno do 3º dia após infecção, com maior pico no 12º dia após infecção, os animais tratados com BZ negativaram a parasitemia após a 2ª dose do medicamento.
- 2- Índice de Mortalidade Cumulativa dos grupos Infectados com os clones da Cepa Y e Colombiana tratados e não tratados (Figura 1B)-** O índice de mortalidade para os grupos estudados foi: ColC2 NT(9%), Col C2 T ( 3%), ColC5 NT(16%), Col C5 T ( 6%), YC5 NT(40%), YC5T ( 16%), YC7 NT(40%) e YC7T (16%), salientando que os 40% de mortalidade nos grupos YC5 NT e YC7 NT representam todos os animais que não tinham sido eutanasiados para as análises nos primeiros pontos.



**3- Análise dos títulos sorológicos dos grupos experimentais na fase tardia (30 e 60 doses)-** Houve um deslocamento de títulos sorológicos entre o menor (1/10) ao maior valor determinado (1/1280), sendo o *cut-off* (1/40). Na tabela 2 e 3, descrevem-se os menores títulos e os maiores determinados, a partir da positividade de cada Clone estudado. Observamos menores títulos sorológicos de anticorpos nos grupos infectados com os diferentes clones e tratados com BZ (COLC2 T, COLC5 T, YC5 T e YC7T) quando comparados com os animais infectados e não tratados.

**Tabela 2- Títulos de anticorpos específicos anti-*T.cruzi*, correspondente ao ponto de 30 doses.**

Grupo	Inóculo	Nº Camundongos	Sorologia Menor Título	Sorologia Maior Título
NT		4	NEG	NEG
TNI		4	NEG	NEG
COL C2 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/40	1/640
COL C2 NT	1X10 <sup>4</sup>	4	1/160	1/1280
COL C 5 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/40	1/160
COL C5 NT	1X10 <sup>4</sup>	4	1/160	1/1280
YC5 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/40	1/80
YC7 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/80	1/160

**Tabela 3 - Títulos de anticorpos específicos anti-*T.cruzi*, correspondente ao ponto de 60 doses.**

Grupos	Inóculo	Nº Camundongos	Sorologia Menor Título	Sorologia Maior Título
NT		4	NEG	NEG
TNI		4	NEG	NEG
COL C2 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/40	1/80
COL C2 NT	1X10 <sup>4</sup>	4	1/320	1/1280
COL C 5 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/20	1/80
COL C5 NT	1X10 <sup>4</sup>	4	1/320	1/1280
YC5 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/20	1/80
YC7 T	1X10 <sup>4</sup>	4	1/40	1/80

## Estratégia de Análise em Citometria de Fluxo

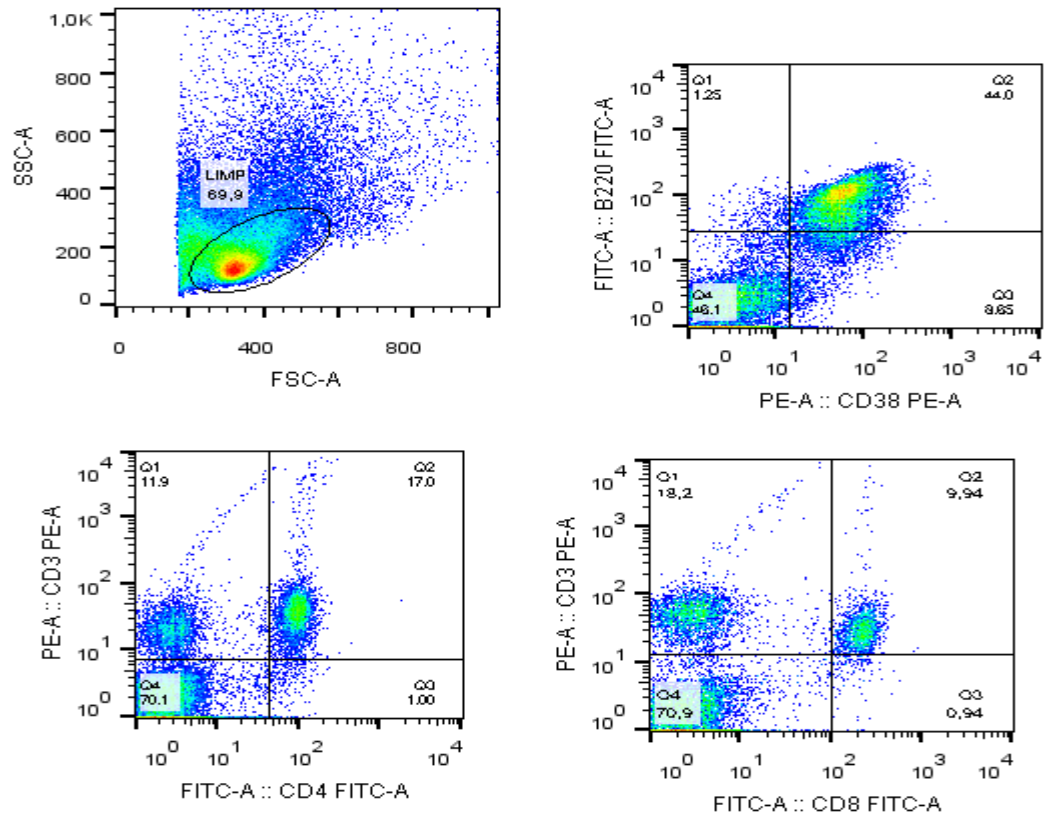


Figura 2: Estratégia de análise por citometria de fluxo da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e B do baço de camundongos Swiss.

**4- Avaliação da frequência de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) -** Podemos observar na figura 2, a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> no baço nos diferentes grupos experimentais. A comparação entre os grupos na fase inicial e tardia revelou uma tendência em aumentar as populações celulares entre os pontos de 5 e 20 doses nos grupos ( COIC2 T, COLC5 T e YC7NT) nos grupos correspondentes (COLC2 NT, COLC5 NT, YC7T e YC5NT) observa-se que os valores se mantêm dentro da mesma faixa. Por outro lado nos pontos de 30 e 60 doses há uma tendência em reduzir ou estabilizar as populações de células T CD4<sup>+</sup> nos grupos experimentais anteriormente mencionados. Nos grupos sem infecção (NT e TNI) a frequência de Linfócitos TCD4 encontra-se dentro da mesma faixa.

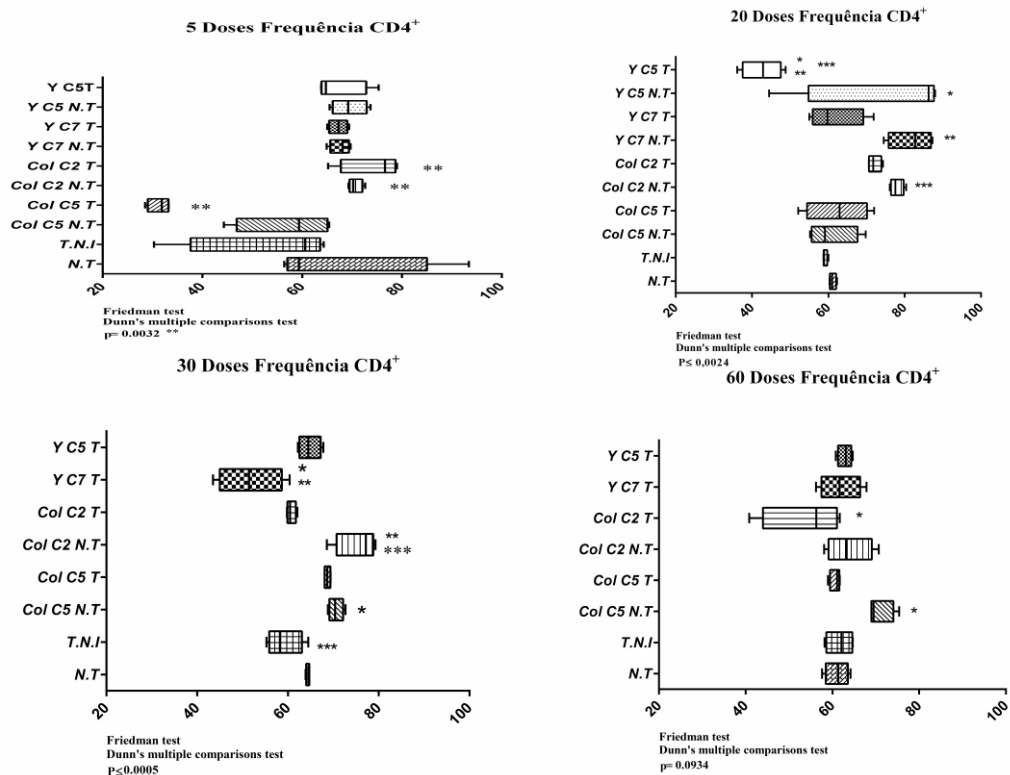


Figura 3: Frequência de CD4 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D** COL C5 T VS. COL C2 N.T (0,0032), COL C5 T VS. COL C2 T(0,0032);**20D** COL C2 N.T VS. Y C5 T (0,0024), Y C7 N.T vs. Y C5 T (0,0024), Y C5 N.T vs. Y C5 T (0,0024);**30D** T.N.I VS. COL C2 N.T(0,0005), COL C5 N.T VS. Y C7 T(0,0005); **60D** COL C5 N.T VS. COL C2 T (0,0005).

**5- Avaliação da frequência de Linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) -** A comparação entre os grupos na fase inicial e tardia revelou uma tendência em aumentar as populações celulares entre os pontos de 5 e 20 doses nos grupos (COLC2T e YC5T) nos demais grupos infectados tratados ou não tratados, observa-se que os valores se mantêm dentro da mesma faixa ou reduzem . Na fase mais tardia observamos que há uma tendência em aumentar as populações de células T CD8<sup>+</sup> em todos os grupos experimentais infectados tratados ou não tratados, sendo os maiores valores nos grupos tratados. Nos grupos sem infecção (NT e TNI) a frequência de Linfócitos TCD8 encontra-se dentro da mesma faixa.

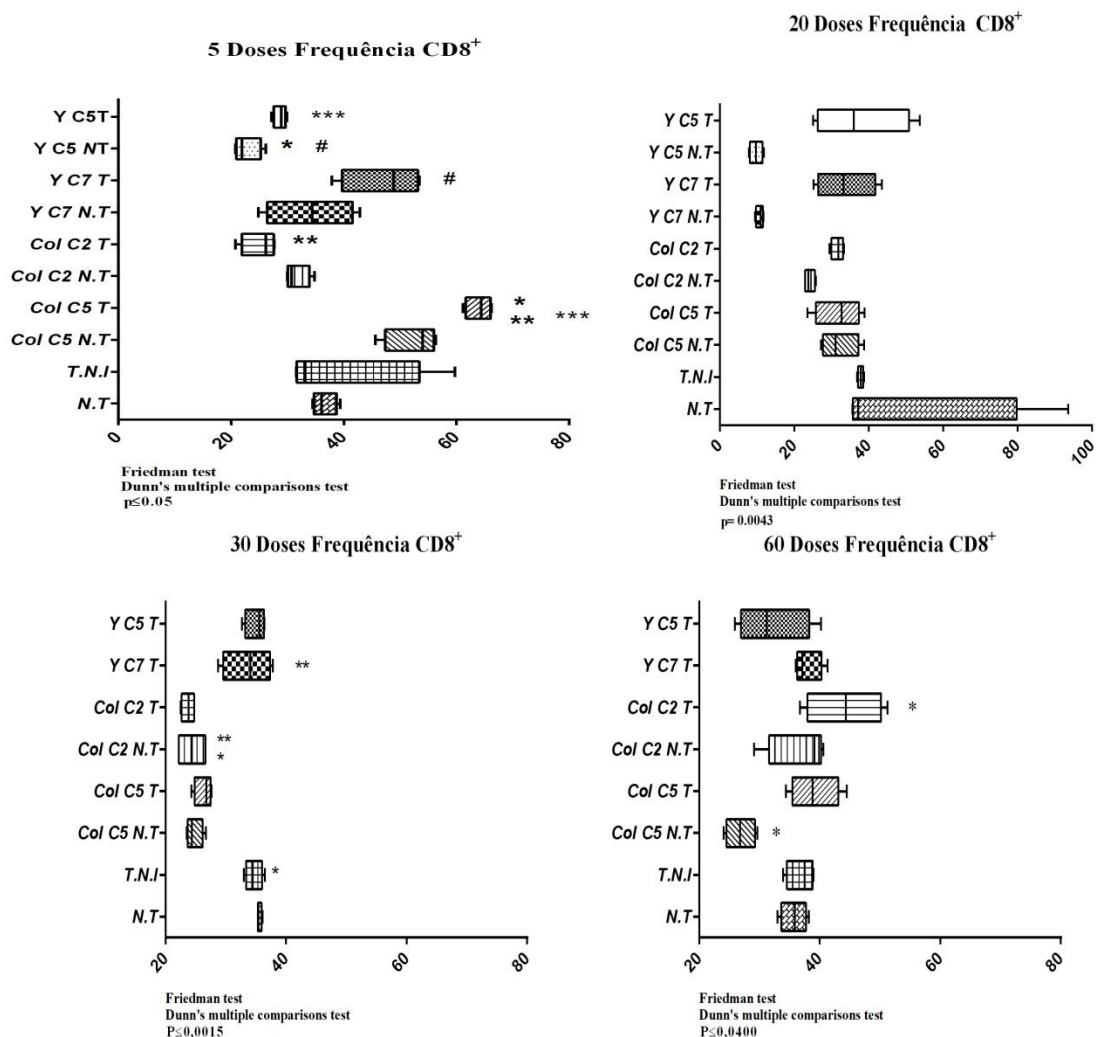


Figura 4: Frequência de CD8CD3 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D** COL C5 N.T VS. Y C5 NT (0,0002), COL C5 T VS. COL C2 T (0,0002), COL C5 T VS. Y C5 NT(0,0002), Y C7 T VS. Y C5 NT(0,0002);**60D** Col C5 N.T vs. Col C2 T(0,0339).



**6- Avaliação da frequência de Linfócitos B nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) -** Foram utilizados os marcadores B220 (CD45R) e CD38 para identificação dos linfócitos B. Comparando os pontos da fase inicial da análise não ocorre grande variação nos grupos (NT, TNI, COLC2T, COLC5NT, COLC5T, YC5T, YC7NT e YC7T) nos demais grupos houve redução/aumento das populações (YC5NT e COLC2NT). Observamos que na fase tardia a tendência é redução ou estabilização das populações celulares entre os dois pontos. O ponto de 20 doses representa os maiores frequências de células B nos grupos estudados com exceção do grupo YC5NT.

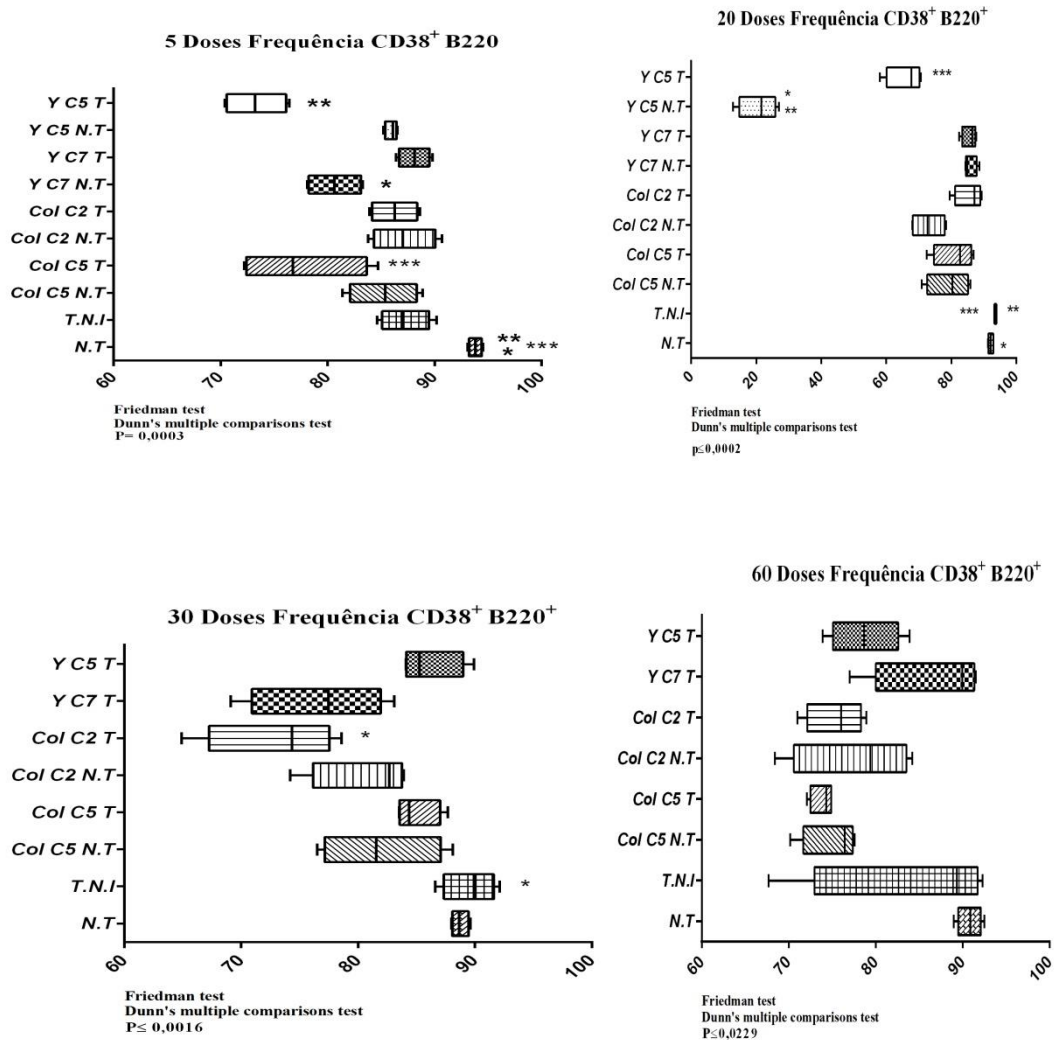


Figura 5: Frequência de B220CD38 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D** N.T VS. COL C5 T(0,0016), N.T VS. Y C7 N.T(0,0016), N.T VS. Y C5 T(0,0016);**20D** N.T VS. Y C5 N.T (0,0002),T.N.I VS. Y C5 N.T(0,0002), T.N.I VS. Y C5 T(0,0002);**30D** T.N.I VS. COL C2 T(0,0016).

**7- Avaliação da frequência de Linfócitos Treg nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) - Foi constatada a presença de mais células T  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  no baço dos camundongos infectados e tratados quando comparados com os animais infectados e não tratados com os clones correspondentes, mesmo que não estatisticamente significante, nos diversos pontos estudados. Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos sem infecção (NT e TNI) na 5<sup>o</sup> dose de tratamento quando comparados com o grupo YC5T, na 20<sup>o</sup> dose com o grupo YC7T, na 30<sup>o</sup> dose com o grupo COLC2 T e na 60<sup>o</sup> dose com o grupo YC7T.**

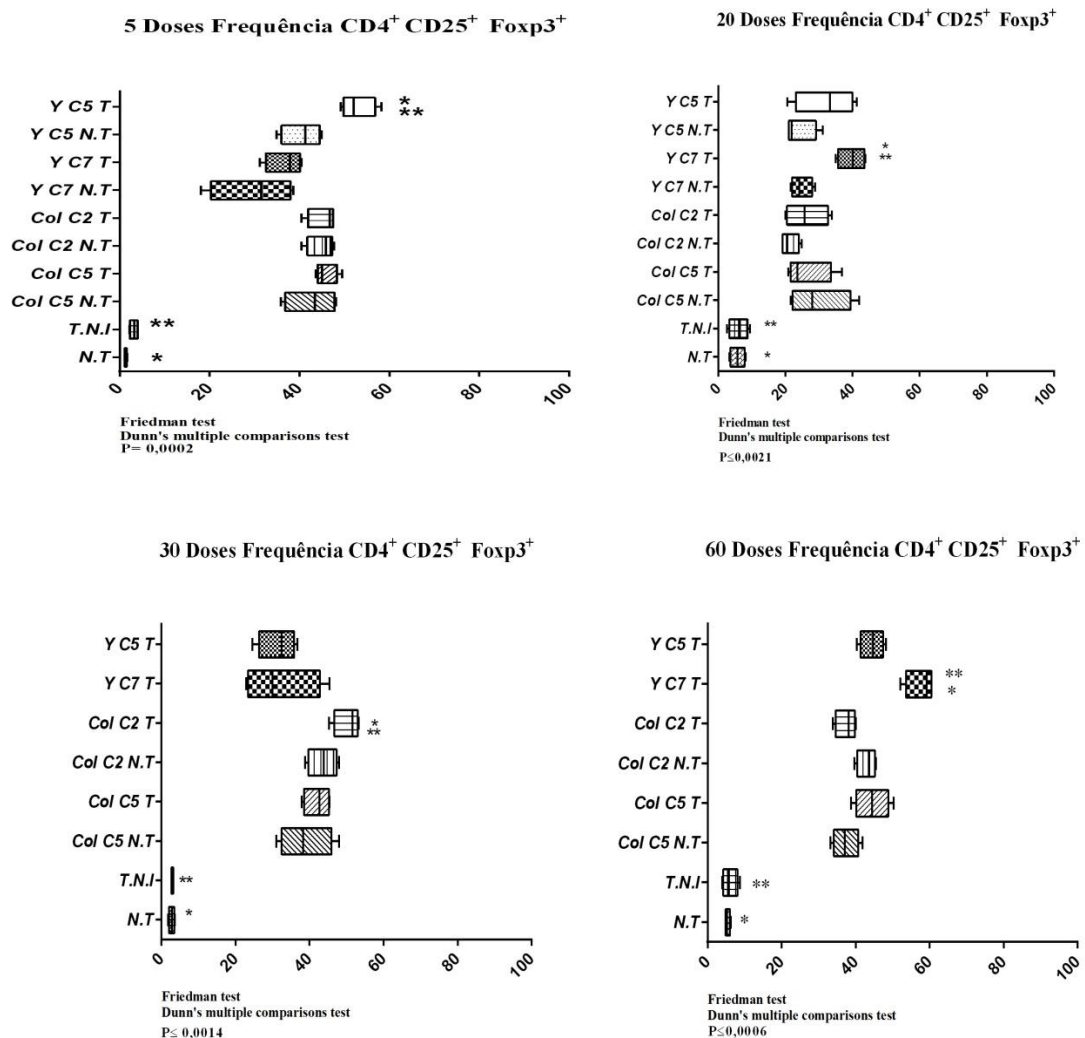


Figura 6: Frequência de  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D** N.T VS. Y C5 T (0,0002), T.N.I VS. Y C5 T(0,0002);**20D** N.T VS. Y C7 T (0,0021), T.N.I VS. Y C7 T(0,0021); **30D** N.T VS. COL C2 T (0,0014), T.N.I VS. COL C2 T(0,0014);**60D** N.T VS. Y C7(0,0006), T.N.I VS. Y C7 T(0,0006).

**8- Frequência de Células dendríticas de perfil CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) -** Foi observado que para o perfil CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> o ponto avaliado que demonstrou maior frequência para os grupos infectados tratados e não tratados foi o de 20 doses com exceção do grupo YC7NT e YC7T, quando comparamos todos os pontos analisados. Para os marcadores CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> o ponto de maior expressão foi o de 30 doses para todos os grupos infectados tratados e não tratados. Por outro lado, os animais que não foram infectados (NT e TNI) mantiveram-se dentro da mesma faixa.

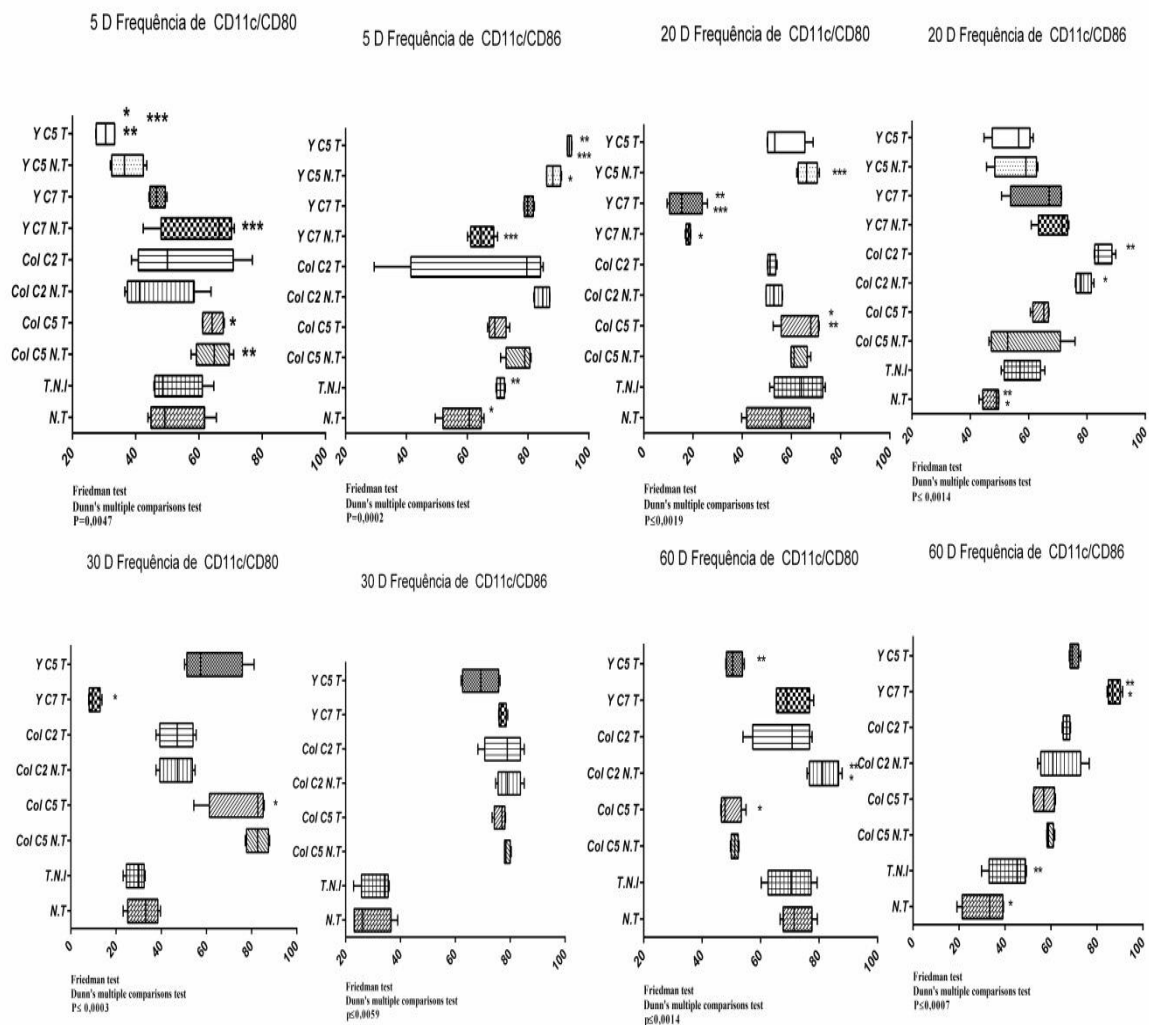


Figura 7: Frequência de CD11cCD80CD86 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D CD11cCD80** COL C5 N.T VS. Y C5 T(0,0047), COL C5 T VS. Y C5 T (0,0047), Y C7 N.T VS. Y C5 T (0,0047); **5D CD11cCD86** N.T VS. Y C5 N.T(0,0002), N.T VS. Y C5 T (0,0002), Y C7 N.T VS. Y C5 T (0,0002); **20D CD11cCD80** COL C5 T VS. Y C7 N.T(0,0019), COL C5 T VS. Y C7 T(0,0019), Y C7 T VS. Y C5 N.T (0,0019); **20D CD11cCD86** N.T VS. COL C2 N.T (0,0014), N.T VS. COL C2 T(0,0014); **30D CD11cCD80** COL C5 N.T VS. Y C7 T(0,0003), COL C5 T VS. Y C7 T (0,0003); **60D CD11cCD80** COL C5 T VS. COL C2 N.T(0,0014), COL C2 N.T VS. Y C5 T (0,0014); **60D CD11cCD86** N.T VS. Y C7 T(0,0007), T.N.I VS. Y C7 T(0,0007).

**9- Frequência de Células de perfil CD11b<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) -** A avaliação da frequência de células que expressavam o marcador CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> entre os grupos revelou uma leve tendência ao aumento nos grupos infectados com os clones da cepa Colombiana tratados ou não tratados em relação aos grupos infectados com a cepa Y na fase inicial da infecção, porém na fase tardia o aumento é semelhante quando comparamos estes grupos. Para os marcadores CD11b<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> na fase inicial houve aumento da expressão em todos os grupos infectados e tratados, quando comparamos os dois pontos, com exceção dos grupos YC7NT e YC7T. Na fase tardia também se observa o aumento dos referidos marcadores entre os dois pontos com exceção dos grupos COLC5 NT e COLC5 T.

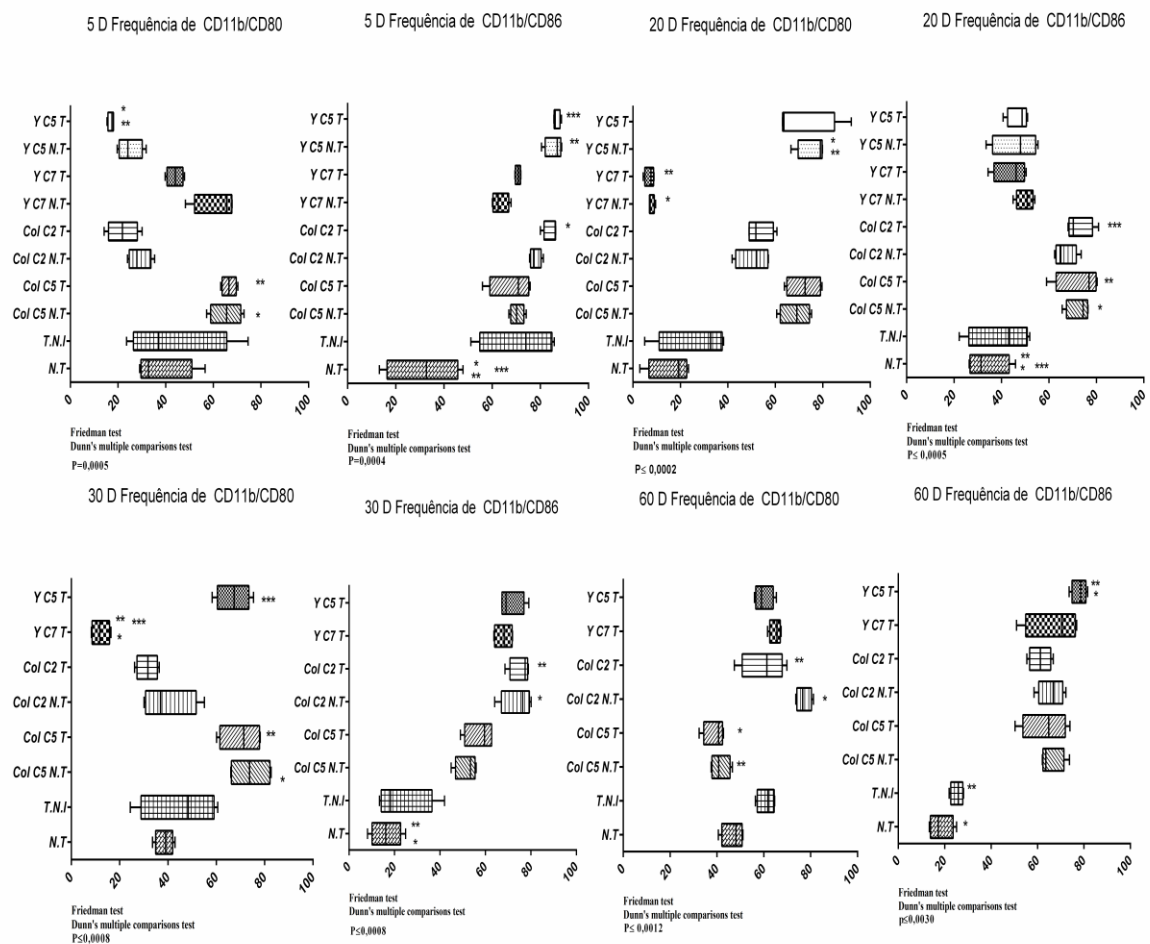


Figura 8: Frequência de CD11bCD80CD86 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Friedman **5D CD11bCD80** COL C5 N.T VS. Y C5 T (0,0005), COL C5 T VS. Y C5 T (0,0005); **5D CD11bCD86** N.T VS. COL C2 T (0,0004), N.T VS. Y C5 N.T (0,0004), N.T VS. Y C5 T (0,0004); **20D CD11cCD80** Y C7 N.T VS. Y C5 N.T (0,0002), Y C7 T VS. Y C5 N.T (0,0002); **20D CD11cCD86** N.T VS. COL C5 N.T (0,0005), N.T VS. COL C5 T (0,0005), N.T VS. COL C2 T (0,0005); **30D CD11cCD80** N.T VS. COL C2 N.T (0,0008), N.T VS. COL C2 T (0,0008); **60D CD11cCD80** COL C5 N.T VS. COL C2 N.T (0,0012), COL C5 T VS. COL C2 N.T (0,0012); **60D CD11cCD86** N.T VS. Y C5 T (0,0030), T.N.I VS. Y C5 T (0,0030).

**10- Níveis sorológicos de IL-2 nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) —** A dosagem citocina IL-2 revelou que o grupo YC5T apresentava maiores níveis em relação aos demais grupos, podemos notar que o grupo YC7NT no ponto de 20 doses também apresenta níveis elevados em seguida do grupo COLC2T no mesmo ponto. Os demais grupos apresentam níveis semelhantes. Na fase tardia observamos os níveis mais elevados nos grupos YC5T em seguida do grupo YC7T.

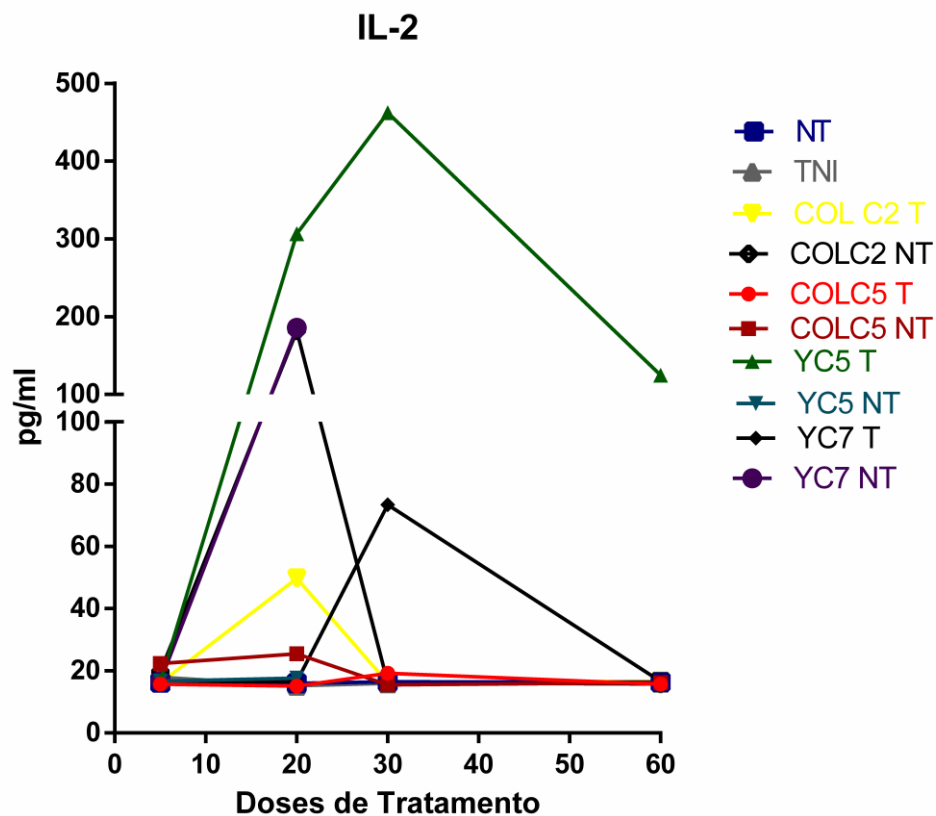


Figura 9: Dosagem da citocina IL-2 dos diferentes grupos experimentais \*Teste Fisher's **20D** YC5 T vs. NT (0,0073), YC5 T vs. TNI (0,0072), YC5 NT vs. YC5 T(0,0077), YC7 T vs. YC5 T(0,0075); **30D** YC5 T vs NT (< 0,0001), YC5 T vs. TNI (< 0,0001), YC7 T vs. YC5 T (0,0004).

**11- Níveis sorológicos de IL-10 nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) —** Observamos os maiores picos de IL-10 na fase inicial da infecção nos grupos COLC2NT e COLC2T, os demais grupos infectados e tratados estabeleceram níveis acima de 60 pg/ml. Porém na fase tardia os grupos YC5T e COLC5T (30 e 60 doses), e COLC5NT e COLC2 T (60 doses) foram os grupos que apresentaram os maiores níveis de IL-10.

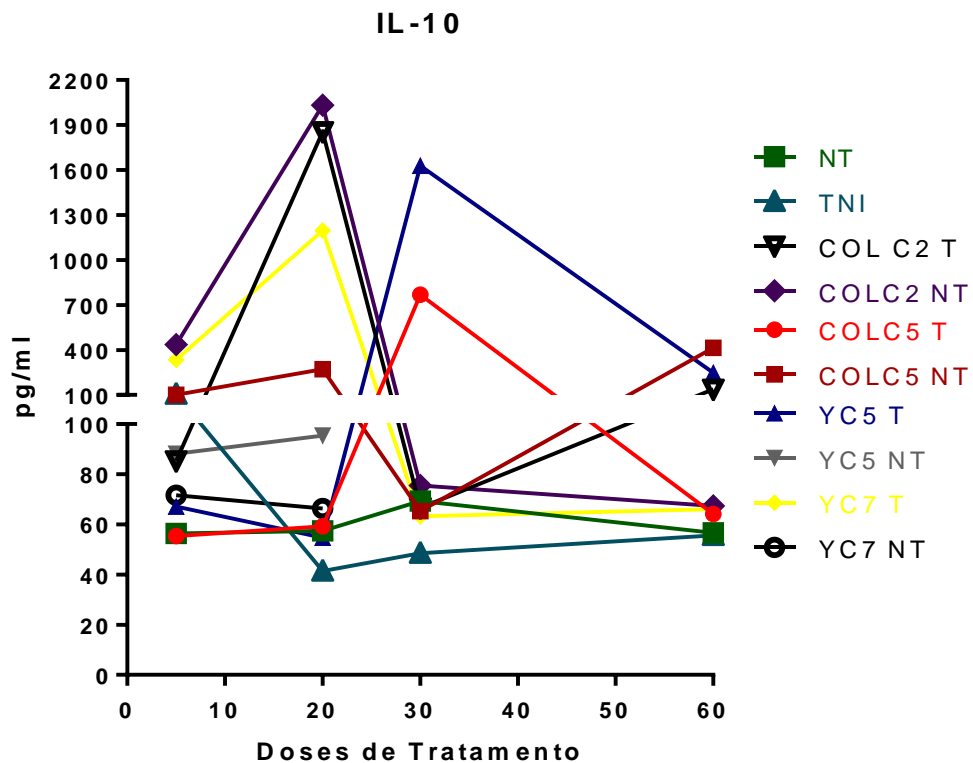


Figura 10: Dosagem da citocina IL-10 nos diferentes grupos experimentais \*Teste Fisher's **20D** NT vs. COL C2 T(0,0031), NT vs. COLC2 NT(0,0012), TNI vs. COL C2 T(0,0028), TNI vs. COLC2 NT(0,0011), COL C2 T vs. COLC5 T (0,0031), COL C2 T vs. COLC5 NT(0,0088), COL C2 T vs. YC5 T(0,0059), COL C2 T vs. YC5 NT(0,0037), COL C2 T vs. YC7 T (0,0032), COLC2 NT vs. COLC5 T (0,0012), COLC2 NT vs. COLC5 NT (0,0037), COLC2 NT vs. YC5 T(0,0026), COLC2 NT vs. YC5 NT(0,0015), COLC2 NT vs. YC7 T(0,0013); **30D** NT vs. YC5 T (0,0167), TNI vs. YC5 T (0,0153), COL C2 T vs. YC5 T(0,0165), COLC2 NT vs. YC5 T (0,0171), COLC5 NT vs. YC5 T (0,0164), YC5 T vs. YC7 T(0,0244).

**12- Níveis sorológicos de INF- $\gamma$  nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) — Os níveis de IFN- $\gamma$  foram mais elevados na fase inicial da infecção para os grupos COLC5 NT, YC5NT, COLC2 NT (5 doses) YC7 NT (5 e 20 doses). Na fase tardia os grupos com maiores níveis foram: YC5T, YC7T, COLC2 NT e COLC5NT.**

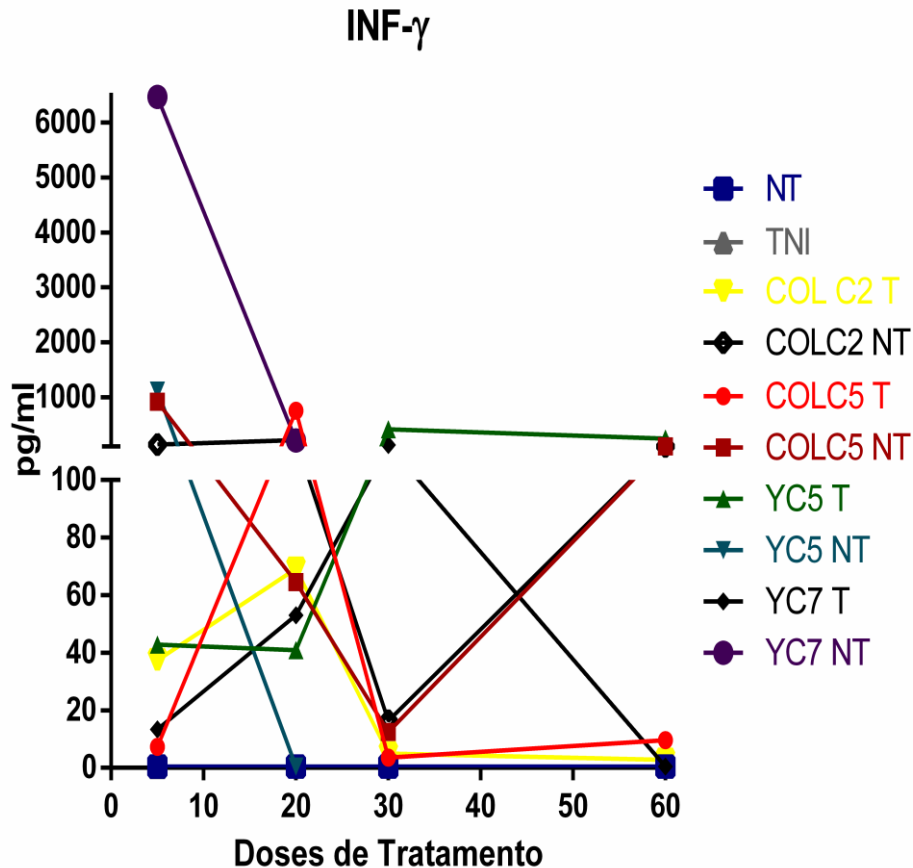


Figura 11: Dosagem da citocina INF- $\gamma$  nos diferentes grupos experimentais \*Teste Fisher's **5D** NT vs. COLC5 NT(0,0019), NT vs. YC5 NT(0,0002), NT vs. YC7 NT (< 0,0001), TNI vs. COLC5 NT(0,0019), TNI vs. YC5 NT(0,0002), TNI vs. YC7 NT(< 0,0001), COL C2 T vs. COLC5 NT(0,0029), COLC2 NT vs. COLC5 NT(0,0077), NT vs. YC5 NT(0,0009), COLC5 T vs. COLC5 NT(0,0021), YC5 T vs. YC5 NT (0,0003), YC5 T vs. YC7 NT(< 0,0001), YC5 NT vs. YC7 T(0,0002), YC5 NT vs. YC7 NT(< 0,0001), YC7 T vs. YC7 NT(< 0,0001); **20 D** NT vs. COLC5 T (0,0105), TNI vs. COLC5 T(0,0105), COL C2 T vs. COLC5 T(0,0197), COLC5 T vs. COLC5 NT(0,0197).

**13- Níveis sorológicos de TNF- $\alpha$  nos diversos grupos experimentais fase inicial (5 e 20 doses) e tardia (30 e 60 doses) — Os níveis de TNF- $\alpha$  nos diversos grupos experimentais com exceção do grupo COLC5 NT, apresentaram os maiores picos da citocina nos três primeiros pontos analisados (5, 20 e 30 doses). Os grupos que apresentaram maiores níveis na fase inicial foram os YC7NT, YC7T YC5T, COLC5NT e COLC2T. Na fase tardia YC5T, COLC5T e COLC5NT.**

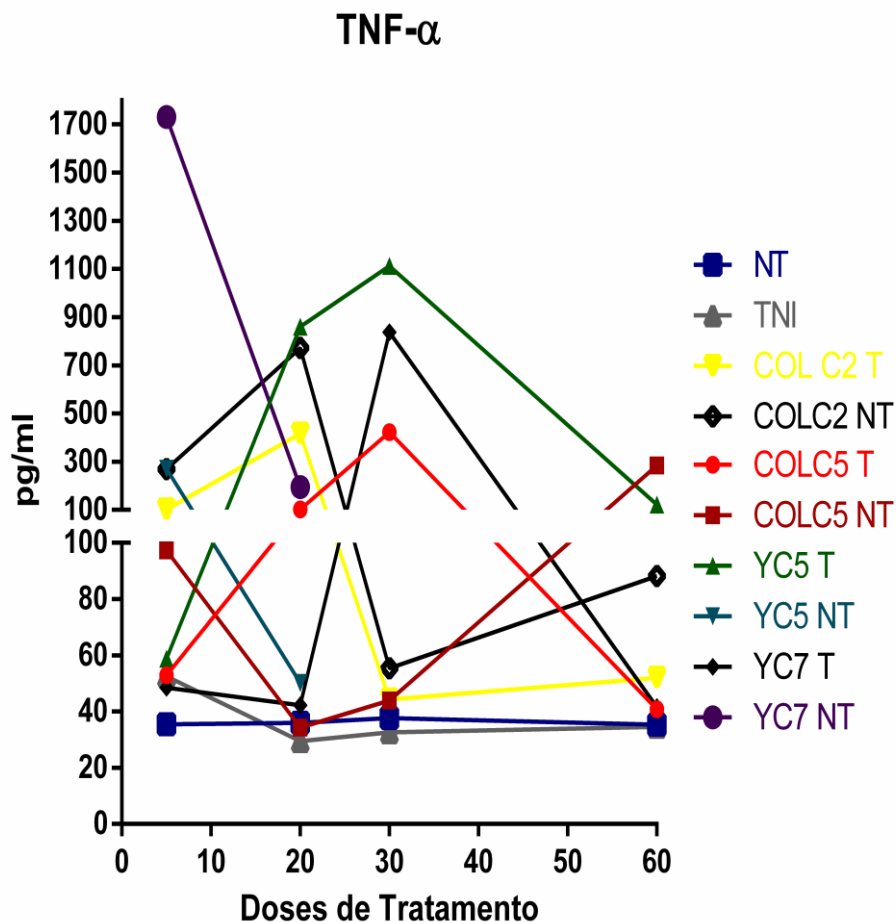


Figura 12: Dosagem da citocina TNF- $\alpha$  nos diferentes grupos experimentais \*Teste Fisher's **5D** NT vs. YC7 NT(< 0,0001), TNI vs. YC7 NT(< 0,0001), YC5 T vs. YC7 NT(< 0,0001), YC5 NT vs. YC7 NT(0,0001), YC7 T vs. YC7 NT(< 0,0001); **20D** NT vs. COLC2 NT(0,0320), NT vs. YC5 T(0,0166), TNI vs. COLC2 NT (0,0306), TNI vs. YC5 T(0,0158), COLC2 NT vs. COLC5 NT(0,0463), COLC2 NT vs. YC5 NT(0,0354), YC5 T vs. YC5 NT(0,0186), YC5 T vs. YC7 T(0,0175); **30D** NT vs. YC5 T (0,0040),NT vs. YC7 T(0,0200), TNI vs. YC5 T(0,0039), TNI vs. YC7 T(0,0192), COL C2 T vs. YC5 T(0,0043).



**14- Testes de cura-** foram realizados em todos os animais sobreviventes 30 dias após o fim do tratamento. Inicialmente foi realizada a parasitemia após imunossupressão com 250 mg/kg de ciclofosfamida. Os animais que ainda permaneceram negativos foram submetidos à hemocultura. Da mesma forma, os animais que ainda permaneceram com hemocultura negativa, foram submetidos à IFI e em seguida determinado o índice de cura (Tabela 4).

Tabela 4 – Índices de cura, de camundongos infectados pelos Clones C2 e C5 da cepa Colombiana e Clones C5 e C7 da cepa Y e tratados com Benzonidazol (BZ) 100 mg/Kg/dia. Baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológico.

Grupos	Índices de cura (%)
COL C2 T	30
COL C5 T	27,27
YC5 T	77,78
YC7 T	71,43

**15- Análises Histopatológicas-** Os grupos experimentais infectados com os diferentes Clones das cepas Colombiana e Y, tratados e não tratados, foram analisados em todos os pontos de eutanásia (5, 20 , 30 e 60 doses). Avaliou-se a intensidade dos infiltrados inflamatórios, as lesões necróticas e a presença de parasitas intracelulares.

Grupos Col C2 e Col C5 não tratados- As lesões do miocárdio variam de moderadas a intensas com regiões de fibrose e presença de ninhos parasitários e destruição de células cardíacas. No musculo esquelético apresenta inflamação de moderada a intensa com necrose hialina e presença de parasitas. As lesões foram semelhantes nos pontos estudados, porém na fase tardia, foram encontrados parasitas.

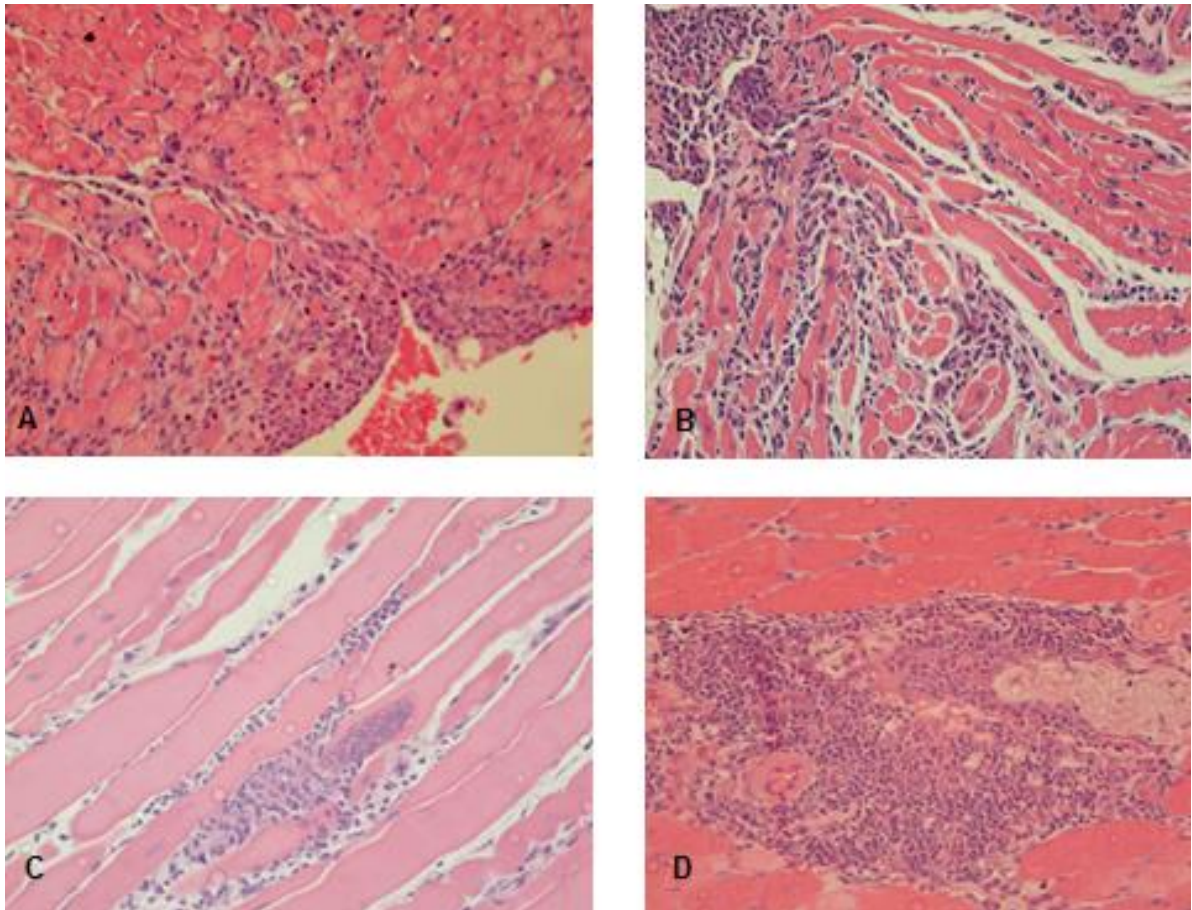


Figura 13: **A, B** - Secções de miocárdio em camundongos infectados com o clone C2/C5 da cepa Colombiana e não tratados. **A** – Infiltrados mononucleares difusos e focais (400X) **B** – Infiltrados difusos e focais de células mononucleares (400X). **C, D** - Secções de musculo esquelético em camundongos infectados com o clone C2/C5 da cepa Colombiana e não tratados. **C** –Fibra muscular destruída por infiltrado inflamatória mononuclear com presença de parasitas e necrose hialina (400X). **D** – Secção de músculo esquelético com intenso infiltrado focal mononuclear, destruição de fibras, presença de tecido fibroso perivascular e arteriolite (400X).

Grupos Col C2 e C5 tratados- Em miocárdio observa-se a presença de infiltrado mononuclear discreto a moderado, difuso e focal com fibrose intersticial discreta. Em músculo esquelético as lesões eram discretas ou ausentes. Não foram encontrados parasitas nas secções analisadas. Com a evolução do tratamento observamos redução das lesões.

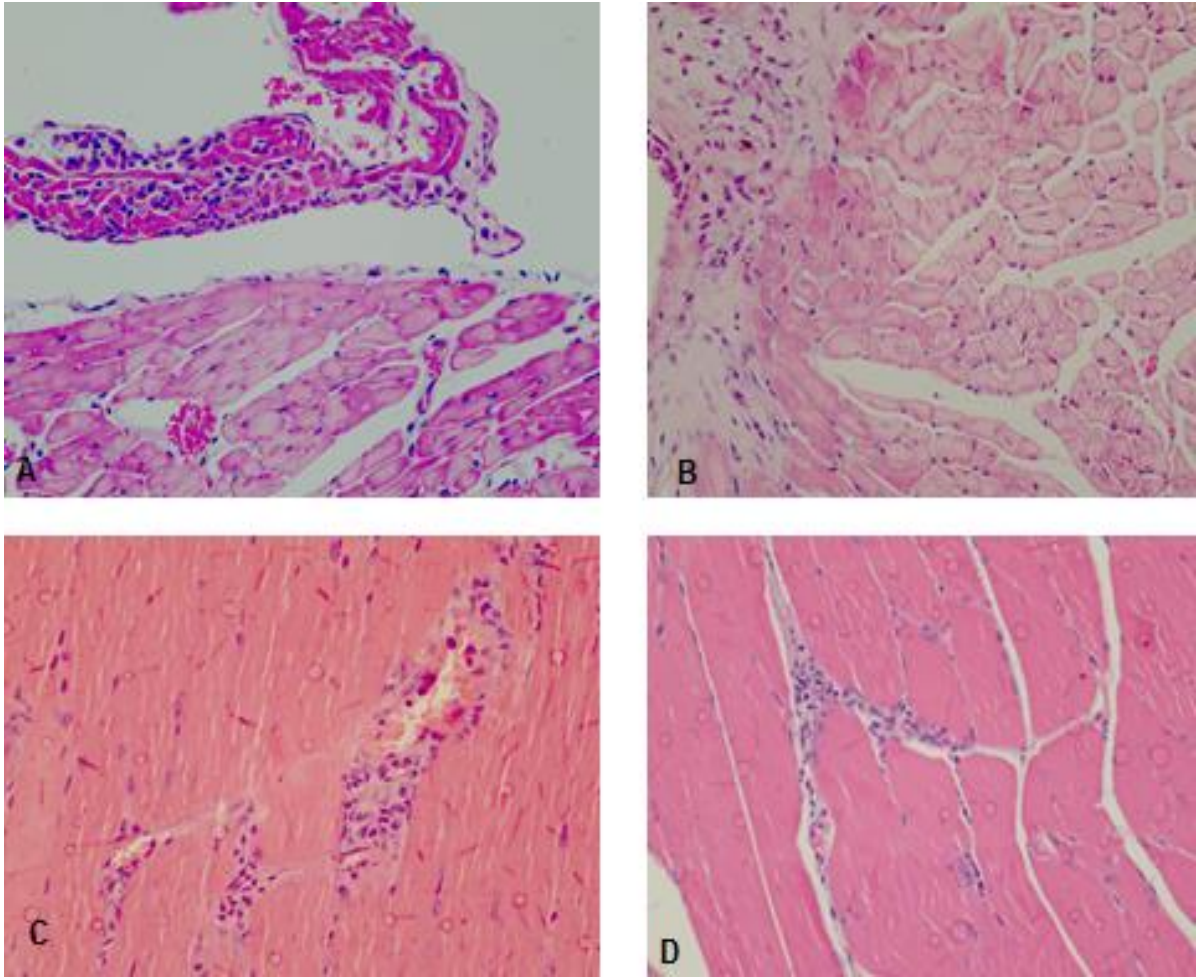


Figura 14: **A, B** - Secções de miocárdio em camundongos infectados com o clone C2/C5 da cepa Colombiana e tratados. **A** -Infiltrados difusos e focais de células mononucleares em átrio (400X). **B** - Parede ventricular com infiltrados difuso infiltrado, com áreas de fibrose (400X). **C, D** - Secções de músculo esquelético em camundongos infectados com o clone C2/C5 da cepa Colombiana e tratado. **C** - infiltrado intersticial sem degeneração de fibras (400X) . **D** - Infiltrado focal mononuclear e discreta fibrose intersticial (400X).



Grupo Y C5 e C7 não tratados- Observa-se no tecido cardíaco a presença de infiltrados mononucleares, moderados a intenso, difusos ou focais, com destruição de células e parasitismo nos pontos estudados (somente os pontos iniciais). No tecido muscular esquelético foram observadas lesões necrótico- inflamatórias de moderada a intensa, destruição de fibras musculares e presença com de parasitos.

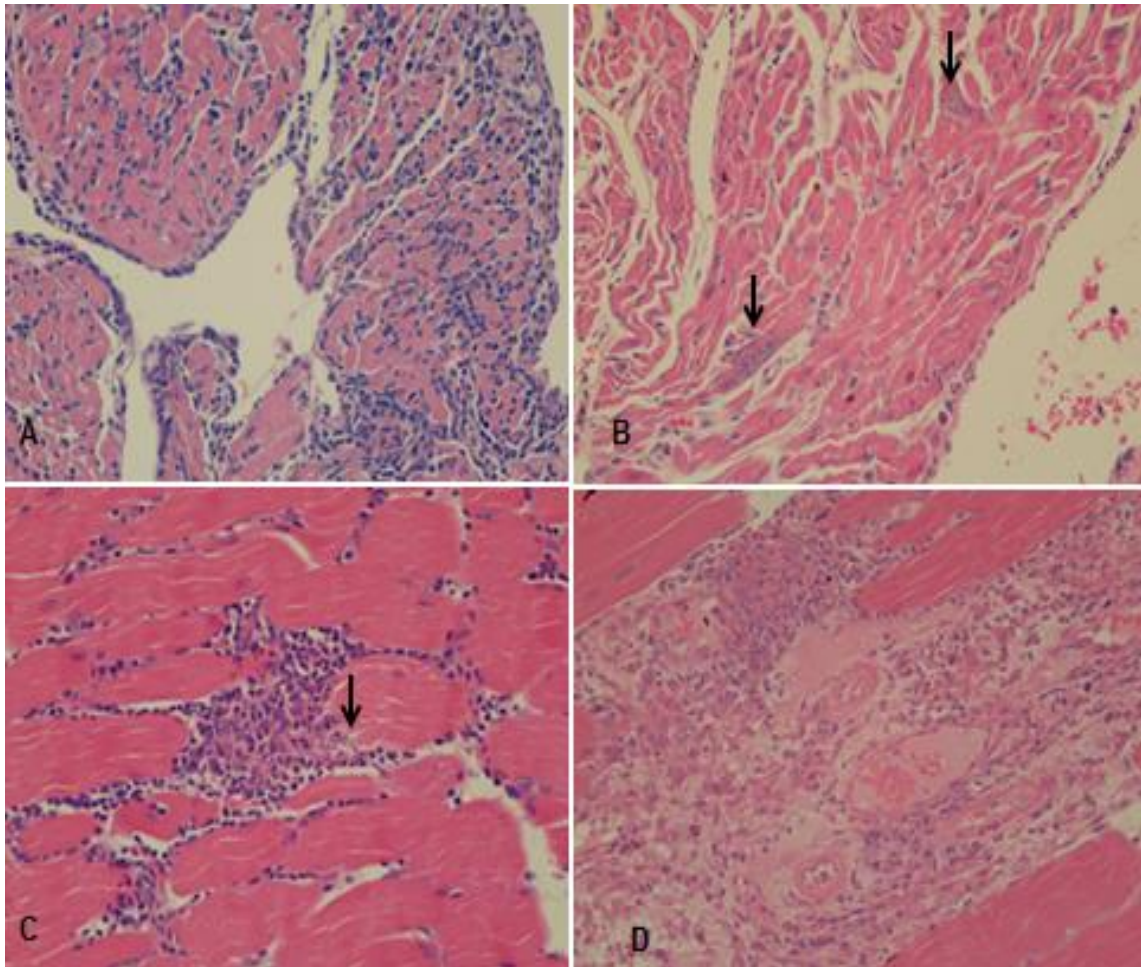


Figura 15: **A, B** - Secções de miocárdio em camundongos infectados com o clone C5/C7 da cepa Y e não tratados. **A** -Áreas focais e difusas de infiltrado inflamatório intersticial em ventrículos. **B** -Presença de formas amastigotas do *T. cruzi* em miocélula cardíaca (400X). **C, D** - Secções de músculo esquelético em camundongos infectados com o clone C5/C7 da cepa Y e não tratados (400X). **C** -Presença de ninho parasitário em formação com reações inflamatórias difusas e focais (400X). **D**- Músculo esquelético com lesão inflamatória peri-vascular e processo de arteriolite e oclusão da luz vascular (400X).

Grupos Y C5 e C7 tratados- Na análise histopatológica de secções de miocárdio foi visto infiltrado mononuclear discreto em miocárdio e fibrose intersticial. O ventrículo apresentou discreto infiltrado mononuclear difuso e focal com discreta fibrose. A análise do musculo esquelético demonstra lesões inflamatórias discretas, difusas e focais, com deposição de colágeno. Ausência de parasitas. Foi observado que as lesões reduziam com o tratamento.

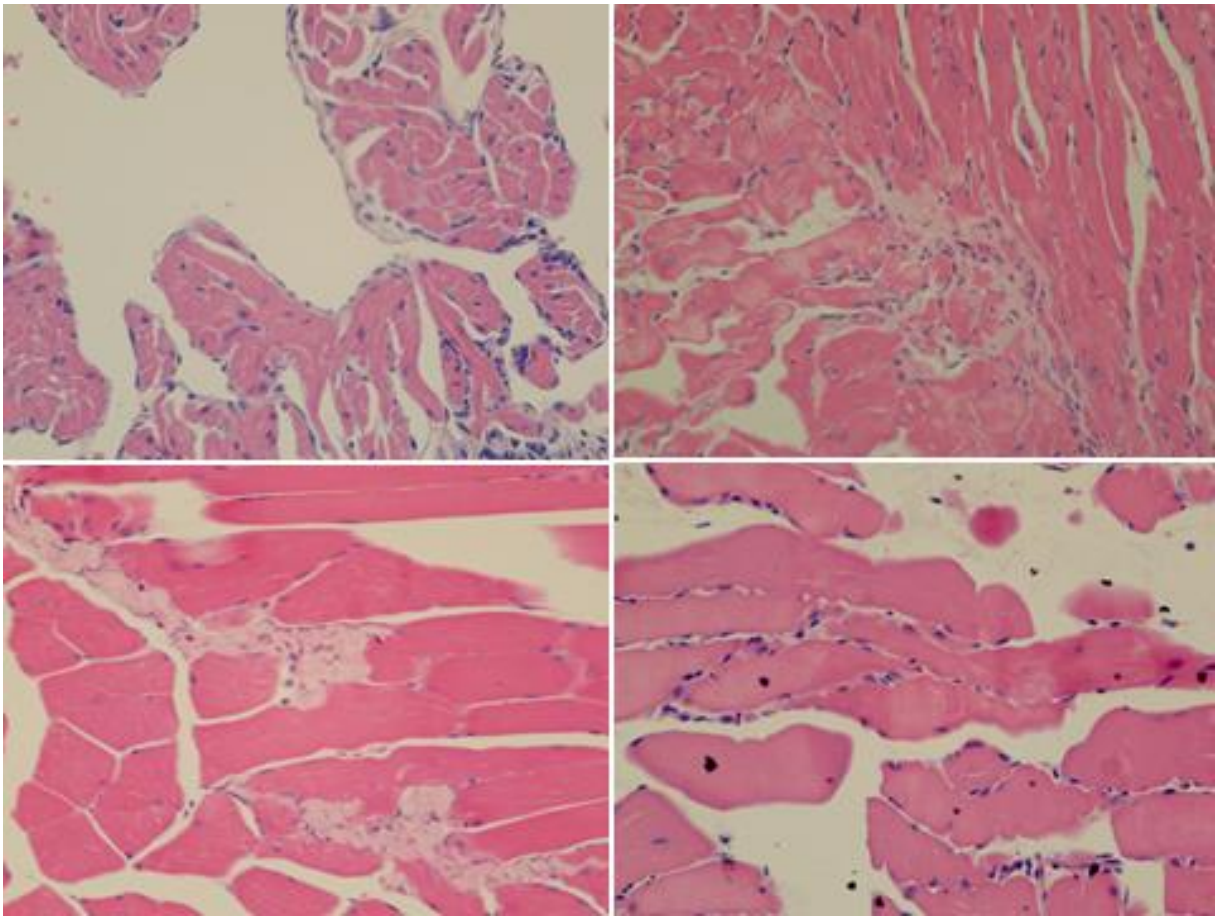


Figura 16: **A, B** - Secções de miocárdio em camundongos infectados com o clone C5/C7 da cepa Y e tratados. **A** – Região atrial com moderado infiltrado difuso e foca (400X) I. **B** –Áreas focais e difusas de infiltrado inflamatório intersticial e presença de fibrose ventricular (400X) . **C, D** - Secções de musculo esquelético em camundongos infectados com o clone C5/C7 da cepa Y e tratados. **C** –Fibrose intersticial difusa (400X). **D**- Discreto infiltrado inflamatório de células mononucleares (400X).

## 5.4 DISCUSSÃO

Os temas centrais no presente estudo abordam aspectos importantes e ainda atuais relacionados à Doença de Chagas (DC): tratamento e resposta imunológica. Buscamos compreender a influência do tratamento com o Benzonidazol (BZ) sobre a resposta imunológica em camundongos infectados com clones do *Trypanosoma cruzi* de cepas de diferentes Biodemas, suscetíveis e resistentes ao tratamento.

Há deste modo, necessidade de novos estudos que possam responder a essas perguntas que ainda não estão totalmente elucidadas. Visto que a DC é uma patologia com grande envolvimento do sistema imunológico na sua patogênese, além disso, carece de um tratamento com eficiência tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença.

Procuramos avaliar a influência do BZ sobre os mecanismos imunorregulatórios, na infecção experimental com os clones das cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*. Diversos grupos experimentais submetidos e não submetidos ao tratamento foram avaliados quanto: à parasitemia, taxa de mortalidade, intensidade das lesões necrótico-inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético, níveis de anticorpos específicos, citocinas, e quantificação de populações celulares no baço.

O tratamento com o BZ determinou uma rápida negativação da parasitemia durante o tratamento em todos os grupos experimentais tratados quando comparados com os animais não tratados. Quando observamos as curvas parasitemicas dos animais não tratados, podemos notar que os clones da cepa Y mostraram seus maiores picos entre o 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia após a infecção, por outro lado os clones da cepa Colombiana determinaram os maiores picos entre os 23<sup>o</sup> a 28<sup>o</sup> dia após infecção (Figura 1A). Todos os clones demonstraram padrões de parasitemia semelhantes às Cepas do Biodema tipo I (clones da Y) e do Biodema tipo III (clones da Colombiana), e desta forma concordantes com o perfil da Cepa parental. Esses resultados foram condizentes com os dados da literatura (ANDRADE *et al.*, 1985; CAMANDAROBA *et al.*, 2003; CAMANDAROBA *et al.*, 2006; SALERNO *et al.*, 2017).

Em relação ao índice de mortalidade os animais tratados demonstraram menores índices, os animais infectados com clones da cepa Y e não tratados chegaram ao

final do experimento com a máxima mortalidade, os infectados com clones da cepa Colombiana e não tratados tiveram baixos índices (Figura 1B). O que corrobora com trabalhos anteriores onde demonstram que os animais tratados precocemente apresentam menores taxas de mortalidade e quando não tratados e infectados com cepas de alta virulência os animais chegam a óbito precocemente (ANDRADE e FIGUEIRA 1977; VILAR-PEREIRA *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016). Observamos também que há uma variação na taxa de mortalidade entre os Clones da cepa Colombiana, onde o Clone C5 apresentou taxas mais elevadas em relação ao Clone C2, tanto no grupo tratado quanto no grupo não tratado. CAMANDAROBA *et al.* (2001) afirmam que apesar dos clones revelarem uma semelhança nos comportamentos fenotípicos podem ser encontrados diferentes graus de virulência entre os Clones, e isto pode ser refletido na diferença das taxas de mortalidade (CAMANDAROBA *et al.*, 2003).

A redução nos índices de mortalidade e da parasitemia pode estar associado não somente ao tratamento, mas também à presença de células inflamatórias e reguladoras. KIERSZENBAUM e PIENKOWSKI (1979) demonstraram que camundongos atímicos (linhagem *nude*), não foram capazes de controlar a infecção pelo *T. cruzi* devido à alta parasitemia, o que levou à morte dos animais. Desta forma podemos destacar o papel das Células T CD4+ e CD8+, nos nossos resultados observamos que na fase inicial ambas as células apresentaram maiores frequências em dois grupos infectados e tratados, porém na fase tardia estudada as populações de TCD8+ tendem a aumentar especialmente nos grupos tratados e infectados com os diferentes Clones. A análise na fase tardia da infecção demonstrou que a frequência de linfócitos TCD4+ nos grupos estudados infectados e tratados e não tratados apresentam um padrão de estabilização ou redução dessas células (Figuras 3 e 4). OLIVIERI *et al.* (2002) demonstram em seu estudo que existe uma expansão preferencial de linfócitos TC8 + em relação aos TCD4+ em animais tratados, além disso o tratamento com BZ levou a uma expansão de células T CD8 + de memória efetoras numa fase mais avançada da infecção em associação com taxas menores de apoptose.

PORTELLA e ANDRADE (2013), estudando a dinâmica de diferentes células em animais susceptíveis (linhagem A) e resistentes (DBA) à infecção pela cepa

Colombiana do *T.cruzi*, observaram uma maior expansão das células TCD4+ no baço dos animais resistente à infecção, o que pode ser associado a maior resistência dos camundongos DBA/1 à infecção experimental. TARLETON *et al.* (1994), demonstraram que quando os linfócitos T CD8+ são depletadas na fase crônica, resulta em aumento da carga parasitária no coração e aumento da inflamação.

Apesar dos resultados de diversas pesquisas, estas não são concordantes sobre a célula que está diretamente relacionada com a resistência à infecção por *T.cruzi*. Infere-se que mesmo havendo diferenças na predominância entre os linfócitos T CD4 + e CD8+, são indispensáveis a presença de ambas para uma resposta de maior efetividade (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2001; ALBAREDA *et al.*, 2006; CARDILLO *et al.*, 2007; PADILLA *et al.*, 2007; PADILLA *et al.*, 2009). Contudo, sabe-se que a infecção por *T.cruzi*, não só ativa de forma policlonal os linfócitos T, mas também os linfócitos B (CORSINI e COSTA, 1981; MINOPRIO *et al.*, 1986).

Em relação à quantificação de células B nossos resultados demonstram que há maior frequência das células B na fase aguda da infecção quando comparado com a fase crônica em todos os grupos experimentais, porém não há grande redução da frequência dessas células com o tempo de infecção (Figura 5). Podemos destacar que na fase mais tardia da infecção quando comparamos os animais tratados com os controles correspondentes, que há um aumento de linfócitos B em todos os grupos tratados. SULLIVAN *et al.* (2015) demonstraram o papel importante das células B na imunidade sistêmica. Os camundongos que não tinham células B não conseguiram controlar a parasitemia nem evitar a morte. CARDILLO *et al.* (2007) demonstraram que os linfócitos B participam da ativação de Células T durante a fase aguda da infecção pelo *T.cruzi*, onde os camundongo KO para MuMT tinham menos célula T de memória central, menos citocinas e linfopenia de células T CD8 + em relação aos camundongos selvagens.

Assim, podemos inferir que a ação do BZ pode estar envolvida na ativação e expansão dessas células, e que os linfócitos B podem estar relacionados com a ativação e manutenção das células TC8 na fase tardia da infecção.



O aumento da resposta inflamatória pode resultar no aumento da lesão tecidual, então as células Treg podem atuar modulando a ação destas células e evitando o aumento de lesões SAKAGUCHI *et al.* (1995). A quantificação das células de perfil TCD4+CD25+FOXP3+, foi mais elevada nos grupos de animais tratados (Figura 6), onde os mesmos apresentaram rápida negativação da parasitemia e baixas taxas de mortalidade, assim como redução das lesões inflamatórias no tecido cardíaco e manutenção dos altos índices de cura nos clones da cepa susceptível (Y) (Tabela 4). Então no presente estudo supomos que as células Treg podem estar imunorregulando o sistema imunológico de forma positiva e que o tratamento com Bz pode estar colaborando para o aumento destas células. MARIANO *et al.* (2008), avaliaram a influência das células T regulatórias (CD4 + CD25 + Foxp 3 ), na infecção pelo *T.cruzi*, os seus resultados demonstraram que essa célula têm um importante papel na redução das lesões necróticas inflamatórias e consequentemente na elevação da sobrevivência dos camundongos em relação ao grupo tratado com anti-CD25 e anti- GITR. Indivíduos na forma indeterminada da doença apresentam maior frequência de Tregs, quando comparados aos indivíduos na forma cardíaca, sugerindo então que essas células podem ter papel benéfico, limitando a toxicidade e prevenindo as lesões cardíacas (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005; DE ARAUJO *et al.*, 2011).

As células dendríticas são populações celulares que podem ser subdivididas em dois subgrupos: plasmocitoides CD11c<sup>lo</sup> CD45RA<sup>hi</sup> MHC III<sup>o</sup> CD4<sup>hi</sup> and CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup> e mieloides CD205<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (SHORTMAN e LIU, 2002; SHORTMAN e NAIK, 2007). Essas células são as principais células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e por isso são capazes de estimular respostas imunes ou desencadear tolerância (TARBELL *et al.*, 2006). Na falta de estímulo antigênico as células dendríticas podem reduzir a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86 (KELLER, 2001). Em contrapartida, o aumento da capacidade de processamento e apresentação antigênica está relacionada ao aumento da expressão de MHC I e II e das moléculas co-estimuladoras como: CD80/B7.1 e CD86/B7.2 (KELLER, 2001; CIRINCIONE *et al.*, 2002).

ALBA SOTO *et al.* (2003), avaliaram a influência da infecção por cepas do *T.cruzi*, de diferentes graus de virulência, em células apresentadoras de antígeno. Os seus

resultados demonstraram que: houve uma maior restrição da expressão do MHC de classe II em células dendríticas do baço e estas células apresentaram um estado de baixa maturação durante a fase aguda da infecção de animais infectados com a cepa mais virulenta, quando comparados com a infecção por uma cepa menos virulenta. Observamos nos nossos resultados que há uma maior expressão dos marcadores celulares das APCs e das moléculas co-estimuladoras (CD11cCD80, CD11cCD86, CD11bCD80 e CD11bCD86) nos grupos infectados com os Clones clones da cepa Colombiana em comparação com os clones da cepa Y, independente do tratamento, nos pontos iniciais. Nos pontos mais tardios há uma expressão desses marcadores de forma semelhante (Figuras 7 e 8). Podemos desta forma inferir, que o tratamento pode não ter influenciado na ativação desta células porém o grau de virulência das cepas do *T.cruzi* esta diretamente relacionado à estimulação das APCs.

Como avaliação da resposta imunológica, também fizemos a dosagem sorológica das citocinas (IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) . De fato, a infecção pelo *T.cruzi* ativa diversas células imunológicas, assim como também estimula a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Tem sido demonstrado que a resposta de perfil Th1 possui maior efetividade no controle da infecção por parasitas intracelulares, sendo o IFN- $\gamma$  a principal citocina envolvida na resistência à infecção (CARDILLO *et al.*, 1996). ROMANHA *et al.* (2002), estudando o papel do IFN- $\gamma$  sob tratamento com BZ, constataram que animais IFN- $\gamma$  KO tem menores taxas de cura que animais selvagens. Observamos maiores taxas de IFN- $\gamma$  nos pontos tardios, nos grupos infectados com os clones da cepa Y e tratados (cepa susceptível), os animais deste grupo demonstraram melhores taxas de cura parasitológica quando comparados com os grupos COLC2T e COLC5T (Figura 11/ Tabela 4). Desta forma, compreendemos que o INF- $\gamma$  durante o tratamento pode auxiliar no efeito tripanomicida do BZ, e o resistência/susceptibilidade da cepa ao tratamento pode estar envolvido neste mecanismo. Por outro lado, o efeito tripanomicida do IFN- $\gamma$  pode estar associado à produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos e assim ambas atuam na ativação de diversos mecanismos para eliminação do parasita (DRAPIER *et al.*, 1988; ALIBERTI *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2000). Observamos maiores níveis sorológicos de TNF- $\alpha$  nos 5, 20 e 30 doses (picos bem variados entre os grupos) (Figura 12). Os pontos iniciais são os que ainda existe uma maior replicação

parasitaria, e desta forma carecem de uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, podemos destacar o grupo YC5T que apresentou altos níveis de TNF- $\alpha$  durante a análise. A cepa Y tem um comportamento macrofagotrópico e esta produção elevada de TNF- $\alpha$  pelo clone desta cepa poderá ser associado ao seu comportamento biológico (GUTIERREZ *et al.*, 2009; HOVSEPIAN *et al.*, 2013)

A citocina IL-2 esta envolvida na ativação e diferenciação das células T CD4, TCD8 e no aumento da proliferação de células Treg (LIAO *et al.*, 2013; KOSMACZEWSKA, 2014). Contudo a função na via reguladora (Células T reg) e na via imunológica efetora (TCD4, TCD8) tem relação com o microambiente disponível. Onde baixas quantidades de IL-2 podem favorecer a via reguladora e quantidades mais elevadas estão associadas à via imunológica efetora (KOSMACZEWSKA, 2014). Observamos nos nossos resultados a produção em baixas doses de IL-2 sérica pelos grupos estudados com exceção dos grupos YC5 T nos pontos estudados e YC7T no ponto de 30 doses (Figura 9). A baixa produção de IL-2 poderia estar favorecendo a via reguladora, porém poderia estar prejudicando a ativação de células T efetivas. Diante do que foi analisado nas histopatologias, observamos a redução da lesão nos grupos tratados em relação aos grupos não tratados. Para poder associar essa redução da produção de IL-2, com aumento ou persistência das lesões, seriam necessários maiores análises, como marcadores de senescência e exaustão imunológicas nestas células. O que anteriormente já foi relacionado com a maior gravidade da doença de Chagas (ALBAREDA *et al.*, 2009; ALBAREDA e LAUCELLA, 2015). Outra citocina que poderá estar sendo efetiva na redução das lesões inflamatórias é a IL-10. Estudos demonstram que na DC a IL-10 esta associada a uma resposta não patogénica, sendo que esta pode futuramente ser utilizada no controle da miocardite chagásica (OFT, 2014; POVEDA *et al.*, 2014). Os grupos tratados foram os grupos que demonstraram menores lesões necróticas inflamatórias, além disso, apresentaram altos índices de IL-10 ou na fase inicial (COLC2T e YC7T) ou na fase tardia (YC5T e COLC5T) e baixa mortalidade em relação ao grupo não tratado (Figura 10). Desta forma, acreditamos que a IL-10 juntamente com o BZ tem atuado com papel protetor. ROFFE *et al.* (2012), avaliando a função moduladora da IL-10 na DC, em animais susceptíveis a infecção e não susceptíveis, ambos infectados com a cepa Colombiana. Constataram que os

animais resistentes a infecção tiveram alta produção de IL-10 no coração e maior frequência de células T CD8 produtoras de IL-10 e de linfócitos TCD4 e TCD8 produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-10. Além disso, avaliaram a infecção nos animais resistentes KO para IL-10 e este grupo apresentou os mesmos padrões de infecção da linhagem susceptível à infecção. Diante disso, concluíram que a produção de IL-10 por células T promove o controle de da infecção pelo *T. cruzi* e a proteção contra a miocardite aguda fatal.

Animais tratados podem apresentar a parasitemia negativa por longos períodos, e estes podem estar curados ou desenvolvendo uma fase crônica, que geralmente apresenta a parasitemia negativa. Desta forma, os exames parasitológicos e sorológicos são correlacionados a fim de estabelecer critérios de cura (ANDRADE *et al.*, 1985; BRENER, 2000).

De acordo com os critérios de cura, pôde-se observar que os animais tratados com BZ e infectados com os clone C2 e C5 da cepa Colombiana obtiveram o índice de cura de 30 e 27,27 respectivamente, confirmando trabalhos anteriores que demonstram um baixo índice de cura e resistência da cepa Colombiana (Tabela 4) (ANDRADE e FIGUEIRA 1977; ANDRADE *et al.*, 1985; CAMANDAROBA *et al.*, 2003; PORTELLA e ANDRADE, 2009).

Os animais que foram infectados com os clones C5 e C7 da cepa Y e tratados com o BZ apresentam os maiores índices de cura (77,78 e 71,43 respectivamente) comparando com os demais grupos (Tabela 4). Diante disso, os clones da cepa Y ainda podem ser considerados com sensíveis ao tratamento, de acordo com o critério estabelecido por (ANDRADE *et al.*, 1985).

## 6 CONCLUSÃO GERAL

- 1- Os animais tratados com BZ e infectados com os Clones da cepa Colombiana e com os Clones da cepa Y apresentaram menores taxas de parasitemia e mortalidade, bem como, redução das lesões necrótico-inflamatórias quando comparados com animais não tratados.
- 2- Os índices de cura dos clones da cepa Y, susceptível ao tratamento mantiveram-se dentro da faixa para cepas susceptíveis, por outro lado os índices de cura dos grupos dos clones da cepa Colombiana demonstram que estes clones mantiveram a resistência da cepa.
- 3- Os animais infectados com os clones das duas cepas estudadas e tratados, apresentaram maior expansão das células TCD8+ na fase tardia da infecção, além disso, os animais tratados apresentaram maior frequência dessas células quando comparados com os não tratados na fase mais tardia.
- 4- Os linfócitos B são mais frequentes na fase aguda da infecção quando comparamos com fase mais tardia.
- 5- As células de perfil TCD4+CD25+FOXP3+, foram mais elevada nos grupos de animais tratados quando comparamos com os animais não tratados.
- 6- Os animais infectados com os clones da cepa Y demonstraram menor expressão dos marcadores: CD11cCD80, CD11cCD86, CD11bCD80 e CD11bCD86, na fase inicial da infecção quando comparados com os animais infectados com os clones da cepa Colombiana.
- 7- Os níveis de IFN- $\gamma$  foram mais elevados nos grupos infectados com a cepa Y, quando comparados com os grupos infectados com a cepa Colombiana, na fase tardia da infecção.
- 8- A TNF- $\alpha$  circulante é maior nos pontos de 5, 20 e 30 doses, período de maior replicação parasitaria.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**. 7<sup>o</sup>. Elsevier, 2012.

ALBA SOTO, C. D. et al. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1194-1199, Mar 2003.

ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A. Modulation of Trypanosoma cruzi-specific T-cell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110 n. 3, p. 414-21, May 2015.

ALBAREDA, M. C. et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int Immunol**, v. 18, n. 3, p. 465-471, Mar 2006.

ALBAREDA, M. C. et al. Chronic Human Infection with Trypanosoma cruzi Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence1. **J Immunol**, v. 183(6), p. 4103–4108, 2009.

ALIBERTI, J. C. S. et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1961–1967, 1996.

ALIBERTI, J. C. S. et al.  $\beta$ -Chemokines Enhance Parasite Uptake and Promote Nitric Oxide-Dependent Microbiostatic Activity in Murine Inflammatory Macrophages Infected with Trypanosoma cruzi. v. 67(9), p. 4819–4826, 1999.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev. Patol. Trop**, v. 3, p. 121-165, 1974.

ANDRADE, S. G. Trypanosoma cruzi: Clonal Structure of Parasite Strains and the Importance of Principal Clones **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl., p. 185-187, 1999.

ANDRADE, S. G. et al. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of Trypanosoma cruzi. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 79, n. 4, p. 397-407, Aug 1985.

ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. Experimental study on the therapeutic action of Ro 7-1051 on infections caused by different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 19, n. 5, p. 335-41, Sep-Oct 1977.

ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types **Bull World Health Organ**, v. 63(4), p. 721-726, 1985.

ANDRADE, S. G. et al. INTERSTITIAL DENDRITIC CELLS OF THE HEART HARBOR *TRYPANOSOMA CRUZI* ANTIGENS IN EXPERIMENTALLY INFECTED DOGS: IMPORTANCE FOR THE PATHOGENESIS OF CHAGASIC MYOCARDITIS. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 63(1, 2), p. 64-70, 2000.

ANDRADE, S. G. et al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86(2), p. 187-200, 1991.

ANDRADE, V.; BRODSKY, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 77, p. 796-799, 1983.

ANDRADE, Z. A. et al. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **Am J Pathol**, v. 144, n. 6, p. 1403-1411, Jun 1994.

ARAÚJO-JORGE, T. C. **Resposta imune Inata, inflamatória e de fase aguda na Doença de Chagas** 1. BRASIL: FIOCRUZ, 2000. 368.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14-30 Years Ago. 2000.

BELKAID, Y.; OLDENHOVE, G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 362-71, Sep 19 2008.

BERNARDES, L. S. et al. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 21, p. 7075-82, Nov 1 2006.

BOCK, M.; GONNERT, R.; HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. **Bol Chil Parasitol**, v. 24, n. 1, p. 13-9, Jan-Mar 1969.

BOCK, M. et al. The structure-activity relationship of 4-(5'-nitrofurfurylidene-amino)-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxides active against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittelforschung**, v. 22, n. 9, p. 1564-1569, Sep 1972.

BRASIL. **Vigilância em saúde : zoonoses**. Secretaria de Atenção à Saúde. BÁSICA, D. D. A. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

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

\_\_\_\_\_. **Terapêutica Experimental na Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 16, p. 39-46, 1963.

BRICENO-LEON, R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, suppl.1, p. 71-82, 2009.

BRODSKYN, C. I. et al. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Cell Biol.**, v. 67, p. 343-348, 1989

CAMANDAROBA, E. L. P. et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34(2), p. 151-157, 2001.

CAMANDAROBA, E. L. P. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain clones isolated from the acute phase of murine infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 613-5, Sep 2006.

CAMANDAROBA, E. L. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36(2), p. 201-209, 2003.

CAMPOS, C. F. et al. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-18, 2016.



CAMPOS, R. M.; ANDRADE, S. G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 795-800, Nov-Dec 1996.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-595, Dec 2007. ISSN 0019-2805.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.; COUTINHO, A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1545-55, Apr 2007.

CESTARI, I. et al. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p. 1942-52, Feb 15 2012. ISSN 0022-1767.

CESTARI, I. et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Mol Immunol**, v. 53, n. 4, p. 328-34, Apr 2013. ISSN 0161-5890.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 1, p. 159-218, 1909.

CIRRINCIONE, C. et al. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 73, n. 1, p. 45-52, Jan 2002.

CORLISS, J. O. An interrim utilitarian (user-friendly) hierarchical classification and characterization of the protist. **Acta Protozool**, v. 33, p. 1-51, 1994.

CORSINI, A. C.; COSTA, M. G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). II--Trypomastigote crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 23, n. 3, p. 122-126, May-Jun 1981.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97(1), p. 3-24, 2002.

CUERVO, H. et al. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2656-65, Sep 1 2011.

D'IMPERIO, M. R. L. et al. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Immunol**, v. 15, n. 2, p. 201-3, Feb 1985.

DE ANDRADE, A. L. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v. 348, n. 9039, p. 1407-13, Nov 23 1996.

DE ARAUJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 5, p. 1-8, 2011.

DEUTSCHLANDER, N.; VOLLERTHUN, R.; HUNGERER, K. D. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice. A long term study following paw infection. **Tropenmed Parasitol**, v. 29, n. 3, p. 323-329, Sep 1978.

DEVERA, R. F., O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1-12, 2003.

DIAS , J. C. P. **Epidemiologia**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Epidemiologia** Rio de Janeiro: 1997.

DIAZ DE TORANZO, E. G. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-1, Oct 15 1988.

DOS SANTOS, D. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. **Exp Parasitol**, v. 121, n. 1, p. 8-14, Jan 2009.

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. B., JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 18, n. 10, p. 1587-1592, Oct 1988.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 287-92, Jun 2008.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 50-3, Apr 5 1996.

FRÍAS-LASSERRE, D. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its Parapatric Model of Speciation. **Neotropical Entomology** v. 39(4), p. 572-583, 2010.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . **Eur. J. Immunol.** , v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 1331-1336, 1985.

GUTIERREZ, F. R. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104(Suppl. I), p. 236-245, 2009.

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

HIGASHI, K. O.; CASTRO, S. L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **J Ethnopharmacol**, v. 43, n. 2, p. 149-55, Jul 8 1994.

HIGUCHI, M. D. et al. Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 5, p. 485-9, May 1997.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, Feb 14 2003.

HOVSEPIAN, E. et al. IL-10 Inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 8(11), 2013.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol Lett**, v. 78, n. 3, p. 113-122, Oct 01 2001.

KIERSZENBAUM, F.; PIENKOWSKI, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 24, n. 1, p. 117-120, Apr 1979.

KOSMACZEWSKA, A. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 10, p. 18574-92, Oct 15 2014.

LEON, J. S.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. **J Immunol**, v. 171, n. 8, p. 4271-7, Oct 15 2003.

LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13-25, Jan 24 2013.

LIMA, E. C. et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 457-65, Feb 1997.

LIMA, E. S.; ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. TNF- $\alpha$  is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi* **Int J Exp Pathol**, v. 82, p. 327-336, 2001.

LUMSDEN, W. H. R. Problems in characterization and nomenclature of the trypanosome populations. **Adv. Soc. Belge Med. Trop**, v. 57, p. 361-368, 1977.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, Mar 1998.

MACEDO, V. O. Forma indeterminada da doença de Chaga. In: FIOCRUZ (Ed.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. . Rio de Janeiro: Dias J.C.P, Coura J.R, 1997. p.135-151.

MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, Dec 12 2000.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 10, n. 7, p. 825-33, Jun 2008.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8<sup>+</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews** v. 201, p. 304–317, 2004.

MAYA, J. D. et al. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MCADAM, A. J.; SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. **Immunol. Rev**, v. 165, p. 231-247, 1998.

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. **Am J Pathol**, v. 159, p. 1723-1733, 2001.

MILES, M. A. et al. Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of Trypanosoma cruzi stocks from Chile. **Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 78, p. 526-535, 1984.

MILES, M. A. et al. Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 74, p. 221-237, 1980.

MINOPRIO, P. M. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand J Immunol**, v. 24, n. 6, p. 661-8, Dec 1986.

MOREL, C. et al. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MORELLO, A. et al. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of Trypanosoma cruzi. **Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 107, n. 3, p. 367-71, Mar 1994.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015. ISSN 0028-4793.

MURTA, S. M. F. et al. In vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug susceptible but not with a derived drug-resistant Trypanosoma cruzi population. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 535-544, 1999.

MYLER, P. J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Tropica**, v. 53 p. 205-225, 1993.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012.

NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. STUDIES ON THE SELECTIVE LYSIS AND PURIFICATION OF *TRYPANOSOMA CRUZI*. **THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE**, v. 142, p. 224-229, 1975.

OCHSENBEIN, A. F.; ZINKERNAGEL, R. M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. **Immunol Today**, v. 21, n. 12, p. 624-30, Dec 2000.

OFT, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 3, p. 194-199, Mar 2014.

OLIVIERI, B. P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAUJO-JORGE, T. Benznidazole Treatment following Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers CD8+ T-Cell Expansion and Promotes Resistance to Reinfection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3790-3796, 2002.

OLIVIERI, B. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Exp Parasitol**, v. 114, n. 3, p. 228-34, Nov 2006.

OLIVIERI, B. P. et al. Benznidazole therapy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice blocks thymic involution and apoptosis of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1981-7, May 2005.

ORTIZ-ORTIZ, L. et al. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 124, n. 1, p. 121-6, Jan 1980.

OSWALD, I. P. et al. Interleukin-10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor- $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon- $\gamma$ -induced. **European Journal of Immunology**, v. 89, p. 8676-8680, 1992.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 385-390, Aug 2009.

PADILLA, A. M. et al. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. **Infect Immun**, v. 75, n. 1, p. 231-235, Jan 2007.

PORTELLA, R. S.; ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: parasite antigens sequestered in heart interstitial dendritic cells are related to persisting myocarditis in benznidazole-treated mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104(7), p. 1023-1030, 2009.

POVEDA, C. et al. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91154, 2014.

RAMSDELL, F. Foxp3 and Natural Regulatory T Cells. **Immunity**, v. 19, n. 2, p. 165-168, 2003.

RASSI JR , A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012.

REIS, D. D. et al. 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**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993.

REY, L. **Parasitologia** 3 ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. et al. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol**, v. 23, n. 2, p. 93-101, Feb 2001.

RICHLE, R. hemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of RO-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **CLe Progres Medical**, v. 101, p. 282, 1973.

ROFFE, E. et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 649-60, Jan 15 2012.

ROMAÑA, C. Contribuição ao conhecimento da patogenia da tripanosomose americana: período inicial de infecção. . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 39, p. 253-264, 1943.

ROMANHA, A. J. Heteropatogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1982.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J Infect Dis**, v. 186, n. 6, p. 823-8, Sep 15 2002.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1151-64, Aug 01 1995. I

SALERNO, A. et al. Novel 2-aryloimidazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation: Synthesis and evaluation of their biological activity. **Eur J Med Chem**, v. 125, p. 327-334, Jan 05 2017.

SARDINHA, L. R. et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2031-42, Apr 2006.

SAÚDE, M. D. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, 2015.

SAUDE, O. M. D. Organización mundial de la salud. Uso de medicamentos esenciales lista modelo de medicamentos esenciales séptima lista). **Serie de Informes Tecnicos** 1992.

SHEVACH, E. M.; STEPHENS, G. L. The GITR–GITRL interaction co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity ? **NATURE REVIEWS** v. 6, p. 613-618, 2006.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 151-161, Mar 2002. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007.

SILVERIO, J. C. et al. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 1, p. 72-86, Feb 2010.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOSA, F. J. **Chagas: Mas allá de la frontera del bosque. Desmonte, desocupacion y migración en Tucum** Buenos Aires, Argentina,: 2010.



STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas – mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 34-40, 2005.

SULLIVAN, N. L. et al. Deficiency of antigen-specific B cells results in decreased *Trypanosoma cruzi* systemic but not mucosal immunity due to CD8 T cell exhaustion. **J Immunol**, v. 194, n. 4, p. 1806-1818, Feb 15 2015.

TAMBOURGI, D. V. et al. A participial cDNA Clone of Trypomastigote Decay-Accelerating Factor (T-DAF), a Developmentally Regulated Complement Inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, Has Genetic and Functional Similarities to the Human Complement Inhibitor DAF. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 61, p. 3656-3663, 1993.

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

TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1820-1829, May 1994.

TIBAYRENC, M.; MILES, M. A. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 77, p. 76-83, 1983.

TIBAYRENC, M. et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 4, p. 1335-9, Feb 15 1993.

TIBAYRENC, M. et al. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 1, p. 115-9, Jan 1986.

TOSELLO, B., J. et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012.

TZELEPIS, F.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. **PLoS One**, v. 2, n. 4, p. e393, Apr 25 2007.

VILAR-PEREIRA, G.; RUIVO, L. A.; LANNES-VIEIRA, J. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1042-1050, Dec 2015.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16(Sup. 2), , p. 7-12, 2000.

VIOTTI, R. et al. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 9, p. e1314, Sep 2011.

VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 10, p. 724-34, May 16 2006.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 3, p. 297-308, Sep 2005.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 81-92, Jul 2006.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**: [S.I.] Fact Sheet 340 2016.

ZELEDON , R. B., C. B; DIAS, J. C. P; LEIBY, D. A; DORN , P. L; COURA, J. R. **Introduction and Historical Background** 2012. 1-4.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 1, p. 102-9, Jan 1996.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 104(7), p. 1051-1054, 2009.