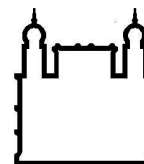




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA (PGPAT)

TESE DE DOUTORADO

**ANÁLISE IMUNO-FENOTÍPICA DE ANIMAIS NOD: ESTUDO DA
PROTEÇÃO AO DIABETES TIPO I MEDIADA PELO *T. cruzi* E DA INDUÇÃO
PELA CICLOFOSFAMIDA.**

DANIEL HUBER PESSINA

**Salvador – Bahia – Brasil
2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ANÁLISE IMUNO-FENOTÍPICA DE ANIMAIS NOD: ESTUDO DA
PROTEÇÃO AO DIABETES TIPO I MEDIADA PELO *T. cruzi* E DA INDUÇÃO
PELA CICLOFOSFAMIDA.**

DANIEL HUBER PESSINA

Orientadora: Prof^a Dr^a Fabíola Cardillo

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do
grau de Doutor.

**Salvador – Brasil
2013**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P475a Pessina, Daniel Huber
Análise imuno-fenotípica de animais nod: estudo da proteção ao diabetes tipo I mediada pelo *T. Cruzi* e da indução pela ciclofosfamida.[manuscrito] / Daniel Huber Pessina.- 2013.
117 f.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, 2013.
Orientador: Prof^a Dr^a.: Fabíola Cardillo

1. *Trypanosoma cruzi* 2. CD8 3. Gr1 4. Treg 5. NOD 6. Diabetes 7. Ciclofosfamida I.
Título

CDU 616.937: 616.379-008.64

**“ANÁLISE IMUNO-FENOTÍPICA DE ANIMAIS NOD: ESTUDO DA PROTEÇÃO AO DIABETES
TIPO I MEDIADA PELO T. CRUZI E DA INDUÇÃO PELA CICLOFOSFAMIDA”**

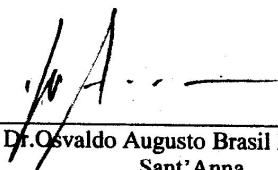
DANIEL HUBER PESSINA

FOLHA DE APROVAÇÃO

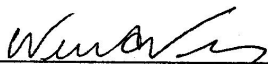
COMISSÃO EXAMINADORA



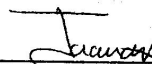
Dr. Auro Nomizo
Professor Doutor
USP/URB



Dr. Osvaldo Augusto Brasil Esteves de
Sant'Anna
Pesquisador Científico
USP



Dra. Neuza Maria Alcântara-Neves
Professor Colaborador
UFBA



Dr. Jorge Clarêncio Souza Andrade
Professor Adjunto
Escola Bahiana de Medicina



Dra. Fabíola Cardillo
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

Capes

FAPERJ

AGRADECIMENTOS

- À minha família, em especial a meus pais, Fermino Pessina e Friederike Huber, pelo apoio incondicional;
- À dra Fabíola Cardillo, pela oportunidade, amizade e empenho que tem dedicado ao me orientar;
- Ao dr José Mengel, pela co-orientação;
- Ao dr Jorge Nihei, por colaborar nos experimentos e nas discussões científicas;
- Ao dr Lain Pontes, pela contribuição na discussão;
- À msc Liliane, pelo auxílio nos experimentos de sorting;
- À dra Sônia Andrade e aos amigos do LACEI;
- Ao msc Everton Baptista e todos os amigos do LAPEX;
- Aos amigos do LPBI;
- Aos membros da banca;
- Ao povo brasileiro, por financiar esta pesquisa, através do CNPq, Capes e FAPERJ;
- Ao CPqGM e à UFBA;

Sei que a minha missão(...) representa uma gota no oceano.

Mas sem essa gota, o oceano seria menor.

Madre Teresa de Calcutá

PESSINA, Daniel Huber. Análise imuno-fenotípica de animais NOD: estudo da proteção ao diabetes tipo I mediada pelo *T. cruzi* e da indução pela ciclofosfamida. 117 f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

Os animais NOD representam o principal modelo experimental de estudo do diabetes autoimune. Apesar do progressivo número de estudos realizados, muitos aspectos imunes da promoção e regulação desta doença continuam obscuros. Utilizando o modelo (pela primeira vez aqui descrito) de proteção induzida pelo *T. cruzi*, bem como o modelo de aceleração pela ciclofosfamida, fizemos um estudo imuno-fenotípico em animais NOD com o objetivo de elucidar mecanismos imunes responsáveis pela regulação do diabetes tipo I. Demonstramos que a infecção de camundongos NOD com o *T. cruzi* os protege do desenvolvimento do diabetes. Estes animais desenvolvem uma resposta ao parasita caracterizada por uma pobre expansão de células T CD8 efectoras, bem como uma menor migração destas para os sítios parasitários. Estudo do perfil de citocinas mostraram ainda uma reduzida produção inicial de IFN γ no baço, mas elevada produção tardia nos tecidos inflamados, comparado a animais BALB/c. Estes dados, associados a uma maior produção inicial de IL-10 por esplenócitos, justificam a maior susceptibilidade à infecção observada nos animais NOD. O estudo de populações celulares com atividade regulatória mostrou que há aumento de Treg no início da infecção. Contudo a proteção ao diabetes desencadeada pelo *T. cruzi* não se correlaciona ao número de células Treg, pois há uma redução destas ao longo da infecção. Este fato, associado à observação de que a ciclofosfamida é incapaz de induzir diabetes nos animais infectados, apontaram para um papel limitado destas células na proteção ao diabetes pelo *T. cruzi*. Entretanto, houve aumento de células Gr1+, e a depleção destas reverte a proteção ao diabetes causada pela infecção, além de induzir a expansão de células T CD8+ efectoras e sua produção de IFN γ . Verificamos ainda, que níveis aumentados da expressão de PD-L1 relacionaram-se com a proteção ao diabetes proporcionado pelo *T. cruzi*, enquanto níveis reduzidos se relacionaram ao seu desenvolvimento espontâneo. Contudo, o tratamento com ciclofosfamida não reduz a expressão de PD-L1 em linfócitos, mas induz rapidamente o diabetes em animais NOD não infectados e leva a uma drástica diminuição de células Tregs CD25+ esplênicas. Os resultados, aqui tomados em conjunto, apontam para um complexo mecanismo de controle do diabetes, que envolve diferentes populações celulares que atuam de maneira variada com o modelo estudado.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, CD8, Gr1, Treg, NOD, diabetes, ciclofosfamida.

PESSINA, Daniel Huber. Immunophenotypic analysis of NOD mice: study on diabetes protection by *T. cruzi* and cyclophosphamide induction's models. 117 f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The NOD mice are the most used experimental model for the study of autoimmune diabetes. Despite progressive number of studies, many aspects about the immune regulation and disease onset remains unclear. Using our model (described here for the first time) of diabetes protection induced by *T. cruzi*, as well as cyclophosphamide acceleration, we performed a immunophenotypic analysis of NOD animals, aiming to elucidate the immune mechanisms responsible for regulation of type I diabetes. We demonstrated that infection of NOD mice with *T. cruzi* protects them from diabetes onset. These mice develop a poor expansion of effector CD8 T cells in response to parasite, and have lower percentage of those lymphocytes in inflammatory sites, when compared to BALB/c mice. Cytokine profile's analysis also revealed a reduced initial production of IFN γ in spleen, but high late production in inflamed tissues. Those data associated to an elevated production of IL-10 by spleen cells could explain the increased susceptibility observed in infected NOD mice. Further analysis showed an increased Treg cells rates early after infection, followed by a progressive reduction thereof along infection. This fact, coupled with the observation that cyclophosphamide is unable to induce diabetes in infected mice, indicates a limited role for these cells in diabetes protection by *T. cruzi*. However, increased Gr1 + cells numbers was also found in infected mice, and its depletion reverses the protection of diabetes related to infection. That reversion was associated to an expansion of effector CD8 + T cells and their production of IFN γ . We also found that increased expression of PD-L1 were also related to diabetes protection provided by *T. cruzi* infection, while low levels were related to spontaneous diabetes development. Treatment with cyclophosphamide however did not reduce PD-L1 expression on lymphocytes, despites rapidly set diabetes in NOD uninfected animals. On the other hand, cyclophosphamide leads to a drastic decrease of CD25 + Treg cells in the spleen of NOD mice. These results, taken together, point to a complex mechanism of diabetes control, which involves different cell populations acting variously with the model.

Keys words: *Trypanosoma cruzi*, CD8, Gr1, Treg, NOD, diabetes, cyclophosphamide

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mortalidade dos animais NOD e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	50
Figura 2	Índices parasitêmicos no sangue periférico de animais infectados com a cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	51
Figura 3	Contagem das células nucleadas do baço de animais NOD e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	52
Figura 4	- Números de células CD8 e CD4 presentes no baço de animais BALB/c e NOD infectados pela cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	53
Figura 5	Animais BALB/c desenvolvem uma resposta efetora de células CD8 muito mais intensa que animais NOD.	54
Figura 6	Porcentagem de linfócitos T CD4 e CD8 entre as células que infiltram o músculo esquelético de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	55
Figura 7	Produção de citocinas por esplenócitos em cultura.	56
Figura 8	Produção de IFN γ por células T inflamatórias do músculo esquelético (SK) e coração, 40 dias após a infecção.	57
Figura 9	Número de células T CD4 expressando CD25 e Foxp3 no baço de animais BALB/c e NOD, após a infecção pela cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	58
Figura 10	Proporção das células CD4 que expressam Foxp3 e CD25 no baço de animais BALB/c e NOD, após infecção pela cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> .	59
Figura 11	<i>Dot plots</i> representativos da expressão de Foxp3 e CD25 em células CD4+ que infiltram o músculo esquelético e coração de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	60
Figura 12	Proporção das células esplênicas que expressam Gr1 em animais BALB/c e NOD, após infecção pelo <i>T. cruzi</i> .	61
Figura 13	Incidência de diabetes em animais NOD fêmeas após infecção com o <i>Trypanosoma cruzi</i> .	62
Figura 14	Incidência de diabetes em animais NOD infectados ou não, após o tratamento com ciclofosfamida.	63
Figura 15	Porcentagem de células Treg em relação às células T CD4+, no baço e linfonodos pancreáticos (LNP) de animais NOD infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	64
Figura 16	Expressão de PD-L1 em esplenócitos e em células do linfonodo pancreático de animais NOD infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	66
Figura 17	Expressão de PD-1 sobre células T de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	67
Figura 18	Citometria de fluxo de sangue periférico de animais NOD infectados antes e dois dias após o tratamento com anti-GR1.	68
Figura 19	Variação na expressão de Gr1 em diferentes populações do sangue periférico de animal NOD infectado pelo <i>T. cruzi</i> .	69
Figura 20	Morfologia das células GR1+ isoladas do baço de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> .	70
Figura 21	. Efeito do tratamento com anti-Gr1 sobre a glicemia de animais NOD, infectados ou não.	71

Figura 22	Efeito do tratamento com anti-Gr1 sobre a celularidade do baço e suas principais populações de linfócitos T.	72
Figura 23	Efeito da depleção de células Gr1+ sobre a expressão de CD62L e produção de IFN γ por células T.	73
Figura 24	Expressão de CD11b e PD-L2 em sangue periférico de animais NOD infectados, após tratamento com anti-Gr1.	74
Figura 25	Contagem do número de células mononucleares do baço de animais NOD após tratamento com ciclofosfamida.	76
Figura 26	Expressão de CD44 e CD62L em células T do baço de animais NOD tratados com ciclofosfamida.	77
Figura 27	Número de células T CD4 Foxp3+ CD25+.	78
Figura 28	Expressão de Foxp3 e CD25 sobre células do baço e células do infiltrado pancreático.	79
Figura 29	Níveis de expressão de PD-L1 no baço, linfonodo e células que infiltram o pâncreas em animais NOD tratados ou não com ciclofosfamida.	81
Figura 30	Desenho esquemático ilustrando como a infecção pelo <i>T. cruzi</i> pode estar inibindo o desenvolvimento do diabetes tipo I em animais NOD, e como a depleção de células Gr1+ pode estar revertendo este efeito.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIRE	Reguladores de autoimunidade
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMP	Adenosina mono-fosfato
APC	Célula apresentadora de antígeno
Arg1	Arginase 1
ATP	Adenosina tri-fosfato
Bcl-xL	do inglês, <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCR	Receptor do linfócito B
Bio ou BIO	Biotina
BSA	Albumina bovina
CD	Grupo de diferenciação
CD3	Complexo proteico co-receptor do TCR
CD4	Co-receptor do TCR que se liga ao MHC de classe II
CD8	Co-receptor do TCR que se liga ao MHC de classe I
CD11b	Integrina alfa-M, que juntamente com o CD18 forma o Receptor de Complemento 3 (Mac-1).
CD11c	Integrina alfa-X, que juntamente com o CD18 forma o Receptor de Complemento 4.
CD25	Cadeia alfa do receptor da IL-2
CD40	Molécula co-estimulatória que se liga ao CD40L.
CD44	Glicoproteína cuja expressão é utilizada na identificação de células T ativadas e de memória.
CD62L	L-selectina. Direciona a célula para os linfonodos através das veias endoteliais altas.
CFA	Adjuvante completo de Freund
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CTLA-4	do inglês, <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína
Foxp3	do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
G6PC2	Glicose-6-fosfatase 2
GAD	do inglês, <i>Glutamic acid decarboxylase</i>
GITR	do inglês, <i>Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene</i>
Gr1	Receptor 1 do granulócito
IA-2	do inglês, <i>Insulinoma-associated protein 2</i>
ICA	do inglês, <i>Islet cell antigen</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon do tipo I
Ig	Imunoglobulina
IGRP	do inglês, <i>Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein</i>
IL	Interleucina
IL2R	Receptor da interleucina 2
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida

LN	Linfonodo
LNP	Linfonodo pancreático
LPS	Lipopolissacarídeo
MDSC	Célula supressora de origem mielóide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NK	Linfócito <i>Natural Killer</i>
NKT	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NLR	do inglês, <i>nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	Camundongo diabético não obeso
PAMP	Padrões moleculares associado a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PD-1	do inglês, <i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	do inglês, <i>Programmed cell death 1 ligand</i>
PD-L2	do inglês, <i>Programmed cell death 1 ligand 2</i>
PDX-1	do inglês, <i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PE	Ficoeritrina
PerCP	do inglês, <i>Peridinin Chlorophyll-a Protein</i>
PRR	do inglês, <i>Pattern recognition receptors</i>
Ptpn22	do inglês <i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
ROS	Radicais livres do oxigênio
SBF	Soro bovino fetal
SCID	Camundongos com imunodeficiência combinada severa
SK	Músculo esquelético
STAT5	do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
T1D	Diabetes tipo I
TCR	Receptor de célula T
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Tr1	Célula T regulatória do tipo I
Treg	Célula T regulatória Foxp3+
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
1.1 - O SISTEMA IMUNE E O ASPECTO EVOLUTIVO.....	14
1.2 - SISTEMA IMUNE INATO.....	14
1.3 - SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO.....	15
1.4 - REGULAÇÃO.....	17
1.4.1 - Tregs	18
1.4.2 - MDSC	20
1.4.3 - PD1/PDL1	24
1.5 - DIABETES.....	25
1.5.1 - Diabetes Autoimune	27
1.5.2 - O Modelo NOD	29
1.6 - A DOENÇA DE CHAGAS E MODELOS EXPERIMENTAIS.....	31
1.6.1 - Resposta Imune ao <i>T. cruzi</i>	33
1.7 - CICLOFOSFAMIDA.....	35
2 - OBJETIVOS	38
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
3.2 - PARASITAS.....	39
3.3 - AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA.....	40
3.4 - AVALIAÇÃO DA GLICEMIA.....	40
3.5 - TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA.....	40
3.6 - DEPLEÇÃO DE CÉLULAS <i>in vivo</i>	41
3.7 - OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS <i>in vivo</i>	41
3.8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA.....	42
3.9 - OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS TECIDOS.....	42
3.10 - OBTENÇÃO DE PBMC PARA CITOMETRIA.....	43
3.11 - CONTAGEM DE CÉLULAS.....	43
3.12 - CULTURA DE CÉLULAS.....	44
3.13 - CITOMETRIA DE FLUXO.....	44
3.13.1 - Marcação de superfície	44
3.13.2 - Marcação intracelular para citocina	45
3.13.3 - Marcação intranuclear para Foxp3	46
3.14 - SEPARAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	46
3.15 - ANÁLISE CITOLÓGICA.....	47
3.16 - <i>SOFTWARES</i> USADOS NO PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	47
3.17 - ELISA.....	47
3.18 - TESTES ESTATÍSTICOS.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1 - RESULTADOS - PARTE 1.....	50
4.1.1 - Animais NOD são mais suscetíveis à cepa Tulahuen do <i>T. cruzi</i> que animais BALB/c	50
4.1.2 - A maior susceptibilidade de animais NOD se relaciona a uma menor expansão de células T CD8+, em especial, de células efectoras	52
4.1.3 - O perfil de produção de citocinas diverge entre animais BALB/c e NOD	56

4.1.4- Animais BALB/c apresentam números maiores de células Treg que animais NOD, e esta relação se mantém durante a fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i>.....	58
4.1.5 - As Tregs representam uma porcentagem mínima das células que infiltram o músculo e coração.....	60
4.1.6 - A infecção induz aumento significativo de células Gr1+ no baço de animais NOD, que é expressivamente maior que a observada em animais BALB/c.....	61
4.2 -RESULTADOS: PARTE II.....	62
4.2.1 -A infecção pelo <i>T. cruzi</i> inibe o desenvolvimento do diabetes em animais NOD.....	62
4.2.2 - Animais NOD infectados estão protegidos do diabetes mesmo após administração de ciclofosfamida.....	63
4.2.3 - A proteção contra o diabetes conferido a animais NOD pela infecção com o <i>T. cruzi</i> não se relaciona ao número de células Treg.....	64
4.2.4 - A infecção pelo <i>T. cruzi</i> induz aumento na expressão de PD-L1 e, posteriormente, de PD-1.....	65
4.2.5 - A infecção pelo <i>T. cruzi</i> induz alterações na população Gr1+ no sangue periférico e, consequentemente, no baço.....	68
4.2.6 - O tratamento de animais infectados com anti-Gr1 reverte a proteção contra o diabetes.....	71
4.2.7 - A depleção de células Gr1+ induz aumento da celularidade esplênica em animais infectados, com expansão de células T CD8+.....	72
4.2.8 - A depleção de células Gr1+ induz leve aumento da memória efetora e amplia o número de células T CD8 capazes de produzir IFNγ.....	73
4.2.9 - Depleção de células Gr1+ em animais NOD infectados induz aumento de células CD11b+ que expressam PD-L2.....	74
4.3 - RESULTADOS: PARTE III.....	75
4.3.1 - A ciclofosfamida induz diabetes em animais NOD através de mecanismo imuno-farmacológico.....	75
4.3.2 - O tratamento com única dose de ciclofosfamida não determina redução da celularidade do baço ao oitavo dia pós-tratamento.....	76
4.3.3 - O tratamento com ciclofosfamida induz redução na proporção de células T CD8 com fenótipo de memória.....	77
4.3.4 - Animais NOD apresentam, no oitavo dia pós-tratamento com ciclofosfamida, redução de células Treg no baço, mas não no infiltrado que ocorre no pâncreas destes animais.....	78
4.3.5 - Animais que desenvolvem diabetes espontaneamente possuem o menor nível de expressão de PD-L1 sobre linfócitos T.....	80
5 - DISCUSSÃO.....	82
6 - CONCLUSÕES.....	95
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - O SISTEMA IMUNE E O ASPECTO EVOLUTIVO

Os corpos dos metazoários são ricos em componentes necessários para sustentar a vida, como água e nutrientes, e são, portanto, um ambiente atrativo aos microorganismos. A sobrevivência dos metazoários depende então da capacidade em combater os microorganismos que possam vir a se aproveitar deste ambiente em uma relação de parasitismo. Para tanto, múltiplos mecanismos de defesa tem sido desenvolvidos, e evolutivamente selecionados, pelos metazoários para evitar ou destruir microorganismos que possivelmente viessem a lhes ser prejudiciais (COOPER, M.D. & HERRIN, B.R., 2010). Estes mecanismos, em conjunto, constituem o que se convencionou chamar de sistema imune.

O sistema imune dos metazoários mais simples é baseado em pequenas moléculas microbicidas e por fagócitos que reconhecem padrões moleculares comuns a patógenos (PAMPs) (HOFFMANN, J.A. et al 1999; JANEWAY, C.A., JR. & MEDZHITOV, R., 2002). A partir da duplicação do genoma nos cordados entretanto, o sistema imune evoluiu para um sistema mais complexo, que envolve variados mecanismos microbicidas e grupos celulares especializados, como os linfócitos por exemplo (COOPER, M.D. & HERRIN, B.R., 2010). Esta evolução permitiu que os vertebrados vivessem por mais tempo e alcançassem dimensões maiores.

1.2 - SISTEMA IMUNE INATO

O sistema imune inato representa a linha de defesa inicial utilizada pelos metazoários contra os microorganismos. O primeiro mecanismo utilizado é o da barreira física, que impede os microorganismos presentes no ambiente externo terem acesso à estrutura interna do metazoário. Nos mamíferos é concebida pela pele e mucosas, formadas por grupos de células especializadas fortemente unidas e que possuem rápida multiplicação, com renovação direcionada para o meio externo. Além disso, substâncias produzidas e excretadas nestes tecidos dificultam a invasão, ou mesmo eliminam,

grande parte dos microorganismos. Entre eles encontram-se muco e surfactantes produzidos no trato respiratório (WRIGHT, J.R, 2004), saliva e ácido gástrico no sistema digestivo, lágrimas (e a lisozima presente nesta), β -defensinas produzidas por células epiteliais das mucosas (MATHEWS, M. et al, 1999), entre outras.

Caso o microorganismo consiga sobrepassar a barreira epitelial, ele poderá ser imediatamente reconhecido como corpo estranho e eliminado. Isto porque os microorganismos possuem moléculas que lhes são vitais, mas estão ausentes no hospedeiro. Estas moléculas, denominadas de PAMPs, apresentam um padrão estrutural evolutivamente conservado, e identificam não uma espécie isolada, mas um grupos de microorganismos (JANEWAY, C.A., JR. & MEDZHITOV, R., 2002). Fagócitos especializados reconhecem os PAMPs através de receptores presentes na membrana ou no interior da célula (PRR). O evento de reconhecimento provoca alterações nos macrófagos e neutrófilos o que induz a fagocitose do microorganismo, e inicia mecanismos microbicidas, como a produção de radicais livres de oxigênio (JANEWAY, C.A., JR. & MEDZHITOV, R., 2002).

Além do reconhecimento direto mediado por PAMPs, mecanismos humorais como o complemento ou anticorpos naturais podem se ligar a estruturas dos microorganismos, induzindo lise destes, ou opsonizando-os e sinalizando para ação dos fagócitos (OCHSENBEIN, A.F. & ZINKERNAGEL, R.M., 2000).

1.3 - SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO

Quando a infecção microbiana é efetiva o suficiente (ou não é prontamente eliminada) se estabelecerá uma resposta imune adaptativa. A resposta imune adaptativa representa um avanço evolutivo dos vertebrados (COOPER, M.D. & HERRIN, B.R., 2010) e o termo "adaptativo" refere-se à sua habilidade de se moldar (isto é, adaptar), seja qualitativo- ou quantitativamente, em resposta a um determinado organismo invasor (SMITH, K.A., 2012). Seu sucesso evolutivo se resume na capacidade de reconhecer virtualmente qualquer patógeno, de direcionar a resposta efetora contra ele

e, por fim, de criar uma memória capaz de reconhecer e responder mais eficientemente contra aquela espécie na próxima infecção (adaptação).

Esta resposta imune adaptativa tem como base os linfócitos e seus receptores antigênicos únicos, cuja imensa variabilidade é criada a partir de recombinação de segmentos gênicos aleatoriamente (TONEGAWA, S., 1983). Assim, diversos clones são gerados, cada qual com a capacidade de reconhecer uma única conformação antigênica, de modo que a resposta imune específica mediada por estes linfócitos só é possível devido à seleção clonal. Este mecanismo, descrito por Macfarlane Burnet em 1959, consiste na ativação e expansão dos clones específicos a determinado antígeno, em números suficientes para exercer, em combinação com o sistema imune inato, uma resposta efetora eficiente (BURNET, S.F.M., 1959). Tal evento tem como consequência não apenas a eliminação do organismo invasor, mas também a formação de uma memória imunológica contra este, que consiste da manutenção posterior de uma proporção maior de clones específicos ao organismo invasor, bem como de modificações fenotípicas no linfócitos que, conjuntamente, conferem uma maior efetividade na resposta a uma segunda invasão (SALLUSTO, F. et al., 2010).

Os linfócitos representam um grupo heterogêneo, e podem ser divididos em duas principais populações: os linfócitos T (timo-dependentes) e os linfócitos B (derivados da medula óssea ou, nas aves, da bursa de Fabricius). Os linfócitos T possuem o TCR, através do qual reconhecem primariamente antígenos proteicos na forma de peptídeos ligados a moléculas de MHC. Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos extracelulares, que são apresentados por células apresentadoras de antígeno (APC) através de MHC de classe II, enquanto as células T CD8⁺ reconhecem primariamente antígenos intracelulares, ligados a MHC de classe I, e que são expressos por praticamente todos os tipos celulares. Os linfócitos B, por sua vez, possuem o BCR, reconhecem antígenos extracelulares de diferentes composições e são produtores de anticorpos (revisto em DELVES, P.J. & ROITT, I.M., 2000).

1.4 - REGULAÇÃO

Devido à imensa variabilidade de receptores de linfócitos que podem ser criados a partir da recombinação de segmentos gênicos, antígenos próprios passam a ser alvos potenciais de reconhecimento. Para evitar que os linfócitos medeiem uma resposta prejudicial contra o próprio tecido, diversos mecanismos foram criados para tolerar a presença destes antígenos próprios. Estes mecanismos podem ser centrais, isto é, atuarem durante o amadurecimento do linfócito, ou periféricos, atuando durante a resposta.

O mecanismo de tolerância central se baseia na indução de apoptose em linfócitos imaturos que reconhecem com alta afinidade antígenos próprios. No caso dos linfócitos T isto ocorre no timo, onde a expressão de AIRE por células tímicas epiteliais medulares confere a estas a capacidade de expressar antígenos específicos de diversos tecidos, e assim induzir apoptose nos clones potencialmente danosos (revisto em PETERSON, P. et al, 2008).

Entretanto, alguns clones auto-reativos escapam desta seleção negativa, e portanto precisam ser regulados na periferia. Esta regulação é complexa, e diversos mecanismos e células responsáveis por tal têm sido continuamente identificados. Dentre os grupos celulares descritos com esta capacidade podemos citar as células T regulatórias (Treg), as células regulatórias T do tipo 1 (Tr1), as células NKT, células $\gamma\delta$, células dendríticas supressoras, células supressoras de origem mielóide (MDSC), dentre muitas outras. Os mecanismos moleculares responsáveis por tal regulação são os mais variados, e incluem ligantes de superfície (como o CTLA4, Fas-FasL, PD1-PDL1), citocinas anti-inflamatórias (IL10 e TGF β , por exemplo) e a depleção de nutrientes e fatores de crescimento (arginase e IL2R α) (COBBOLD, S.P. et al, 2006; RABINOVICH, G.A. et al, 2007). A seguir serão detalhados algumas populações e mecanismos regulatórios abordados nesta tese.

1.4.1 - Tregs

No início da década de 70 foi postulado a existência de um grupo de linfócitos capazes de induzir supressão da resposta imune. Estes linfócitos, denominados na época de linfócitos supressores, eram caracterizados por sua capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos convencionais. Seriam os responsáveis pela tolerância periférica, evitando o desenvolvimento de doenças auto-imunes em neonatos timectomizados (NISHIZUKA, Y. & SAKAKURA, T., 1969) ou limitando a hipersensibilidade do tipo tardia (GERSHON, R.K. & KONDO, K., 1970). Contudo, somente na década de 90 foi dada identidade a estas células, através de sua associação ao marcador de superfície CD25 (SAKAGUCHI, S. et al., 1995). Além do CD25, foi verificado que tais células com capacidade supressora expressam também uma variedade de marcadores de superfície, mas comumente relacionados às células ativadas e/ou de memória, entre eles o CD45RB^{low}, CD62L, CD103, CTLA-4 e GITR (revisto em FEHERVARI, Z. & SAKAGUCHI, S., 2004). Entretanto, nenhum destes marcadores de superfície identifica unicamente as células T supressoras, sendo estes expressos também em outros tipos celulares. Em 2003, analisando animais “*Scurfy*”, os quais desenvolvem uma doença linfoproliferativa semelhante a IPEX (do inglês “*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*”) em humanos, dois grupos de pesquisa independentes demonstraram que tais animais eram deficientes de células T supressoras, em virtude de possuírem uma forma defeituosa do gene *Foxp3*. De fato, a expressão retroviral deste gene em células *naive* é capaz de convertê-las em células com fenótipo regulatório, inclusive com atividade supressora e expressando o GITR (KHATTRI, R. et al., 2003; HORI, S. et al., 2003). *Foxp3* mRNA e seu produto proteico, o “*Scurfin*”, parecem ser uma característica única das células T supressoras, pelo menos no camundongo, não sendo expresso por nenhuma outras linhagens de linfócitos (FONTENOT, J.D. et al., 2003). Ainda que exista uma população de células *Foxp3*⁺*CD25*⁻, é importante ressaltar que tais linfócitos ainda mantêm sua atividade supressora, embora sejam negativos para CD25 (revisto em FEHERVARI, Z. & SAKAGUCHI, S., 2004). Estas células *Foxp3*⁺, as quais se convencionou chamar células T regulatórias (ou Treg), são essenciais para a manutenção da homeostasia do sistema imune, uma vez que animais deficientes destes linfócitos desenvolvem síndrome linfoproliferativa fatal caracterizada por diversas desordens autoimunes, incluindo diabetes tipo I, tireoidite autoimune, eczema, entre outros (FONTENOT, J.D. et al., 2003).

A expressão do Foxp3 parece ser um evento crítico no desenvolvimento das células Treg, podendo ocorrer no timo (gerando o que convencionou-se chamar Treg naturais, ou seja, nTreg) ou na periferia (Treg induzidas, ou seja, iTreg). No timo, as nTreg se originam durante a seleção positiva através do reconhecimento, com elevada afinidade, de antígenos próprios, além de sinalização pelo CD28 (revisto em HSIEH, C.S. et al, 2012). Na periferia por sua vez, as iTreg desenvolvem-se a partir de células T CD4⁺ naive estimuladas na presença de uma combinação favorável de citocinas, que incluem a presença de TGF β e ausência de IL-6, bem como a sinalização via CTLA-4 (revisto em CUROTTO DE LAFAILLE, M.A. & LAFAILLE, J.J., 2009). O repertório de TCR destas duas populações possuem mínima sobreposição, e se complementam na manutenção da homeostasia do sistema imune, uma vez que a ausência de uma delas induz inflamação crônica e autoimunidade (HARIBHAI, D. et al, 2011).

Diversos mecanismos têm sido descritos para explicar o efeito supressor exercido pelas Tregs. Contudo, nenhum é convincente o suficiente para abranger as variadas características de sua ação (revisto em SHALEV, I. et al., 2011). Sabe-se, entretanto, que elas expressam constitutivamente o CD25 (IL2R α). Esta molécula é expressa após ativação do linfócito T convencional e participa da formação do receptor de alta afinidade pela IL-2 (revisto em FEHERVARI, Z. & SAKAGUCHI, S., 2004). A IL-2 é necessária para a ativação e replicação linfocitária e age de forma autócrina e parácrina. Diferente das células T convencionais, que diminuem a expressão do CD25 após ativação, as Tregs apresentam constitutivamente esta molécula (HORI, S. et al., 2003).

A importância do CD25 na atividade regulatória das Tregs é evidenciada pelo fato de que animais deficientes em IL-2, CD25 (IL2R α) ou CD122 (IL2R β) desenvolvem uma doença inflamatória letal, denominada síndrome da deficiência de IL-2, a qual pode ser prevenida pela inoculação de células CD4⁺CD25⁺ juntamente com uma fonte de IL-2 (PAPIERNIK, M. et al., 1998; MALEK, T.R. et al., 2002). Do mesmo modo, a o tratamento de animais com anticorpo neutralizante anti-IL-2 induz diminuição das Tregs e o aparecimento de doença autoimune. Curiosamente, a IL-2 necessária para a manutenção destas células parece ser proveniente de células não-regulatórias recém ativadas CD4⁺CD25^{low}, entre as quais estão incluídas as células auto-reativas potencialmente patogênicas (SETOGUCHI, R. et al., 2005). Portanto, um dos mecanismos sugeridos para sua atividade supressora seria através da competição

por IL-2, necessária para a proliferação durante a ativação inicial dos linfócitos T convencionais (SHALEV, I. et al., 2011), e isto explicaria seu principal papel na manutenção homeostática.

Uma vez que a IL-2 é produzida durante a expansão clonal, o efeito regulador por privação de IL-2 só é possível nos órgãos linfóides periféricos. Entretanto, têm-se descrito a presença de linfócitos T Foxp3+ nos sítios inflamatórios. Portanto, outro mecanismo deve estar sendo utilizado por estas células para regular a resposta efetora. Estudos mostram que as Tregs, através da atividade da CD39, é capaz de degradar o ATP extracelular (decorrente de lise celular) em AMP cíclico. Deste modo inibem a ativação de células dendríticas, bem como da expressão de E- e P-selectinas no endotélio vascular, diminuindo a migração de linfócitos ativados e a perpetuação da inflamação (BORSELLINO, G. et al, 2007; RING, S. et al, 2009). Somado a isto, uma subpopulação de células T CD4 Foxp3+ é capaz de produzir IL-10, uma citocina anti-inflamatória com efeitos pleiotrópicos. Esta subpopulação está presente sobretudo nos tecidos de intensa estimulação antigênica, como pulmões e intestino. Seu mecanismo de ação é semelhante a outra população T regulatória, as Tr1, e se dá através da produção de fatores solúveis como o próprio IL-10 e o TGF β (MAYNARD, C.L. et al, 2007)

1.4.2 - MDSC

As células supressoras de origem mielóide (MDSC) foram inicialmente identificadas em animais carregando tumores (YOUNG, M.R. et al, 1987). Esta denominação engloba um grupo heterogêneo de células, que possuem em comum sua origem mielóide, seu estado imaturo e a capacidade de inibir a proliferação de células T (revisto em GABRILOVICH, D.I. & NAGARAJ, S., 2009). Morfológicamente, estas células podem ser distinguidas em duas principais populações: uma com características primariamente monocítica, e outra granulocítica, ambas com capacidade supressora. Fenotipicamente essas células apresentam os marcadores CD11b e Gr1. Entretanto estes marcadores não são específicos para estas células, sendo expresso por diferentes populações com atividade inflamatória, como macrófagos e neutrófilos. Contudo, as

MDSC não possuem os marcadores típicos de uma célula mielóide madura (revisto em YOUN, J. & GABRILOVICH, D.I., 2010).

Na tentativa de melhor caracterizar estas células, diversos grupos independentes procuraram identificar marcadores específicos, usando como parâmetro a capacidade destas células de inibir a proliferação de linfócitos ou sua produção de citocinas pró-inflamatórias. As mais bem aceitas caracterizações partiram da descoberta de que o anti-Gr1 (produzido pelo hibridoma RB6-8C5 e utilizado como marcador padrão destas células) reconhece um epítipo comum presente nas moléculas Ly-6C e Ly-6G. Utilizando anticorpos que reconhecem diferencialmente estas moléculas, duas principais populações foram identificadas: uma CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺, constituída majoritariamente por células de aspecto monocítico, e outra CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁻, constituída majoritariamente por células de aspecto granulocítico, ambas com atividade supressora (MOVAHEDI, K. et al, 2008; YOUN, J.I. et al, 2008). Estudos subsequentes complicaram ainda mais a classificação fenotípica destas células. Greifenber e colaboradores dividiram as células CD11b⁺Gr1⁺ em seis diferentes subpopulações de acordo com a expressão diferencial de Gr1 e CD11b, identificando duas diferentes populações monocíticas e duas granulocíticas de MDSC, todas com atividade supressora (GREIFENBERG, V. et al, 2009). Dolcetti e colaboradores subdividiram as MDSC em três diferentes populações, Gr1^{low}, Gr1^{int} e Gr1^{hi}, e identificaram a população Gr1^{int} como aquela com maior potencial supressor (DOLCETTI, L. et al, 2010).

Em camundongos normais, as células Gr1⁺ são 20-30% da medula, 2-4% do baço e estão ausentes nos linfonodos. Sua proporção entretanto, se altera com a mobilização do sistema imune em condições patológicas, como em neoplasias, infecções, sepse, trauma, inflamações crônicas, etc (revisto em GABRILOVICH, D.I. & NAGARAJ, S., 2009), e até mesmo em imunizações (BRONTE, V. et al, 1998). As MDSC não invadem apenas o tumor, mas se acumulam no baço destes animais e induzem supressão não só da capacidade de linfócitos T se proliferarem, mas também de produzirem citocinas pró-inflamatórias, como o IFN γ (YOUN, J. et al, 2008).

Vários fatores têm sido associados à indução de MDSC. Utilizando experimentos de silenciamento gênico, Dolcetti e colaboradores identificaram o GM-CSF como citocina responsável pela expansão das subpopulações monocíticas Gr1^{int} e

Gr1^{low} de MDSC no baço de animais com tumores (DOLCETTI, L. et al, 2010). Somando-se a isto, Waigth e colaboradores mostraram que o G-CSF é responsável pela indução das MDSC granulocíticas (WAIGHT, J.D. et al, 2011). O VEGF, produzido em grandes quantidades pela maioria dos tumores, parece também participar da indução de MDSC, uma vez que sua administração induz expansão de células Gr1+, e seu acúmulo no baço e linfonodos, além de inibir o desenvolvimento de células dendríticas (GABRILOVICH, D. et al, 1998). Alguns fatores, entretanto, têm demonstrado a capacidade de controlar a número de MDSC, como o IFN α (induzido via sinalização por TLR9 ou TLR3). Este é capaz de reduzir o efeito supressor de células MDSC através da indução de sua maturação (ZOGLMEIER, C. et al, 2011).

Os mecanismos de ação das MDSC envolvem principalmente a depleção de L-arginina e a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio. MDSC monocíticas parecem exercer supressão mediante expressão de arginase 1 (Arg1) e óxido nítrico sintase tipo 2 (iNOS), através da depleção da L-arginina presente no microambiente. Isto leva à inibição da re-expressão de CD3 ζ em linfócitos T estimulados (RODRIGUEZ, P.C. et al, 2004), além de impedir a expressão da ciclina D3 via CGN2 quinase, o que leva ao bloqueio do ciclo celular (RODRIGUEZ, P.C. et al, 2007). Além disso o próprio NO é capaz de induzir supressão de células T interferindo na sinalização intracelular mediada pelo IL2R, através do bloqueio da fosforilação de Jak3 e STAT5 (BINGISSER, R.M. et al, 1998). Já a ação supressora mediada pelas MDSC granulocíticas parece envolver primariamente a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) através do complexo NADPH oxidase (MOVAHEDI, K. et al, 2008; YOUN, J.I. et al, 2008; SCHMIELAU, J. et al, 2001). Isto parece se dar, mais intensamente, através do peroxinitrito (formado em associação ao NO), o qual, através da nitratação do TCR/CD8, é capaz de inibir o correto reconhecimento do complexo peptídeo-MHC por linfócitos T CD8+ (NAGARAJ, S. et al, 2007). Entretanto, o mecanismo de supressão mediado por depleção de L-arginina parece também estar presente nas MDSC granulocíticas, uma vez que a suplementação com arginina ou inibição da arginase 1 é capaz de bloquear seu efeito supressor em ensaios de linfoproliferação (SIPPEL, T.R. et al, 2011). Outros mecanismos descritos para ação das MDSC envolvem a expansão de células Treg, super-expressão de prostaglandina E₂, entre outros (revistos em CONDAMINE, T. & GABRILOVICH, D.I., 2011).

As MDSC têm sido originariamente descritas em estudos com tumores. Este fato, associado à importância clínica que o câncer representa, determinou que o acúmulo do conhecimento sobre estas células tenha sido feito envolvendo estudos em neoplasias. Apesar disso, estas células têm sido descritas em diversos outros processos patogênicos. Na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*, Goni e colaboradores observaram que a supressão linfoproliferativa observada durante a fase aguda se associava à expansão de células CD11b⁺ Gr1⁺. Estas eram capazes de suprimir, por mecanismos dependentes de IFN γ e NO, a capacidade proliferativa dos linfócitos T (GONI, O. et al, 2002). Estudos posteriores mostraram que estas células infiltram o miocárdio dos animais infectados, e são capazes de suprimir linfócitos T mediante depleção de L-arginina (CUERVO, H. et al, 2011). No modelo de infecção por *L. major*, entretanto, MDSC Gr1^{hi}(Ly6C^{hi}) CD11b^{hi} possui papel ambíguo, inibindo a proliferação de linfócitos T, ao mesmo tempo que são importantes para a eliminação do parasita (PEREIRA, W.F. et al, 2011). Estas células desempenham papel importante também na sepse polimicrobiana. Delano e colaboradores observaram que estas células se encontram dramaticamente elevadas na sepse, suprimindo a proliferação e a produção de IFN γ por células T CD8, mas não de células T CD4⁺ (DELANO, M.J. et al, 2007). A importância das MDSC têm sido descritos ainda na supressão da resposta mediante *stress* traumático (MAKARENKOVA, V.P. et al, 2006), na supressão observada em vacinas e administração de CFA (WANG, Z. et al, 2010) e no desvio da resposta imune observada em infecções por helmintos (TERRAZAS, L.I. et al, 2001).

Ultimamente estas células têm sido relacionadas também com a regulação de doenças autoimunes, principalmente a população monocítica CD11b Ly6C⁺ (revisto em CRIPPS, J.G. & GORHAM, J.D., 2011). Esta população foi encontrada no baço, sangue e infiltrado no sistema nervoso central em animais induzidos a desenvolverem encefalomielite autoimune (EAE), e suprimem a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ via apoptose mediada por NO (ZHU, B. et al, 2007). Em outro modelo experimental, a hepatite autoimune em animais BALB/c Tgfb1^{-/-}, estudos mostram que estas células se acumulam no fígado, e que o IFN γ é necessário para sua expansão e atividade supressora (CRIPPS, J.G. et al, 2010). Iwata e colaboradores mostraram que, em animais MRL-Fas^{lpr} (os quais desenvolvem doença semelhante ao lúpus eritematoso), células CD11b+Gr1^{low} se acumulam no rim com a progressão da doença e são capazes de suprimir a proliferação de células T CD4 por mecanismo dependente de arginase (IWATA, Y. et al, 2010). Por fim, alguns estudos têm sugerido que estas

células podem proteger contra o diabetes autoimune. Usando dois modelos distintos, um de transferência de células transgênicas CD4-HA-TCR para animais INS-HA/RAG^{-/-}, e outro de transferência de células diabetogênicas para animais NOD/SCID, Yin e colaboradores mostraram que MDSC isoladas de tumor são capazes de proteger do diabetes autoimune, e sugeriram que isto se dê por indução de anergia e expansão de células CD4+CD25+Foxp3+ (YIN, B. et al, 2010).

1.4.3 - PD1/PDL1

O PD-1, foi identificado inicialmente em hibridoma de células T e tímocitos em apoptose induzida por anti-CD3. Esta associação levou seus descobridores a o denominarem como *Programmed Cell Death1* (ISHIDA, Y. et al., 1992). O PD-1 é expresso em linfócitos durante o desenvolvimento tímico e é induzida na periferia em células T maduras após sinalização através do TCR or BCR (AGATA, Y. et al, 1996), com exceção das células Treg e iNKT que o expressam constitutivamente (KEIR, M.E. et al., 2008; CHANG, W.S. et al, 2008). Citocinas da cadeia γ comum, como a IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21, os quais desempenham papel importante na expansão e sobrevivência celular, participam da indução do PD-1 (KINTER, A.L. et al, 2008). Tem-se descrito também a expressão de PD-1 em macrófagos, através da ação do IFN α (CHO, H.Y. et al, 2008), bem como em subpopulações de células dendríticas de origem mielóide, através de sinalização por TLR2, TLR3, TLR4 e NLR. A expressão em células dendríticas entretanto é inibida pela estimulação via TLR9 (YAO, S. et al, 2009).

Seu principal ligante, o PD-L1 (*Programmed Cell Death 1 Ligand 1*, uma molécula da família do B7.1 e B7.2), só foi identificado uma década depois (FREEMAN, G.J. et al., 2000). O mRNA que codifica para esta molécula tem ampla distribuição nos tecidos, com destaque para coração, músculo, placenta e pulmões (DONG, H. et al., 1999). A expressão de PD-L1 foi observado em células do endotélio vascular, células da ilhota pancreática e trofoblastos da placenta, entre outros (revisto em FRANCISCO, L.M. et al, 2010). Está presente constitutivamente em grande parte das células hematopoiéticas maduras, e sua expressão é aumentada após a ativação celular (KEIR, M.E. et al., 2008). Citocinas como interferons (tipos I e II) e TNF α

induzem a expressão de PD-L1 por linfócitos T, B e células endoteliais (revisto em KEIR, M.E. et al, 2008). Do mesmo modo, citocinas como a IL-2, IL-7 e IL-15 aumentam sua expressão em linfócitos T, enquanto a IL-21 o faz em linfócitos B (KINTER, A.L. et al, 2008).

Devido à ampla distribuição do PD-1 e seus ligantes, há muitas interações bidirecionais possíveis. Entretanto, a função do PD-1 têm sido melhor caracterizado em linfócitos T. A estimulação via PD-1 durante o reconhecimento antigênico pelo TCR, bloqueia a proliferação do linfócito e sua produção de citocinas (RILEY, J.L., 2009). Ele também previne a indução do Bcl-xL, fator de sobrevivência celular, bem como a expressão de fatores de transcrição associados à função efetora das células T, como o GATA-3, T-bet e Eomes (CHEMNITZ, J.M. et al, 2004; NURIEVA, R. et al, 2006). Análises de transcriptoma mostram que o sinal desencadeado por PD-1 é capaz de suprimir a transcrição de cerca de 90% dos genes cuja expressão são substancialmente induzidos pela estimulação via CD3/CD28 (PARRY, R.V. et al, 2005). Apesar disto, estudos mostram que a co-estimulação através do CD28 e IL-2 podem se sobrepor à inibição mediada pelo PD-1 (FREEMAN, G.J. et al, 2000; CARTER, L. et al, 2002). O PD-L1 também é expresso em células T, e sua interação com o B7.1 da célula apresentadora de antígeno induz inibição de sua ativação e produção de citocinas, como o TNF α , IFN γ e IL-2 (BUTTE, M.J. et al, 2007).

O PD-1 tem ganhado atenção ultimamente após ser demonstrado que sua expressão sobre linfócitos T CD8 está relacionado à exaustão funcional desta população durante infecções crônicas virais. O bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 nestes casos é capaz de restaurar a capacidade efetora destas células, induzindo posterior eliminação do patógeno (BARBER, D.L. et al., 2006). Em outro modelo de infecção, o bloqueio *in vivo* do eixo PD-1/PD-L1 com anticorpos reduz a parasitemia em animais infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (GUTIERREZ, F.R. et al., 2011). Este eixo parece participar também do controle homeostático do sistema imune, limitando não só a ativação e expansão de clones auto-reativos, mas também restringindo sua função efetora (revisto em FRANCISCO, L.M. et al, 2010). De fato, tem-se descrito a expressão de PD-L1 em células dendríticas tolerogênicas (PROBST, H.C. et al, 2005), onde desempenha importante papel na indução de células iTreg (WANG, L. et al, 2008). Além disso, expressão do PD-L1 em células não-hematopoiéticas pode ser importante para a manutenção da tolerância dos tecidos contra células T efectoras

patogênicas, bem como sua expressão em células do endotélio vascular pode ter a função de evitar que tais células extravasem para o órgão (GRABIE, N. et al., 2007; KEIR, M.E. et al., 2006). De fato, animais MRL deficientes para o PD-1 desenvolvem miocardite fatal (WANG, J. et al, 2010), enquanto animais NOD tratados com anticorpos capazes de bloquear o PD-L1 ou PD-1 desenvolvem precocemente diabetes (ANSARI, et al, 2003).

Outro ligante, o PD-L2, tem distribuição mais restrita que o PD-L1. É expresso em células apresentadoras de antígeno após estímulo destas, e se liga ao PD-1 com três vezes mais afinidade (BUTTE, M.J. et al, 2007). A função do PD-L2, entretanto, varia conforme o modelo estudado, podendo atuar como inibidor ou co-estimulador da célula T (LATCHMAN, Y. et al., 2001; TSENG, S.Y. et al., 2001). No modelo da infecção experimental pelo *T. cruzi*, o PD-L2 parece atuar como molécula co-estimulatória, uma vez que seu bloqueio induz aumento na expressão de arginase e IL-10, e redução de IFN- γ e iNOS por macrófagos. Além disso animais deficientes para seu gene apresentam parasitemia mais elevada (DULGERIAN, L.R. et al., 2011).

1.5 - DIABETES

O diabetes mellitus é uma doença caracterizada pela incapacidade do organismo em controlar o nível de glicose no sangue, levando ao acúmulo deste a índices excessivamente altos. O diabetes pode ser primariamente de dois tipos: o diabetes tipo I, caracterizada por uma destruição autoimune irreversível das células β -pancreáticas produtoras de insulina, e o diabetes tipo II, caracterizado por uma insuficiência na produção de insulina pelas células β -pancreáticas e uma resistência do organismo à insulina (ADA, 2012).

O diabetes é uma doença crônica que afeta cerca de 366 milhões de pessoas no mundo, com projeções de que aumente para 522 milhões em 2030 (IDF, 2011). O diabetes tipo I representa cerca de 5-10% dos casos totais de diabetes e, apesar de atingir qualquer faixa etária, é preferencialmente desenvolvida por crianças e jovens e, por este motivo, tem sido denominada também de diabetes juvenil. Já o diabetes tipo II

representa cerca de 90-95% dos casos, e é uma doença metabólica associada a fatores genéticos e estilo de vida. Apesar de neste caso estar presente uma variável redução da produção de insulina, diferente do diabetes tipo I, não há destruição das células β -pancreáticas. Seu desenvolvimento é fortemente influenciado por uma dieta hipercalórica e estilo de vida sedentária (ADA, 2012; revisto em DUNMORE, S.J. & BROWN, J.E.P., 2013).

1.5.1 - Diabetes Autoimune

O diabetes autoimune (T1D) é uma doença multifatorial, onde a combinação de fatores genéticos e ambientais predispõe para a doença (ATKINSON, M.A. & EISENBARTH, G.S., 2001; BACH, J.F., 1994). É a mais prevalente doença crônica entre as crianças, e sua incidência tem aumentado de forma significativa em todos os países pesquisados (ONKAMO, P. et al, 1999). Em países como a Finlândia, a incidência do diabetes tipo I chega a ser de 57 para cada 100.000 habitantes (IDF, 2011). Apesar disto, não há cura nem meios de prevenção, e a injeção de insulina, junto a uma dieta controlada com monitoração de hábitos de vida é o tratamento mais comum para controlar esta doença (TODD, J.A. et al, 2011).

Eisenbarth, em 1986, estagiou o desenvolvimento do diabetes autoimune da seguinte maneira: predisposição genética, desenvolvimento de autoimunidade, produção de uma série de auto-anticorpos, perda de função das células β -pancreáticas, estabelecimento do diabetes e total destruição das células β -pancreáticas com dependência de insulina (EISENBARTH, G.S., 1986).

O diabetes autoimune é uma doença de etiologia primariamente genética. De fato, estudos feitos na Finlândia mostram que a concordância da doença entre gêmeos monozigóticos é de 27%, contra 3,8% entre gêmeos dizigóticos (HYTTINEN, V. et al, 2003). Estudos posteriores mostram que esta concordância entre gêmeos monozigóticos é ainda maior quando os pacientes são analisados por longos períodos, superando 65% dos casos (REDONDO, M.J. et al, 2008). O maior fator de risco para o desenvolvimento de T1D reside na região HLA do cromossomo 6p21, e os haplótipos

DRB1*04-DQB1*0302 e DRB1*03 estão presentes em pelo menos 90% dos casos (revisto em TODD, J.A., 2010). Contudo, mutações em muitos outros genes fora do complexo MHC tem sido identificados como fatores de risco. Estudos de associação genômica ampla mostram que 41 regiões gênicas se correlacionam com a doença, entre os quais genes para o CTLA4, PTPN22, IL2R α , IL-10, IL-19, IL-20, GLIS3, CD-69, IL-27 e IFIH1/MDA5 (WTCCC, 2007; BARRET, J.C. et al, 2009).

O diabetes autoimune (T1D) não é entretanto uma doença puramente genética, e fatores ambientais parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento da doença em indivíduos predispostos geneticamente. Evidências que suportam esta hipótese incluem a penetrância da doença entre gêmeos monozigóticos (REDONDO, M.J. et al, 2008), a observação que países vizinhos como Finlândia e Estônia apresentarem incidência da TD1 muito discrepantes apesar do fundo genético similar (BACH, J.F., 1994) e o dramático aumento da sua incidência nos últimos anos, muito superior à capacidade de mudança na estrutura genética populacional (revisto em KNIP, M. et al, 2005; SONGINI, M. & MUNTONI, S. 1991). Estudos estão sendo feitos na tentativa de identificar estes fatores ambientais que modulam a indução da T1D.

O diabetes tipo I se caracteriza patologicamente por um infiltrado monocítico nas ilhotas de Langerhans (insulite). Há destruição seletiva das células β -pancreáticas, sendo que as células produtoras de glucagon e somatostatina não são afetadas. Anticorpos contra insulina, GAD (do inglês, *glutamic acid decarboxylases*) e IA-2 (tirosina fosfatase) estão presentes e podem ser detectados antes do estabelecimento da hiperglicemia, servindo como método de diagnóstico pré-clínico (BINGLEY, P.J. et al, 2006). Entretanto a presença destes anticorpos são eventos secundários a uma insulite já estabelecida (TODD, J.A. et al, 2011). De fato, as principais populações envolvidas na destruição das ilhotas pancreáticas são as células T. Linfócitos T CD8+ são abundantes na insulite, e a transferência experimental destas, juntamente com células T CD4+, é por si só capaz de eficientemente induzir o diabetes em animais NOD.*scid* (WANG, B, et al, 1996)

1.5.2 - O Modelo NOD

Para que seja possível inferir ao homem os resultados obtidos em modelo animal, diversos aspectos, como por exemplo a etiologia e patologia da doença, devem ser semelhantes entre eles (revisto em CHATZIGEORGIOU, A. et al, 2009). Sob este ponto de vista, dos vários modelos animais para estudo do diabetes tipo 1 que tem sido desenvolvidos, o modelo de camundongos NOD é um dos que apresenta maiores similaridades.

A linhagem de camundongos NOD (do inglês, *non-obese diabetic*) foi desenvolvida por Susumo Makino e colaboradores, a partir de cruzamentos consanguíneos entre camundongos da linhagem JcI:ICR (também conhecidos como Swiss), na tentativa de obter uma linhagem para estudo da catarata (MAKINO, S. et al, 1980). Desde então tem-se observado que possui diversas similaridades com o caso humano, como por exemplo o fato do diabetes em animais NOD desenvolve-se espontaneamente durante a fase juvenil. A insulite pode ser observada já a partir da terceira semana, enquanto a hiperglicemia se estabelece a partir do terceiro mês de vida, do mesmo modo que o diabetes tipo I em humanos é diagnosticado geralmente durante a infância e juventude. Contudo, diferente do caso humano, onde a penetrância é igual entre homens e mulheres, em animais NOD a proporção de fêmeas que desenvolvem o diabetes é maior (entre 60 a 80%) que em machos (20 a 30%) (revisto em ANDERSON, M.S. & BLUESTONE, J.A., 2005). Isto parece ser decorrente, entretanto, de diferenças na microbiota intestinal, uma vez que em condições livres de germes a incidência é igual entre as linhagens (MARKLE, J.G.M. et al, 2013). Somado à hiperglicemia, outros sintomas típicos do diabetes estão também presentes nos animais NOD, como glicosuria, polidipsia, poliúria e cetoacidose, embora esta última se dê de forma bastante branda (revisto em CHATZIGEORGIOU, A. et al, 2009). Além do diabetes os animais NOD desenvolvem outras manifestações autoimunes, como tireoidite e síndrome de Sjogren (ROEP, B.O. et al, 2004).

Dados imunopatológicos do caso humano são em geral escassos, e os estudos são normalmente realizados em sangue periférico e análises cadavéricas. Alguns desses estudos em humanos mostraram que a insulite predomina nas ilhotas com uma presença maior de células β (produtoras de insulina), e é composta de linfócitos T CD8, T CD4,

células B e macrófagos, características estas que também estão presentes no modelo do NOD (WILLCOX, A. et al, 2009). Estudos neste modelo animal mostram que o desenvolvimento da diabetes tipo I depende das células T CD4 e CD8, uma vez que ambas as populações são necessárias para transferir o diabetes a animais singênicos imunodeficientes (PHILLIPS, J.M. et al., 2009). A destruição das células β mediada por estes linfócitos pode envolver a morte direta através do reconhecimento de auto-antígenos ligados a MHC de classe I por populações T CD8, bem como a indução de apoptose através da expressão de FAS nas células β mediada por citocinas produzidas por linfócitos T, como por exemplo o $\text{IFN}\gamma$. A iniciação da apoptose pode se dar mediante sinalização induzida pelo FASL expresso em células T ativadas (revisto em LEHUEN, A. et al, 2010). Além disso, o $\text{IFN}\gamma$ produzido por estes linfócitos podem também ativar macrófagos, induzindo-os a produzirem citocinas pró-inflamatórias como o $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$, bem como radicais livres de oxigênio, que possuem papel deletério sobre as células β pancreáticas (ARNUSH, M. et al., 1998; DAHLEN, E. et al., 1998). Os auto-antígenos comuns ao modelo NOD e ao humano que têm sido identificados como alvos da resposta celular incluem a insulina, GAD65, G6PC2 (IGRP), PDX-1, ICA69 e IA-2 (revisto em THAYER, T.C. et al, 2010). Auto-anticorpos também estão presentes, embora nos animais NOD sejam restritos a poucos antígenos, como à insulina por exemplo (BONIFACIO, E. et al, 2001).

Muitos genes no NOD têm sido associados à susceptibilidade à diabetes tipo I e, do mesmo modo que nos humanos, os alelos do MHC desempenham importante papel neste processo. De fato, a presença da molécula de MHC de classe II, o I-Ag7 (H2-Aa^{g7}), bem como a ausência de expressão da H2-Ea são críticas para o desenvolvimento do diabetes nestes animais. De fato, a substituição congênita de haplótipo H2-Aa^{g7} por outro, como o H2^{b} da linhagem C57BL/6, previne o desenvolvimento do diabetes em animais NOD (YUI, M.A. et al, 1996; MCALEER, M.A. et al, 1995). O haplótipo I-Ag7 compartilha homologia com o alelo HLA-DQB1, o qual por sua vez está relacionado à diabetes no homem (ACHA-ORBEA, H. et al, 1987). Entretanto, a introdução do alelo I-Ag7 em animais C57BL/6 por si só não induz doença nestes, de modo que outros genes participam na susceptibilidade à diabetes (YUI, M.A. et al, 1996). De fato, mais de 20 locus gênicos que contribuem para o desenvolvimento do diabetes foram identificados em animais NOD. Muitos deles contém genes como o Ctl-

4, I12 e Ptpn22, cujas mutações também têm sido relacionados ao caso humano (revisto em LEHUEN, A. et al, 2010; BARRET, J.C. et al, 2009).

Fatores ambientais também influenciam no desenvolvimento do diabetes em animais NOD. Diferentes terapias ou infecções com diferentes patógenos têm sido descritos como capazes de inibir o desenvolvimento da doença (revisto em ATKINSON, M.A. & LEITER, E.H., 1999). Em animais NOD, a infecção com bactérias, protozoários ou helmintos normalmente tendem a inibir o desenvolvimento da doença, enquanto infecções por vírus têm sido descritos como capazes de inibir ou acelerar, dependendo da espécie envolvida (revisto em COOKE, A., 2009 e em LEHUEN, A. et al, 2010). No homem entretanto, o desenvolvimento do diabetes parece ser menos susceptível a infestações por helmintos (BAGER, P. et al, 2012), embora haja grande carência de estudos abordando este tema, de modo que não se pode inferir o quão o modelo NOD se assemelha ao humano neste aspecto.

1.6 - A DOENÇA DE CHAGAS E MODELOS EXPERIMENTAIS

A Doença de Chagas, tripanossomíase assim denominada em referência a seu descobridor, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, C., 1909). A Organização Mundial de Saúde estima que 10 milhões de pessoas estejam infectadas por este protozoário, a maioria na América Latina onde é endêmica, e que outros 25 milhões apresentem risco potencial de infecção (WHO, 2010).

A fase aguda da Doença de Chagas sucede a infecção e se prolonga por 6 a 8 semanas, sendo normalmente assintomática. Há óbito em 2,8% dos casos durante este período, normalmente crianças, ou adultos cuja infecção se deu por uma carga parasitária muito elevada, como a que ocorre nos casos por infecção oral (PEREIRA, K.S. et al., 2009). Não sendo tratado, praticamente todos os casos remanescentes evoluem para a fase crônica indeterminada, onde há uma persistência parasitária, mas sem sintomas clínicos. Durante esta fase crônica indeterminada os infiltrados inflamatórios no coração são mínimos, e os pacientes não apresentam alterações dos

sinais eletrocardiográficos (ANDRADE, Z.A., 1999). Entretanto 30-40% dos casos indeterminados evoluem para a forma crônica cardíaca, caracterizado por uma persistente miocardite que culmina em insuficiência cardíaca, ou forma digestiva, esta última caracterizado pelo desenvolvimento de megas no cólon ou esôfago (PRATA, A., 2001).

O que leva a esta transição do quadro crônico indeterminado ao crônico cardíaco não está ainda definido. Fatores autoimunes desencadeados pela resposta ao parasita (DOS SANTOS, R.R. et al., 1992), bem como uma hipersensibilidade do sistema imune à antígenos persistentes do parasita (ANDRADE, Z.A. et al., 1987), podem estar relacionados à manutenção da lesão crônica do tecido cardíaco. Já a forma digestiva acontece devido à destruição da inervação entérica autônoma, produzindo uma deficiência na mobilidade e conseqüente disfunção do sistema digestivo. As principais anormalidades que estão presentes são o megacólon e o megaesôfago em seres humanos (revisão em WHO, 2002).

Vários animais, envolvendo cães, cobaias, macacos, ratos, camundongos e coelhos têm sido utilizados para estudo da doença de Chagas. Normalmente, a escolha do modelo experimental é feita levando-se em conta o problema a ser investigado e o conhecimento prévio das potencialidades de sua resposta (revisão em ANDRADE, S.G., 2000). De todos os modelos, o camundongo é, sem dúvida, o mais utilizado. O estudo sistemático realizado em diferentes linhagens infectadas pelo *T. cruzi* demonstrou incidência de lesões crônicas, inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco semelhantes àsquelas da doença humana (revisão em ANDRADE, S.G., 2000). Além do mais, o camundongo é um modelo animal bem estabelecido cujo genoma já foi mapeado, apresentando até 90% de similaridade genética com o humano (WATERSTON, R.H. et al., 2002). Muitas linhagens têm sido desenvolvidas com o objetivo de investigar mais profundamente o sistema imune, incluindo camundongos isogênicos, transgênicos e *knock out* para variados genes. Por fim, existe também uma grande quantidade de reagentes biotecnológicos desenvolvidos para estes animais que permitem estudar, entre outras coisas, os vários tipos celulares e suas moléculas de superfície e intracelulares.

Nos estudos experimentais é importante estabelecer com acurácia a relação parasito-hospedeiro, a qual depende não só da linhagem do camundongo, mas também

do tipo do parasito. Na fase aguda da doença, as características da cepa utilizada podem levar a evoluções diferentes. Esta característica pode culminar na morte precoce dos animais, quando infectados por cepas do biotipo Tipo I, ou permitir uma sobrevivência mais longa, como ocorre com cepas dos biotipos Tipo II e III (ANDRADE, V. et al., 1985; ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

1.6.1 - Resposta Imune ao *T. cruzi*

A resposta imune responsável pelo controle dos índices parasitêmicos do *T. cruzi* envolve múltiplos mecanismos, em especial a resposta celular. A invasão de diversos tipos celulares pelo *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam uma resposta inata contra o parasita. Análise de transcriptoma em fibroblastos mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* induz alteração na expressão de pelo menos 106 genes, incluindo indução de IFN β (VAENA DE AVALOS, S. et al, 2002). Macrófagos e células dendríticas, através de ligantes de PAMPs, como o TLR9 e TLR2, reconhecem componentes do *T. cruzi* e iniciam a resposta celular mediada por IL-12 (BAFICA, A. et al, 2006). A IL-12 induz células NK a produzirem IFN γ , o qual, juntamente com o TNF α , ativa os mecanismos microbicidas do macrófago. Entre eles está a produção de moléculas reativas de oxigênio, como o NO e peroxinitrito, em decorrência da indução da síntese de iNOS após estimulação com IFN γ (CARDILLO, F. et al, 1996; ALIBERTI, J.C. et al, 1996). O TNF α , citocina associada à promoção da inflamação tecidual é encontrada no soro de animais BALB/c infectados com *T. cruzi* já a partir do quinto dia pós infecção, enquanto IFN γ só é verificado no soro a partir do 15º dia (REVELLI et al, 1999). Entretanto Cardillo e colaboradores verificaram que o IFN γ já pode ser encontrado em sobrenadante de cultura de esplenócitos 48 horas após estimulação com o *T. cruzi*, e que esta produção tão precoce é dependente de células NK. Verificaram também a importância da produção inicial desta citocina para o controle da parasitemia, uma vez que o tratamento com anti-IFN γ no quarto ou oitavo dias pós-infecção confere uma susceptibilidade aumentada aos animais infectados (CARDILLO, F. et al, 1996). De modo semelhante, Minoprio e colaboradores observaram que a presença, já no quarto dia pós-infecção, de mRNA para IFN γ em esplenócitos correlacionava com a resistência ao parasita (MINOPRIO, P. et al, 1993).

Dependendo do sistema, estas alterações iniciais que sucedem a infecção podem ser relativamente deficientes e incapazes de controlar a expansão parasitária. As análises do transcriptoma de fibroblastos mostra que as alterações induzidas pela invasão do *T. cruzi* são relativamente atrasadas quando comparado com outros patógenos intracelulares, como o *Toxoplasma gondii* e o citomegalovírus humano (VAENA DE AVALOS, S. et al, 2002). Além disso, apesar de haver indução do IFN β , esta citocina não parece ser efetiva no combate ao parasita, uma vez que animais *knockout* para o receptor de interferons do tipo I (IFNAR $^{-/-}$) apresentam maior resistência que animais selvagens (CHESSLER, A.D. et al, 2011). Por fim, apesar de haver reconhecimento de PAMPs por fagócitos, estudos apontam para uma ativação insuficiente de TLRs em resposta ao *T. cruzi* (PADILLA, A.M. et al, 2009).

A imunidade inata tem uma pequena capacidade de limitar a expansão do *T. cruzi*, mas é somente com o estabelecimento de uma imunidade adquirida que os níveis parasitêmicos podem efetivamente ser controlados. Neste cenário, células T CD4 e T CD8, merecem destaque especial. De fato, animais *nude* (animais desprovidos de linfócitos T CD4 e T CD8) não são capazes de controlar a infecção pelo *T. cruzi* e morrem precocemente devido a uma exagerada carga parasitária (KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKI, M. M., 1979). Em um outro trabalho, utilizando-se de animais deficientes para CD4 ou CD8, Rottenberg e colaboradores (1993) confirmaram a importância de tais células, visto que estes animais apresentavam uma susceptibilidade elevada à infecção pelo *T. cruzi* (ROTTENBERG, M.E. et al, 1993). De fato, ambas as células T CD4 e T CD8 estão presentes nos infiltrados inflamatórios que ocorrem na Doença de Chagas controlando a replicação parasitária e, inevitavelmente, de forma direta ou não, induzindo destruição tecidual (SATO, M.N. et al., 1992; DOS SANTOS, R.R. et al., 1992). Tais infiltrados demonstraram ser predominantemente de linfócitos T CD8 no rato (SATO, M.N. et al, 1992) e tanto linfócitos T CD4 como T CD8 em camundongos, dependendo da cepa e do desenho experimental utilizado (ARAUJO, F.G. et al, 1989; DOS SANTOS, R.R. et al., 1992; TARLETON, R.L. et al, 1990).

A importância destas células T CD8 $^{+}$, embora esteja bem fundamentada, parece não ser devido à sua capacidade citolítica via perforina/granzimaB, visto que animais com defeitos neste mecanismo de citotoxicidade não apresentam significativa susceptibilidade ao *T. cruzi* (KUMAR, S. & TARLETON, R.L., 1998). Tais células são mantidas na infecção como células de memória efetora e se expandem rapidamente sob

estímulo, embora a geração inicial de clones específicos contra o *T. cruzi* seja, aparentemente, lenta. A capacidade de produzir $IFN\gamma$ é, provavelmente, a mais importante função desta célula na manutenção do controle da infecção (revisão em MARTIN & TARLETON, 2004) e a manutenção da memória imunológica nesta população celular durante a fase crônica da infecção parece ser dependente de células T CD4+ de memória (NIHEI, 2005).

É importante frisar que o sistema imune humano não consegue eliminar naturalmente o *T. cruzi*, permanecendo este em níveis subpatentes durante toda a fase crônica: negativo ao exame microscópico direto do sangue, mas presente no organismo, conforme demonstra exames mais sensíveis, como o xenodiagnóstico (PORTELA-LINDOSO, A.A. & SHIKANAI-YASUDA, M.A., 2003). Esta persistência parasitária, resultante da impossibilidade de eliminação do parasita pelo organismo hospedeiro, mostra-se decorrente de dois fatores principais: mecanismos de evasão do parasita e mecanismos regulatórios do hospedeiro (DOSREIS, G.A., 2011). Estes mecanismos regulatórios dimensionam da lesão provocada pelo processo inflamatório, de modo a não comprometer a função do órgão e a sobrevivência do hospedeiro (BELKAID, Y. & TARBELL, K., 2009). Alguns destes mecanismos de tolerância periférica começam agora a ser identificados e compreendidos, e entre eles encontra-se o eixo PD-1/PD-L1, as células Treg e as células supressoras de origem mielóide (MDSC).

1.7 - CICLOFOSFAMIDA

A Ciclofosfamida foi sintetizado em 1958 por Arnold e colaboradores e, em 1967 foi confirmado por Brock & Hohorst ser uma excelente substância para uso terapêutico contra tumores (ARNOLD, H. et al., 1958; BROCK, N. & HOHORST, H.J., 1967). A ciclofosfamida por si só é inerte, e necessita ser parcialmente metabolizada para se tornar ativa (FOLEY, G.E. et al., 1961). A Ciclofosfamida é convertida a 4-hidroxíciclofosfamida, por oxidases hepáticas, a qual existe em equilíbrio com a Aldofosfamida. Esta última é então convertida à carboxifosfamida, sem atividade citotóxica relevante, através de sua oxidação pela enzima Aldeído Dehidrogenase (ALDH). Entretanto, em células com baixos níveis de ALDH, a Aldofosfamida é

dissociada espontaneamente a Fosforamida Mostarda (e Acroleína), a qual possui, juntamente com seu derivado, o Nor-N-mostarda, uma elevada atividade citotóxica (CONNORS, T.A. et al., 1974; BROCK, N., 1996).

A atividade citotóxica dos metabólitos da Ciclofosfamida está intimamente relacionada ao radical-N-mostarda. Ele é capaz de formar ligação cruzada entre as cadeias de DNA, levando principalmente as células que ciclam rapidamente à morte (BROCK, N., 1996). Esta propriedade de matar preferencialmente células com baixos níveis de ALDH e/ou que ciclam rapidamente dá à Ciclofosfamida um enorme potencial clínico, podendo ser utilizada no tratamento quimioterápico de linfomas e também na imunossupressão. De fato esta droga tem sido utilizada no combate a desordens auto-imunes como o lúpus eritematoso sistêmico, anemia hemolítica auto-imune e na tolerância a transplantes (revisão em BRODSKY, R.A., 2002; UCHIDA, S. et al, 1994). Por exemplo, a pulsoterapia com Ciclofosfamida (por vezes associado a outras drogas) constitui o tratamento padrão para o lúpus eritematoso, isto porque, entre as células que são preferencialmente eliminadas pela ciclofosfamida estão os linfócitos B (ADAMS, A. et al., 2006; GINZLER, E.M. et al., 2005).

Entretanto, além dos linfócitos B, as células Treg parecem ter também uma sensibilidade aumentada à ação da ciclofosfamida. Estudos mostram que a administração de baixas doses desta droga é capaz de eliminar as Treg em preferência às células T convencionais (GHIRINGHELLI, F. et al, 2004). Além de induzir apoptose nestas, afeta sua capacidade de proliferação homeostática, além de diminuir sua atividade supressora através da modulação na expressão de Foxp3 e GITR (LUTSIK, M.E. et al, 2005). Este efeito deletério preferencial sobre as Tregs pode ser a explicação de uma série de estudos realizados a partir da década de 70 mostrando que a ciclofosfamida é capaz de afetar mecanismos supressores do sistema imune. Por exemplo, em 1975, Askenase e colaboradores observaram que a Ciclofosfamida, na dose de 20-30 mg/kg, poderia aumentar dramaticamente a reação de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), mesmo sendo ineficaz em suprimir a síntese de anticorpos (ASKENASE, P.W. et al., 1975). Em estudos posteriores verificou-se que o tratamento de Ciclofosfamida, seguido de inoculação de LPS, era capaz de transitoriamente induzir clones auto-reativos de linfócitos T (L'AGE-STEHR, J. & DIAMANTSTEIN, T., 1978). Tratando cães cronicamente infectados pelo *T. cruzi* com Ciclofosfamida (50 mg/kg) durante 3 semanas, Andrade e colaboradores observaram um aumento na

miocardite destes animais (ANDRADE, Z.A. et al., 1987). Em um interessante modelo que associa a infecção crônica pelo *T. cruzi* com uma atenuação da artrite induzida por adjuvante completo de Freud em ratos, Revelli e colaboradores mostraram que o tratamento com Ciclofosfamida (40mg/kg) 48 horas antes da indução era capaz de restabelecer a artrite nos animais infectados e exacerba-la nos ratos não infectados (REVELLI, S. et al, 1992).

A Ciclofosfamida, em doses próximas àquela utilizada para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico em seres humanos (200-350mg/kg), é capaz de induzir diabetes auto-imune em camundongos NOD, acelerando o aparecimento da doença (HARADA, M. & MAKINO, S., 1984). Também neste modelo, a redução quantitativa das Treg, bem como a diminuição de sua capacidade regulatória, foi a explicação para o fenômeno observado (BRODE, S. et al, 2006). Entretanto, a administração de Ciclofosfamida só é capaz de induzir diabetes em camundongos NOD, sendo ineficaz na indução da doença em outras linhagens (HARADA & MAKINO, 1984). De fato, em um outro modelo experimental de diabetes mellitus, a de ratos BB tratados com 60-175 mg/kg da droga, a Ciclofosfamida foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença. Neste caso reduziu também os níveis de IL-2, IL-12, IFN γ , IL-1beta e TNF α , além de aumentar as quantidades de IL-4 produzidos por esplenócitos (SOBEL, D.O. et al, 2000). Curiosamente, em animais NOD deficientes de IFN γ , a ciclofosfamida tem efeito inverso ao observado em animais selvagens, inibindo o desenvolvimento do diabetes (MORI, Y. et al, 2008).

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Analisar as peculiaridades imuno-fenotípicas de animais NOD relacionadas à proteção ao diabetes induzida pelo *T. cruzi*, bem como a sua aceleração pela ciclofosfamida.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Caracterizar a resposta imune celular de animais NOD à cepa Tulahuen do *T. cruzi*, em comparação à linhagem resistente BALB/c.

-Investigar a capacidade da infecção pelo *T. cruzi* em inibir o desenvolvimento da diabetes em animais NOD.

-Investigar as alterações imunes responsáveis pela proteção à diabetes induzida pela infecção com o *T. cruzi* em animais NOD

-Verificar se tais alterações imunes estão presentes de maneira oposta no modelo de indução da diabetes através do tratamento com ciclofosfamida.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos fêmeas da linhagem NOD, NOD $\beta 2M^{-/-}$ e BALB/c usados nos experimentos foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Osvaldo Cruz. A colônia de animais NOD e NOD $\beta 2M^{-/-}$ têm origem da Universidade de Umea (Suécia), e foram adquiridos através de acordo de transferência de material assinado (MTA) com a Fiocruz, através do prof dr José Mengel.

Os experimentos foram iniciados em animais com 8 a 12 semanas de vida, exceto nos casos de indução por ciclofosfamida. Nestes o desenho dos experimentos exigiu utilizar animais com cerca de 7 meses de vida, período a partir do qual o desenvolvimento espontâneo do diabetes é consideravelmente reduzido.

Os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos em forma de projeto e estão de acordo com os estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA, CPqGM-Fiocruz).

3.2 - PARASITAS

Para os experimentos envolvendo infecção foi utilizado a cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi* como descrito por Cardillo e colaboradores (CARDILLO, F. et al, 2002). Para efetuar a infecção dos grupos experimentais, o sangue de animais previamente infectados foi retirado, os parasitas contados segundo método descrito por Melo & Brener (1978) e a concentração de parasitas ajustada, utilizando como diluente PBS estéril (MELO, R.C. & BRENER, Z., 1978). A inoculação foi realizada por via intraperitoneal.

Os animais foram geralmente infectados com 1000 parasitas. Os casos que não obedeceram tal inóculo estão descritos pontualmente nos resultados.

3.3 - AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

Os níveis parasitêmicos foram avaliados pela contagem, em microscópio óptico, dos parasitas presentes em 50 campos microscópicos (magnitude de 400x) em uma lâmina contendo 5µl de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberta com uma lamínula 22x22 mm, segundo o método descrito por Melo & Brener (MELO, R.C. & BRENER, Z., 1978).

3.4 - AVALIAÇÃO DA GLICEMIA

A avaliação da glicemia foi feita com o auxílio do medidor automático de glicemia Accu-Chek Advantage II (Roche, Suíça), em sangue periférico retirado da cauda. As medições eram feitas durante o dia, uma vez que os camundongos possuem hábitos alimentares preferencialmente noturnos. Animais com glicemia acima de 200µg/dl eram submetidos a nova medição no dia seguinte e, caso confirmasse o valor, eram considerados diabéticos.

3.5 - TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA

Os camundongos foram tratados (via intraperitoneal) com 200-250 mg/kg de Ciclofosfamida (Genuxal, Asta Médica Ltda) administrada em dose única. A droga foi diluída em solução salina estéril momentos antes de sua administração. Para o cálculo da concentração foi utilizado a média de peso dos animais a serem tratados. Os animais controles foram tratados com o mesmo diluente usado como veículo para a Ciclofosfamida.

3.6 - DEPLEÇÃO DE CÉLULAS *in vivo*

A depleção de células Gr1+ *in vivo* foi realizada através da administração de 200µg de anticorpo precipitado proveniente do hibridoma RB6-8C5. O anticorpo foi administrado via intraperitoneal, nos 7º, 9º e 12º dias pós-infecção. Como controle foi utilizado a mesma concentração de imunoglobulina total de rato.

3.7 - OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS *in vivo*

Para obtenção do anti-Gr1, células do hibridoma RB6-8C5 foram expandidas *in vitro* através do cultivo em meio RPMI (Gibco, Grand Island-EUA). Estas células foram então lavadas em PBS estéril e uma quantidade de 5 milhões ou mais foram então injetadas, via intraperitoneal, em animais SCID que haviam recebido, no dia anterior, 0,5 ml de óleo mineral. Após o desenvolvimento de material inflamatório, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e então o líquido ascítico foi drenado. O líquido ascítico foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos, e o *pellet* descartado. O sobrenadante foi então diluído uma vez em solução salina 0,9%, e as imunoglobulinas precipitadas adicionando-se, sob agitação, uma solução de sulfato de amônio saturado (PAGE, M. & THORPE, R. et al, 2002). Um volume total de 35% de sulfato de amônio, em relação ao volume do líquido ascítico diluído, foi adicionado gota a gota. A solução final foi mantida por mais 10 minutos sob agitação, e então deixada para decantar por 8 horas a 4°C. Foi então centrifugada a 2000g por 15 minutos, e o *pellet* (contendo o anticorpo precipitado) foi ressuspenso em solução salina 0,9%. Este foi então dialisado por duas vezes contra solução salina 0,9% e por mais duas vezes contra PBS, utilizando para isto membrana de diálise para exclusão de moléculas com peso molecular inferior a 12000-14000 daltons (GibcoBRL, Grand Island-EUA). Cada diálise foi realizada por 3 horas sob agitação a 4°C, em volume 200 vezes maior que a da solução. A solução foi então esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm, alíquotada e congelada a -70°C até seu uso. O mesmo procedimento de precipitação de imunoglobulinas foi realizado com o soro de rato, para obtenção de imunoglobulina total de rato.

É necessário esclarecer que o líquido ascítico aqui utilizado foi obtido de material estocado por nosso grupo de pesquisa em 2002, na Universidade de São Paulo. A produção deste material de estoque possui data anterior à determinação 11.794/08.

3.8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

Uma vez que a precipitação de proteínas com sulfato de amônio a 35% precipita quase exclusivamente imunoglobulinas (revisto em PAGE, M. & THORPE, R. et al, 2002), a quantificação proteica foi utilizada para inferir na concentração de imunoglobulinas do precipitado.

A determinação da quantidade proteica foi realizada através de método colorimétrico envolvendo o ácido bicinconínico (SMITH et al, 1985), utilizando para isto o BCA Protein Assay Kit (Pierce Thermo Scientific, Rockford-USA). Para tanto, 50 µl do da solução teste, bem como de uma solução padrão contendo uma concentração proteica previamente conhecida de BSA, foram serialmente diluídas em água destilada. A cada diluição foi adicionado, posteriormente, 50µl do reagente comercial, preparado segundo instruções do fabricante (esta solução contém íons cobre, tartarato de sódio e potássio, e ácido bicinconínico tamponadas em meio básico, em concentrações não divulgadas). O produto foi mantido a 37°C por 20 minutos, e a leitura realizado em espectrofotômetro a 490nm (ELX-800, Bio-Tek Instruments).

3.9 - OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS TECIDOS

O músculo esquelético, coração e pâncreas foram retirado com o cuidado de evitar os linfonodos associados a estes órgãos. Eles foram imediatamente colocados em PBS 20% SBF a 4°C, cortados em pedaços pequenos, deixados decantar a 4°C por dois minutos, e o sobrenadante descartado. Os fragmentos foram lavados em PBS a 4°C SBF 20% por mais uma vez, e ressuspensos em meio RPMI (Gibco) 10% SBF contendo 2 mg/ml de colagenase tipo IV (Sigma-Aldrich) e colocado a 37°C por 30-40 minutos,

para dissociação enzimática das células. Foram então centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspensos em PBS gelado e as células mononucleares infiltrantes isoladas através de centrifugação em gradiente de Percoll (Pharmacia, Uppsala-Suécia) 40-80% (detalhadamente descrito em POSTOL, 1999). Estas foram então lavadas em PBS 10% SBF, contadas e marcadas para análise por citometria de fluxo.

Quanto ao baço e linfonodos, estes foram retirados e imediatamente colocados em PBS a 4°C e as células dissociadas forçando cuidadosamente a passagem destas por uma peneira, com a ajuda do êmbolo de uma seringa. As células foram lavadas em PBS gelado (1200rpm, 10 minutos) por três vezes e então marcadas, contadas, e marcadas para análise por citometria de fluxo.

3.10 - OBTENÇÃO DE PBMC PARA CITOMETRIA

Quatro gotas de sangue foram retiradas da cauda de cada camundongo, dispostas em placa de 96 poços com fundo em U heparinizada, e então centrifugados a 2000rpm por 5 segundos, para retirar o plasma. Foi então adicionado 200µl de tampão de lise (cloreto de amônio 155 mmol/L; bicarbonato de sódio 10 mmol/L; EDTA 0.1 mmol/L), e as células mantidas no gelo até lise das hemácias (5 a 10 minutos). As células foram então centrifugadas, o sobrenadante descartado, e feitas duas lavagens com 100µl de PBS SBF 2% azida 0,1%. Por fim, foi feita a marcação de superfície conforme descrito.

3.11 - CONTAGEM DE CÉLULAS

Para a contagem de células, alíquotas da solução foram retiradas e coradas em líquido de Turk (violeta cristal 0,01%; ácido acético 2,5%). A câmara de Neubauer foi então montada com um volume de 10 µl desta solução, e as células contadas em microscópio óptico. O procedimento foi repetido três vezes e a média do valor

encontrado com a contagem multiplicada por 10^4 e pelo fator de diluição, para determinação da quantidade de células por mililitro de solução.

3.12 - CULTURA DE CÉLULAS

Esplenócitos foram obtidos em condições assépticas, lavados em PBS gelado e cultivados (5×10^6 células/ml) em meio RPMI (suplementado com FCS 10%) completo por 48 horas. Após este período o sobrenadante foi colhido e congelado a -70°C até que fossem dosadas as citocinas por ELISA.

No caso da cultura para marcação de citocina intracelular a ser quantificada por citometria de fluxo, 5×10^6 células/ml foram cultivadas na presença de brefeldina A (eBiosciences, San Diego-USA) apenas, ou de brefeldina A e anti-CD3 (clone 2C11) por 8 horas. As células foram então lavadas em PBS a 4°C e dada continuidade à marcação segundo metodologia descrita.

3.13 - CITOMETRIA DE FLUXO

3.13.1 - Marcação de superfície

A marcação de antígenos de superfície para análise em citometria foi feita separando-se dois milhões de células em cada poço da placa (placa de 96 poços com fundo em U). A placa foi então centrifugada a 2000rpm por 5 segundos, e o sobrenadante descartado. Cada poço foi lavado com $100\mu\text{l}$ de PBS SBF 2% azida 0,1%, e então adicionado $20\mu\text{l}$ de FcBlock (anti CD16/32, clone 2.4G2 - BD Biosciences, San Diego-USA) diluído em PBS SBF 2% azida 0,1% e incubado por 5 minutos a 4°C . As células foram novamente lavadas em PBS SBF 2% azida 0,1%, e então adicionado $20\mu\text{l}$ de um dos seguintes anticorpos de marcação conjugados a fluorocromos: anti-CD3 BIO (clone CT-CD3), anti-CD4 FITC (clone CT-CD4), anti-CD4 BIO (clone RM4-5), anti-CD8 α FITC (clone 5H10), anti-CD8 β FITC (clone H35-17.2), anti-CD25 Alexa488

(clone 7D4), anti-CD62L BIO (clone MEL-14), anti-CD44 PE (clone IM7.8.1), anti-CD11b PE (clone M1/70.15), anti-CD11c FITC (clone HL3), anti-Gr1 FITC (clone RB6-8C5), anti-PD1 PE (clone J43), anti-PDL1 BIO (clone MIH5), anti-PDL2 PE (clone MIH5), anti-CD40 PE (clone 1C10), obtidos de BD Biosciences (San Jose-USA), Caltag (Carlsbad-USA) ou eBiosciences (San Diego-USA). As células ficaram incubando com estes anticorpos por 20 minutos a 4°C no escuro. Foram então lavadas por mais duas vezes com 100µl de PBS SBF 2% azida 0,1%, e então diluídas em 400µl de PBS SBF 2% azida 0,1%. A seguir foi feita a leitura em FACSsort (Becton Dickinson, San Diego-USA).

No caso em que as marcações foram feitas com anticorpos biotinizados, foi realizado uma etapa adicional, com a adição de 20µl de estreptavidina-Percep (BD Biosciences, San Jose-USA), após lavagem das células com 100 µl de PBS SBF 2% azida 0,1%.

3.13.2 - Marcação intracelular para citocina

Dois milhões de células provenientes da cultura com brefeldina A foram lavadas em PBS SBF 2% azida 0,1% e colocada em placa com fundo em U para marcação de superfície, conforme descrito acima.

Após isto, as células foram fixadas utilizando-se 100µl de PBS 4% paraformaldeído por 40 minutos em temperatura ambiente. As células foram então lavadas por duas vezes com 100µl de PBS saponina 0,5%, e as citocinas intracelulares marcadas com 20 µl dos seguintes anticorpos diluídos em PBS saponina 0,5%: anti-IFN γ PE (clone XMG1.2) e anti-IL10 PE.(clone JES5-16E3), ambos da BD Biosciences (San Jose-USA). As células ficaram incubando por 40 minutos à temperatura ambiente. Foram então lavadas por duas vezes com PBS saponina 0,5% e por mais uma com PBS SBF 2% azida 0,1%. Foram finalmente diluídas em 400µl de PBS e lidas em FACSsort (Becton Dickinson, San Diego-USA).

3.13.3 - Marcação intranuclear para Foxp3

Após a marcação de superfície, as células foram fixadas com 100µl de Mouse Foxp3 Fixation Buffer (BD Pharmingen, San Diego-USA), por 30 minutos a 4°C no escuro. As células foram então lavadas por duas vezes em Mouse Foxp3 Permeabilization Buffer (BD Pharmingen, San Diego-USA), através de centrifugação a 2000rpm por 5 segundos, e incubados com 20µl do anticorpo anti-Foxp3-PE (clone FJK-16s, eBiosciences, San Diego-USA) por 60 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, as células foram lavadas por duas vezes com 100µl de Mouse Foxp3 Permeabilization Buffer (BD Pharmingen, San Diego-USA) e por mais uma vez com 100µl de PBS, diluídas em 400µl de PBS, e então foi feita sua leitura em FACSsort (Becton Dickinson, San Diego-USA).

3.14 - SEPARAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

O baço de animais infectados foi retirado e divulsionado em PBS gelado, e suas células contadas conforme aqui já descritos. A concentração celular foi então ajustada para 50 milhões de células a cada mililitro de PBS SBF 2% azida 0,1%, e então adicionado FcBlock (clone 2.4G2) por 5 minutos. As células foram então lavadas uma vez em PBS SBF 2% azida 0,1% (1200rpm por 10 minutos a 4°C), ressuspendido em PBS SBF 2% azida 0,1% e então adicionado o anticorpo RB6-8C5 FITC, incubando por 30 minutos a 4°C no escuro. As células foram então novamente lavadas em PBS SBF 2% azida 0,1% por duas vezes, a 1200rpm por 10 minutos a 4°C, e ressuspendidas em PBS 0,5% formol, por 60 minutos no escuro à temperatura ambiente. Finalmente as células foram novamente lavadas em PBS, sua concentração ajustada para 50 milhões de células por mililitro e então a população Gr1+ separada positivamente utilizando o FACSaria (BD Biosciences, San Diego-USA).

A pureza celular foi determinada retirando-se uma amostra das células sorteadas, e calculando a porcentagem de células FITC+ após leitura no FACSsort (BD Biosciences, San Diego-USA).

3.15 - ANÁLISE CITOLÓGICA

As células FITC+ obtidas após separação foram centrifugadas e então ressuspensas em SBF, na concentração de um milhão de células por 100 μ l. Foram feito então esfregaço em lâmina utilizando 50 μ l desta solução. A lâmina foi deixada para secar ao ar, e então fixadas na lâmina utilizando metanol.

As células foram então coradas utilizando-se o método de Romanowsky (as lâminas foram mergulhadas em soluções de Triarilmetano a 0,1%, Xantenos a 0,1% e Tiazinas a 0,1%, por 5 segundos cada). A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz, e as fotografias feitas em aumento de 400x.

O mesmo procedimento foi utilizado com sangue periférico de animais normais, para obtenção de fotografia de exemplares padrão de polimorfonucleares, monócitos e linfócitos murinos.

3.16 - *SOFTWARES* USADOS NO PROCESSAMENTO DOS DADOS

A análise dos dados obtidos de citometria foi feita com o auxílio do software Flowjo (Tree Star).

A conversão dos dados em gráficos para apresentação dos resultados foi feito através do *software* Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.17 - ELISA

A produção de interleucina (IL)-10, IL-17 e IFN γ pelos esplenócitos foi avaliada no sobrenadante de cultura através do ensaio de ELISA “duplo-sandwich”, utilizando para captura, os seguintes anticorpos monoclonais: rato anti-camundongo INF- γ (clone

37801.11, 37875.11), anti-camundongo IL-10 (clone JES052A5) e anti-camundongo IL-17 (clone 50101.11), obtidos da R&D Systems (Minneapolis-USA). Estes anticorpos foram diluídos em PBS, e 50µl adicionados em cada poço de uma placa de fundo chato de alta aderência (Nunc MaxiSorp 96 wells), e deixados por 8 horas na geladeira para que fossem adsorvidos pela placa. Foi posteriormente adicionado a cada poço 150µL de PBS contendo 5% (p/v) de proteínas (caseína) do leite desnatado (Molico-Nestlé) e incubado por 1 hora a 4°C. Este passo tem como objetivo o bloqueio de ligações inespecíficas, através da ação da caseína presente no leite. Após a incubação, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20 e as amostras aplicadas em volume de 100 µL por poço. A curva da citocina recombinante foi realizada através de diluições seriadas, a partir de 50 ng/ml. A citocina recombinante foi diluída em PBS contendo 0,1% (p/v) de BSA (Albumina bovina - Sigma). Após esses passos, a placa foi então incubada por no mínimo 12 horas a temperatura de 4°C. Na fase final do procedimento, a placa foi lavada por 4 vezes com PBS acrescido de 0,05% (v/v) Tween 20. Adicionou-se em seguida 50µl de anticorpo anti-citocina específica biotilado, diluído em PBS-0,05% Tween 20, seguindo-se de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 µL/poço de Streptoavidina conjugada a Peroxidase na diluição de 1:4000, diluída em PBS, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. No final do processo, a reação foi revelada com 50µL/poço de solução reveladora contendo 10ml de tampão citrato 0,1M (pH 5.0), 3µL de H₂O₂ (0,3% v/v) e 5 mg de OPD, no volume de 50 µl por poço. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de 50µl/poço de ácido Sulfúrico (H₂SO₄) na concentração de 4N. Em seguida, a placa foi submetida à quantificação através do leitor de ELISA, com o comprimento de onda de 490 nm.

Os seguintes anticorpos purificados foram utilizados, no procedimento acima, para a detecção da citocina específica: BIO anti-camundongo IFN γ , BIO anti-camundongo IL-17 e BIO anti-camundongo IL-10, todos da R&D Systems, Minneapolis-USA. Já as seguintes interleucinas recombinantes foram utilizadas nas curvas padrões: rIL-10, rIL17 e rIFN γ (Pharmlingen, San Diego, CA).

3.18 - TESTES ESTATÍSTICOS:

Para verificar a normalidade da distribuição amostral, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, através do software IBM SPSS Statistics (IBM). As amostras que apresentaram distribuição normal foram comparadas através do teste t Student bilateral. Caso contrário, seria utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados relevantes.

Para análise da progressão da mortalidade e do diabetes, foi utilizado o teste log-rank (Mantel-Cox), através do software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 - RESULTADOS - PARTE 1

4.1.1 - Animais NOD são mais suscetíveis à cepa Tulahuen do *T. cruzi* que animais BALB/c.

Os animais NOD possuem um background genético propenso ao desenvolvimento de doenças e manifestações autoimunes e, até o presente momento, não há trabalho publicado sobre a resposta desta linhagem frente a uma infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudando o curso da infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi* nestes animais no período que antecede o desenvolvimento do diabetes, observamos que estes apresentam uma mortalidade em torno de 25% durante a fase aguda. Isto é significativamente maior que os animais BALB/c, os quais são resistentes à cepa Tulahuen e não morrem durante esta fase (Figura 1).

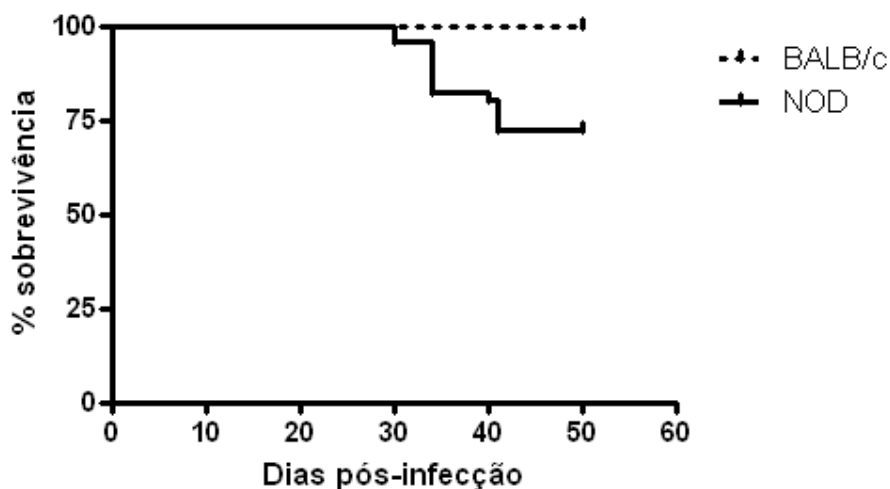


Figura 1: **Mortalidade dos animais NOD e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*.** O inóculo utilizado foi de 1000 formas tripomastigotas sanguíneas. $p=0,009$ obtido pelo teste log-rank. Dados representativos de dois experimentos, com 20 animais em cada grupo.

Esta maior susceptibilidade dos animais NOD pode ser observada também através dos índices parasitêmicos do sangue periférico (Figura 2). Este é significativamente maior que em animais BALB/c, chegando a alcançar no pico, aos 28 dias pós-infecção, a média de quase 1600 parasitas por μl de sangue, enquanto nos animais BALB/c não ultrapassam o número 400 durante todo o curso da infecção.

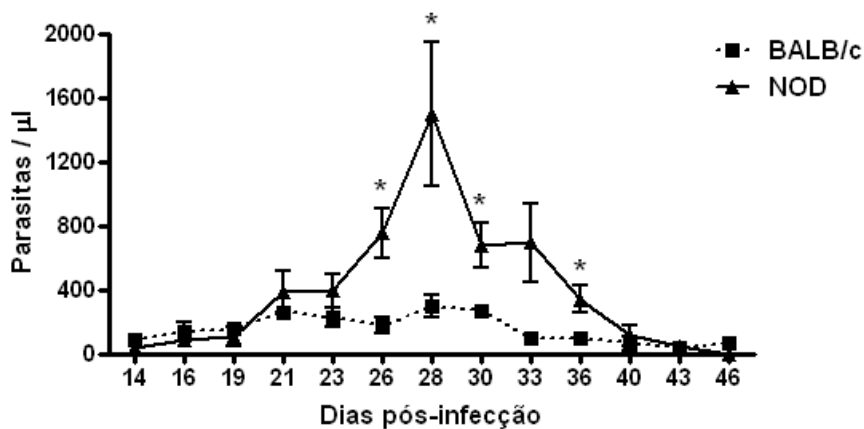


Figura 2: Índices parasitêmicos no sangue periférico de animais infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. O inóculo utilizado foi de 1000 formas tripomastigotas sanguícolas. * $p < 0,05$ teste t Student. Barras representam erro padrão da média. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

4.1.2 - A maior susceptibilidade de animais NOD se relaciona a uma menor expansão de células T CD8+, em especial, de células efetoras.

Procurando identificar os fatores que respondem pela maior susceptibilidade em animais NOD, fizemos inicialmente a contagem da celularidade esplênica destes animais. Observamos que os animais NOD exibem uma expansão celular expressivamente diminuída no início da fase aguda, aos 20 dias pós infecção, quando comparado com animais BALB/c (Figura 3).

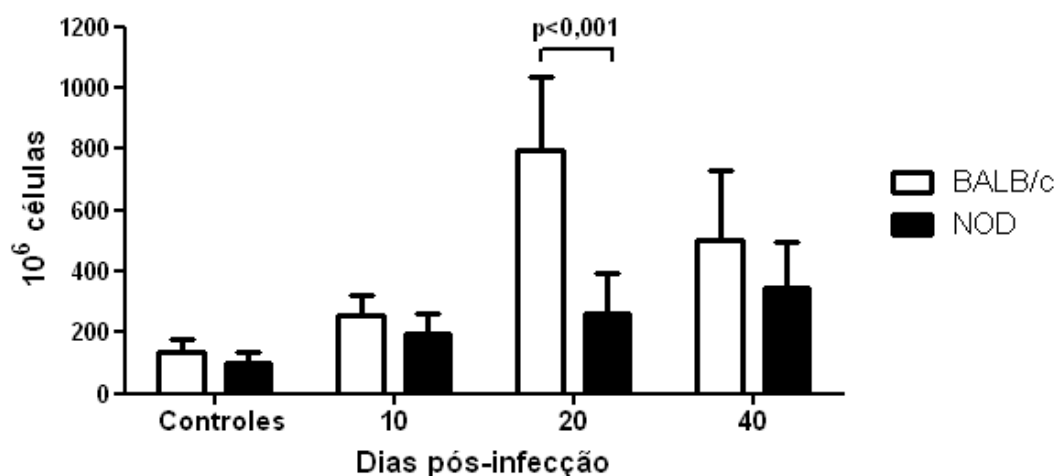


Figura 3- Contagem das células nucleadas do baço de animais NOD e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Teste t Student. Barras representam o desvio padrão. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

A quantificação, por citometria de fluxo, das principais populações linfocitárias responsáveis pela resposta celular mostrou que em animais BALB/c há uma expansão preferencial de linfócitos T CD8+, durante o curso da infecção aguda, em detrimento das células T CD4+ (Figura 4C). Esta expansão se dá em tal magnitude que, a partir do 20º dias pós-infecção, foram calculados mais que o dobro de células T CD8+ em animais BALB/c, quando comparado a animais NOD (Figura 4A).

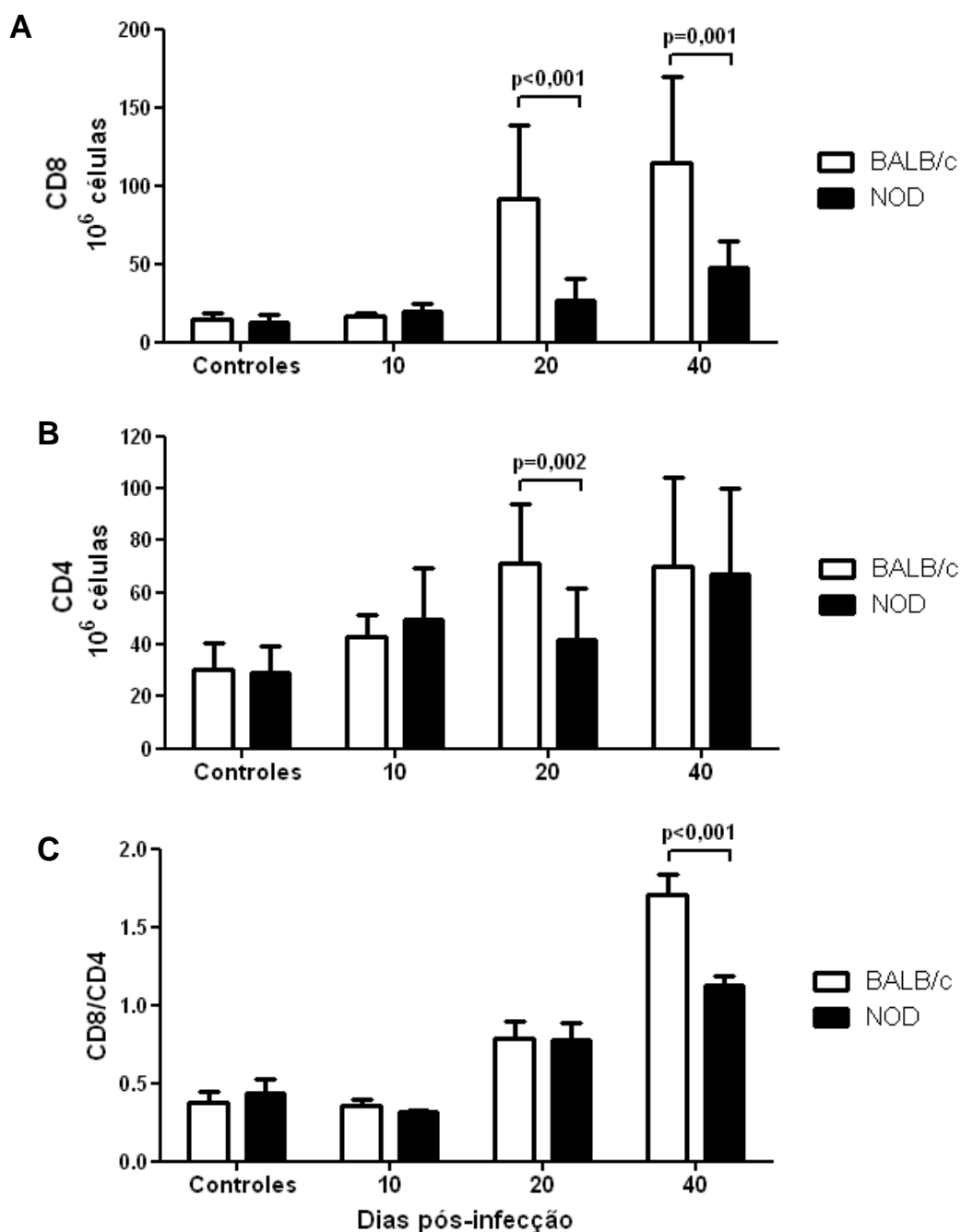


Figura 4 - Números de células CD8 e CD4 presentes no baço de animais BALB/c e NOD infectados pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. A) número de células CD8; B) número de células CD4; C) Proporção entre células CD8 e CD4. Barras representam o desvio padrão. Valores de p obtidos através do teste t Student. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

Ao analisar o perfil de ativação destas células CD8, observamos uma discrepância expressiva na população de células efetoras (células que não expressam o CD62L) entre animais BALB/c e animais NOD (Figura 5). Estas células que partem dos órgãos linfóides secundários em direção ao tecido para efetuar a resposta celular encontra-se bastante aumentada em animais BALB/c a partir do vigésimo dia pós-infecção. Em animais NOD, entretanto, este aumento é muito inferior àquele observado em animais BALB/c (Figura 5).

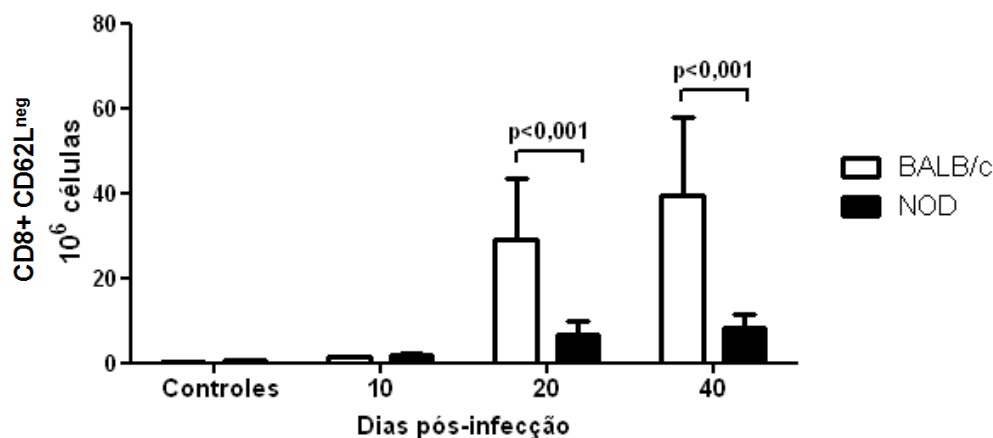


Figura 5. **Animais BALB/c desenvolvem uma resposta efetora de células CD8 muito mais intensa que animais NOD.** O gráfico mostra os números de células CD8+CD62L^{neg} encontrado no baço de animais infectados pelo *T. cruzi*. Valores de p encontrados através do teste t Student. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

Esta massiva expansão de células T CD8+ com fenótipo efetor observado no baço de camundongos BALB/c reflete em uma maior presença de células T CD8 nos sítios inflamatórios do músculo esquelético destes animais (Figura 6). Em animais NOD, por sua vez, a predominância é de células T CD4.

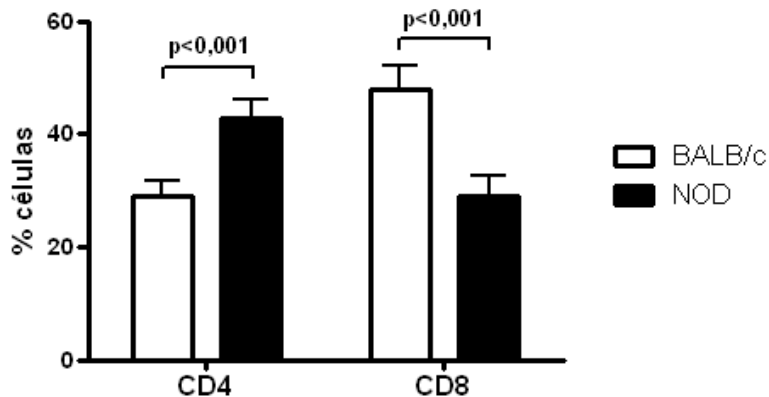


Figura 6. **Porcentagem de linfócitos T CD4 e CD8 entre as células que infiltram o músculo esquelético de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.** Análise feita no 40º dia pós-infecção. Barras representam o desvio padrão. O teste t Student foi utilizado para comparar as amostras. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.1.3 - O perfil de produção de citocinas diverge entre animais BALB/c e NOD.

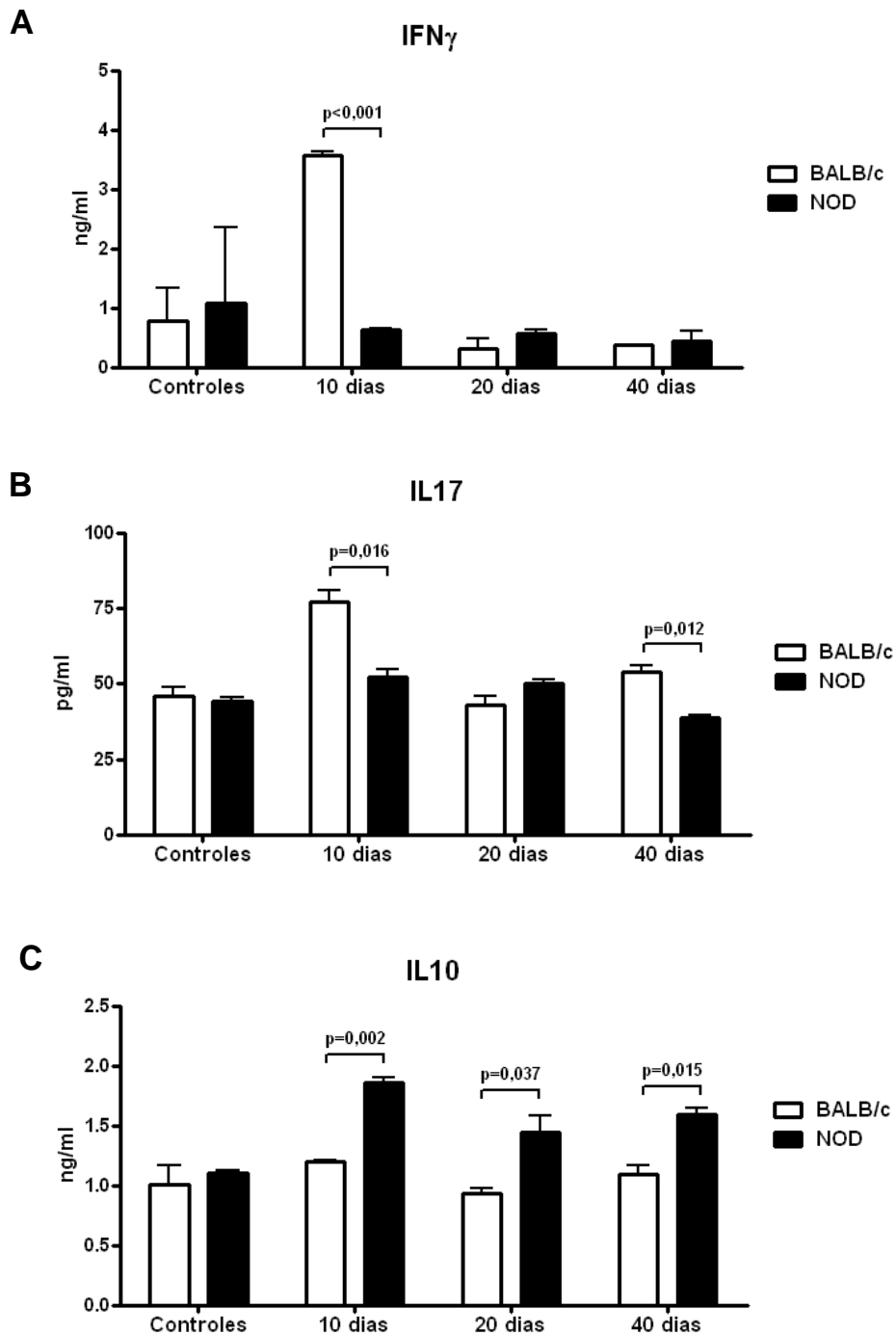


Figura 7. Produção de citocinas por esplenócitos em cultura. Níveis de IFN γ (A), IL 17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante após 48h de cultura, sem estímulo. Citocinas dosadas pelo método de ELISA. Barras representam o desvio padrão e os valores de p foram obtidos através do teste t de Student.

O perfil de citocinas produzido por esplenócitos em cultura mostra que há uma produção precoce de citocinas pró-inflamatórias, com elevados índices de produção de $\text{IFN}\gamma$ e IL-17 já no décimo dia pós infecção, em animais BALB/c (Figura 7A e 7B). Esta elevada produção inicial pode estar propiciando o controle inicial da parasitemia, contribuindo para a resistência do animal. Em animais NOD, por sua vez, há uma produção predominante da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 7C).

Entretanto, a análise da produção de citocinas por células que infiltram o coração e músculo esquelético aos 40 dias pós-infecção, mostram que uma maior proporção das células T CD4^+ e CD8^+ estão produzindo $\text{IFN}\gamma$ em animais NOD que em animais BALB/c (Figura 8). Isto pode ter se dado devido ao controle ineficiente do parasitismo nestes animais (Figura 2), e que pode estar culminando em uma maior lesão tecidual e mortalidade (Figura 1).

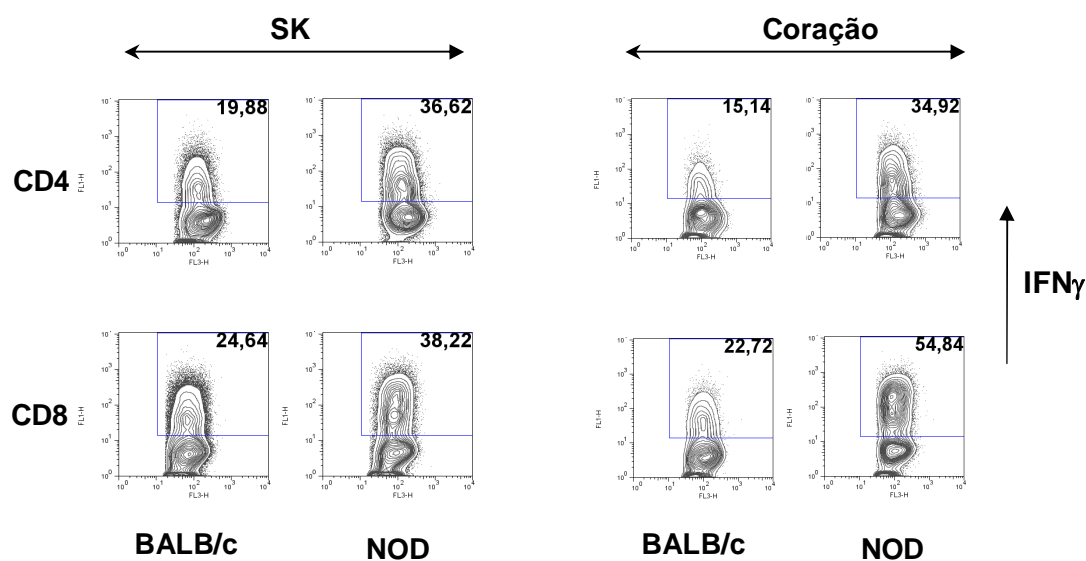


Figura 8. Produção de $\text{IFN}\gamma$ por células T inflamatórias do músculo esquelético (SK) e coração, 40 dias após a infecção. Número representa a porcentagem das células CD4 ou CD8 produzindo $\text{IFN}\gamma$. Animais infectados pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.1.4- Animais BALB/c apresentam números maiores de células Treg que animais NOD, e esta relação se mantém durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

A análise das células Treg (Foxp3+CD25+) mostra que animais NOD normais possuem quantidades significativamente menores destas células no baço, quando comparado a animais BALB/c. Embora esta relação não se altere com o curso da infecção, há um progressivo aumento nos números destas células até o vigésimo dia, após o qual, há uma drástica redução para valores significativamente inferiores aos encontrados em animais controles (Figura 9).

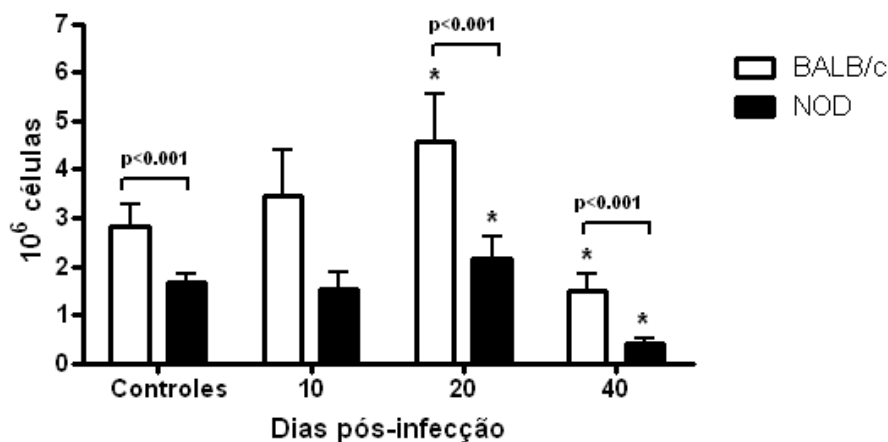
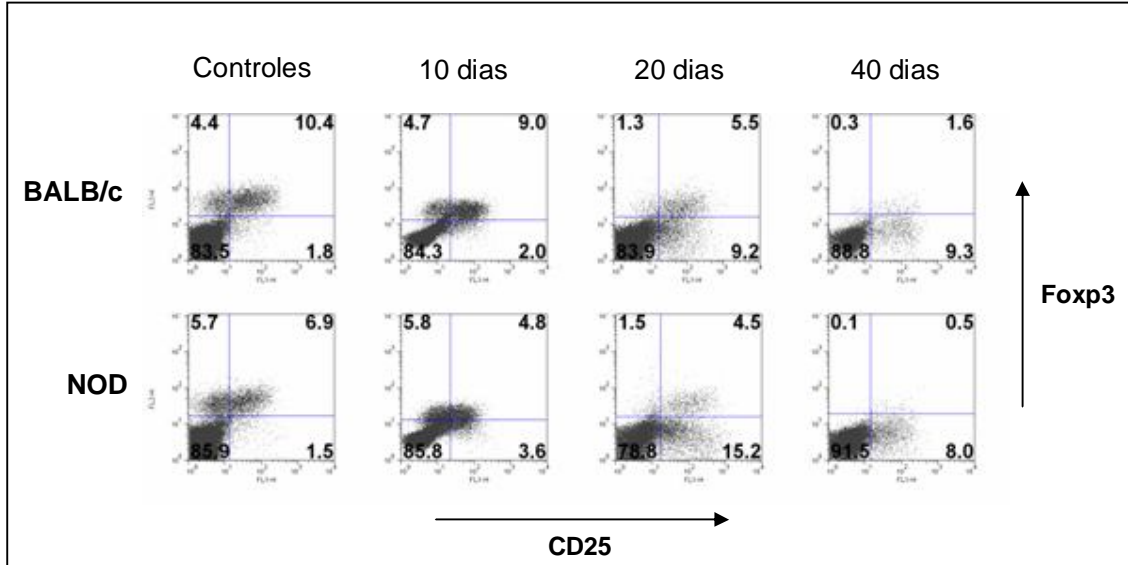


Figura 9. Número de células T CD4 expressando CD25 e Foxp3 no baço de animais BALB/c e NOD, após a infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Análise estatística realizada utilizando-se o teste t Student. Barras representam o desvio padrão da amostra. * representa os casos em que $p < 0,05$ comparado aos grupos controles. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

Apesar de um aumento inicial da quantidade de células Treg com a infecção, estas células são progressivamente diluídas frente às células efetoras já a partir do décimo dia pós-infecção (Figura 10A e 10B). Em contrapartida, a proporção de células CD4+Foxp3^{neg} recém ativadas, expressando o receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25), aumenta progressivamente, atingindo valores máximos aos 20 dias pós-infecção (Figura 10A).

A



B

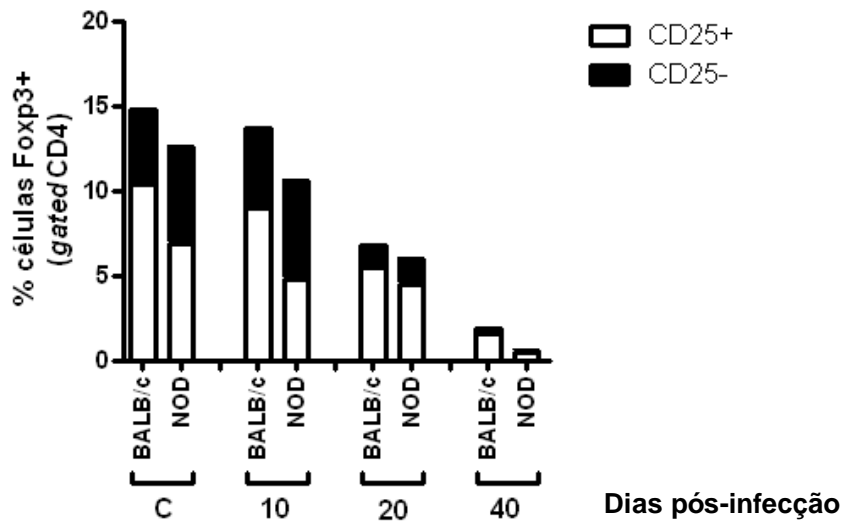


Figura 10. Proporção das células CD4 que expressam Fxp3 e CD25 no baço de animais BALB/c e NOD, após infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. **A)** Dot plots representativos de células CD4⁺, mostrando a expressão de Fxp3 e CD25 nestas células. **B)** Gráfico representativo das porcentagens observadas em A. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.1.5 - As Tregs representam uma porcentagem mínima das células que infiltram o músculo e coração.

A análise das células T CD4+ que infiltram o músculo esquelético e o coração de animais BALB/c e NOD infectados pela cepa Tulahuen do *T. cruzi* mostram a presença de uma quantidade muito reduzida de células Foxp3+ nesses sítios inflamatórios durante a fase aguda. Em geral, menos de um por cento das células T CD4+ que infiltram os tecidos destes órgãos são de células Foxp3+ (Figura 11).

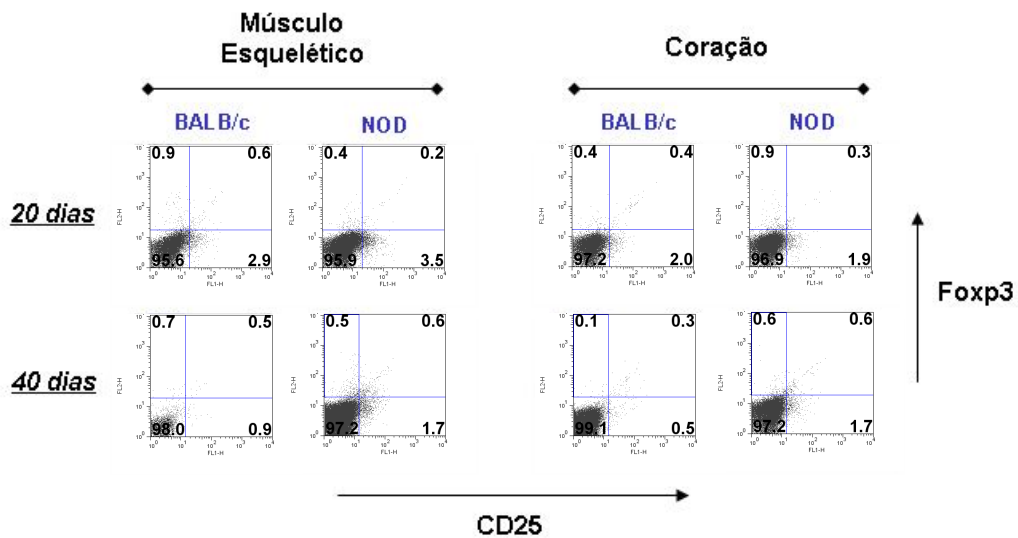


Figura 11. *Dot plots* representativos da expressão de Foxp3 e CD25 em células CD4+ que infiltram o músculo esquelético e coração de animais infectados pelo *T. cruzi*. Análise feita em animais infectados pela cepa Tulahuen, aos 20° e 40° dias pós-infecção. Números representam a porcentagem de células dentro das CD4+. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.1.6 - A infecção induz aumento significativo de células Gr1+ no baço de animais NOD, que é expressivamente maior que a observada em animais BALB/c.

Ao analisarmos a população de células mielóides, observamos que a infecção pelo *T. cruzi* provoca um aumento proporcional muito maior de células CD11b+Gr1+ no baço de animais NOD que aquela observado em animais BALB/c. Embora o aumento se dê também na população CD11b+ que expresse níveis intermediários de Gr1+, é na população que expressa altos níveis de Gr1 que essa alteração é mais evidente (Figura 12).

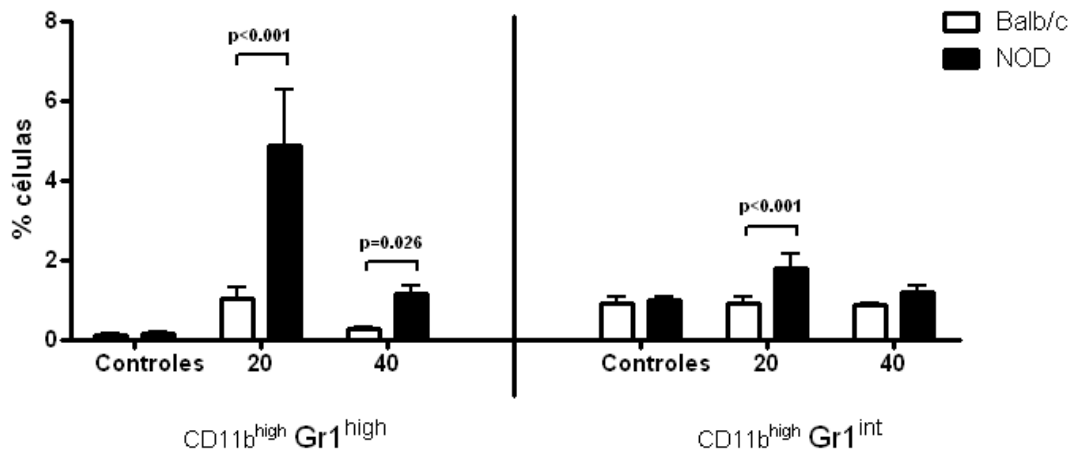


Figura 12. **Proporção das células esplênicas que expressam Gr1 em animais BALB/c e NOD, após infecção pelo *T. cruzi*.** Análise feita no 20° e 40° dias após infecção pela cepa Tulahuen. Barras representam o desvio padrão e os números representam os valores de p obtidos através do teste t Student. Dados representativos de três experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2 -RESULTADOS: PARTE II

4.2.1 -A infecção pelo *T. cruzi* inibe o desenvolvimento do diabetes em animais NOD.

Animais NOD fêmeas nascem normoglicêmicos e desenvolvem diabetes auto-imune com o passar do tempo. Os animais utilizados em nossos estudos, provenientes da colônia mantida pelo biotério do CPqGM (origem da colônia descrita nos "Materiais e Métodos"), desenvolvem hiperglicemia a partir da 12 semana de vida, aproximadamente (Figura 13). O número de animais com hiperglicemia progride, alcançando por volta de 75% das fêmeas no decorrer de um ano (Figura 13). Esses índices são compatíveis com o de outras colônias de NOD mantidas em outras partes do mundo (revisto em ANDERSON, M.S. & BLUESTONE, J.A., 2005).

Observamos, entretanto, que animais NOD pré-diabéticos quando infectados com o *Trypanosoma cruzi*, praticamente não ficam hiperglicêmicos. Esta proteção do diabetes é visto durante a fase aguda da doença e se mantém durante a fase crônica (Figura 13).

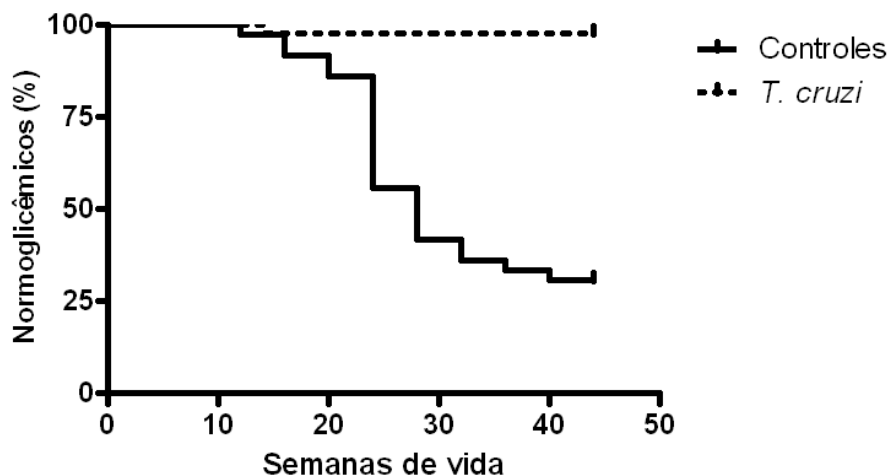


Figura 13: **Incidência de diabetes em animais NOD fêmeas após infecção com o *Trypanosoma cruzi*.** Animais infectados com a cepa Tulahuen entre a oitava e décima semanas de vida. Análise feita utilizando-se o teste log-rank. $p < 0,0001$. Dados representativos de cinco experimentos. $n \geq 15$ cada grupo.

4.2.2 - Animais NOD infectados estão protegidos do diabetes mesmo após administração de ciclofosfamida.

A ciclofosfamida é uma droga cujos metabólitos ativos possuem elevada atividade citotóxica sobre células com baixos níveis de aldeído desidrogenase e que ciclam rapidamente (BROCK, N., 1996). Ela é capaz de acelerar o desenvolvimento do diabetes em animais NOD através de uma ação imunofarmacológica não completamente esclarecida (HARADA, M. & MAKINO, S., 1984).

Embora uma única dose de ciclofosfamida (250mg/kg) seja suficiente para induzir rapidamente diabetes em mais de 80% dos animais NOD fêmeas que não o desenvolveram espontaneamente, ela é incapaz de induzi-lo em animais infectados pelo *T. cruzi* (Figura14).

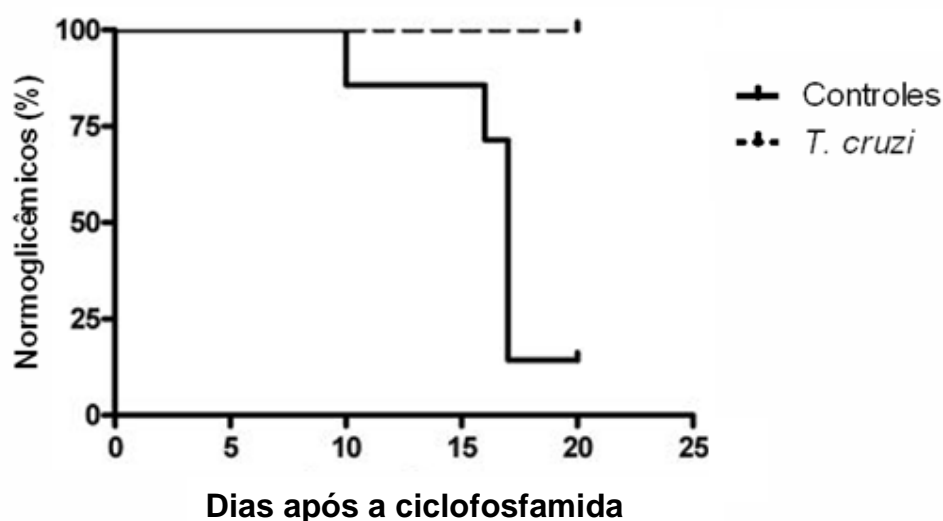


Figura 14. **Incidência de diabetes em animais NOD infectados ou não, após o tratamento com ciclofosfamida.** Animais NOD com 4 meses pós-infecção, e seus respectivos controles normoglicêmicos (todos com 7 meses de vida), foram tratados com uma única dose de 250 mg/kg de ciclofosfamida. Animais infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Análise feita utilizando-se o teste Logrank. $p=0.004$. Dados representativos de três experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

4.2.3 - A proteção contra o diabetes conferido a animais NOD pela infecção com o *T. cruzi* não se relaciona ao número de células Treg.

Afim de esclarecer o mecanismo responsável pela proteção ao diabetes conferido a animais NOD pela infecção com o *T. cruzi*, procuramos inicialmente identificar populações regulatórias que pudessem estar alteradas.

Analisando a dinâmica das células T regulatórias durante a fase aguda, verificamos que, após um súbito aumento desta população aos 4 dias, há uma redução progressiva da proporção da população Foxp3+ em animais infectados, em relação às demais células T CD4 (Figura 15). Esta redução foi observada tanto no baço dos animais NOD como também nos linfonodos que drenam do pâncreas.

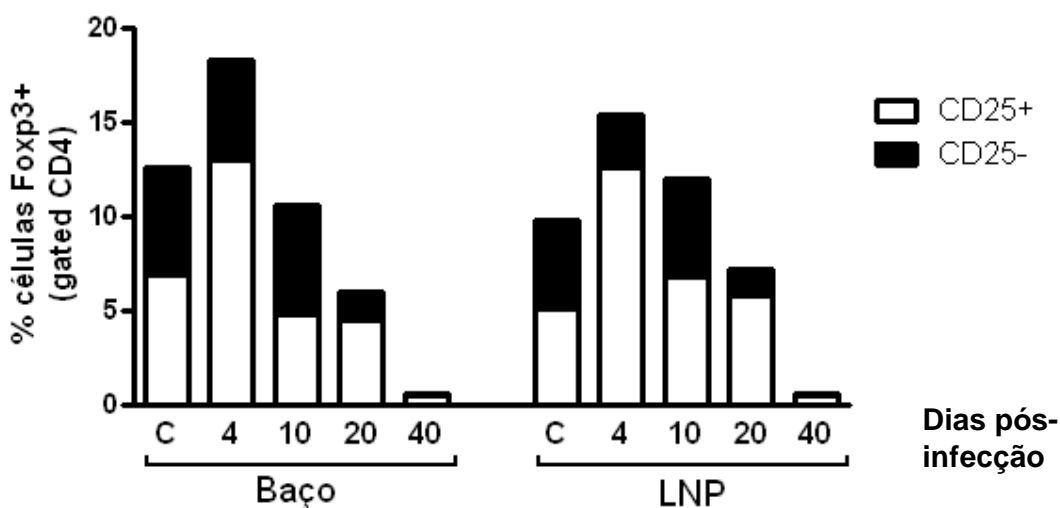


Figura 15. Porcentagem de células Treg em relação às células T CD4+, no baço e linfonodos pancreáticos (LNP) de animais NOD infectados pelo *T. cruzi*. "C" representa o grupo controle, não infectado. Barras pretas representam a porcentagem de células Foxp3+CD25- e as brancas as células Foxp3+CD25+. Animais infectados com a cepa Tulahuen. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2.4 - A infecção pelo *T. cruzi* induz aumento na expressão de PD-L1 e, posteriormente, de PD-1.

Observamos um aumento generalizado na expressão de PD-L1 esplenócitos e células do linfonodo pancreático de animais NOD, aos 20 dias pós-infecção (Figura 16A). Este aumento se dá em diversas populações linfóides e mielóides, incluindo em células dendríticas, nas quais é verificado o aumento do PD-L1 concomitantemente ao aumento da molécula co-estimulatória CD40 (Figura 16B).

Com o avançar da infecção, contudo, os níveis de PD-L1 reduzem, chegando, no baço, a níveis semelhantes ao de animais não infectados já ao 40º dia pós-infecção (Figura 16A).

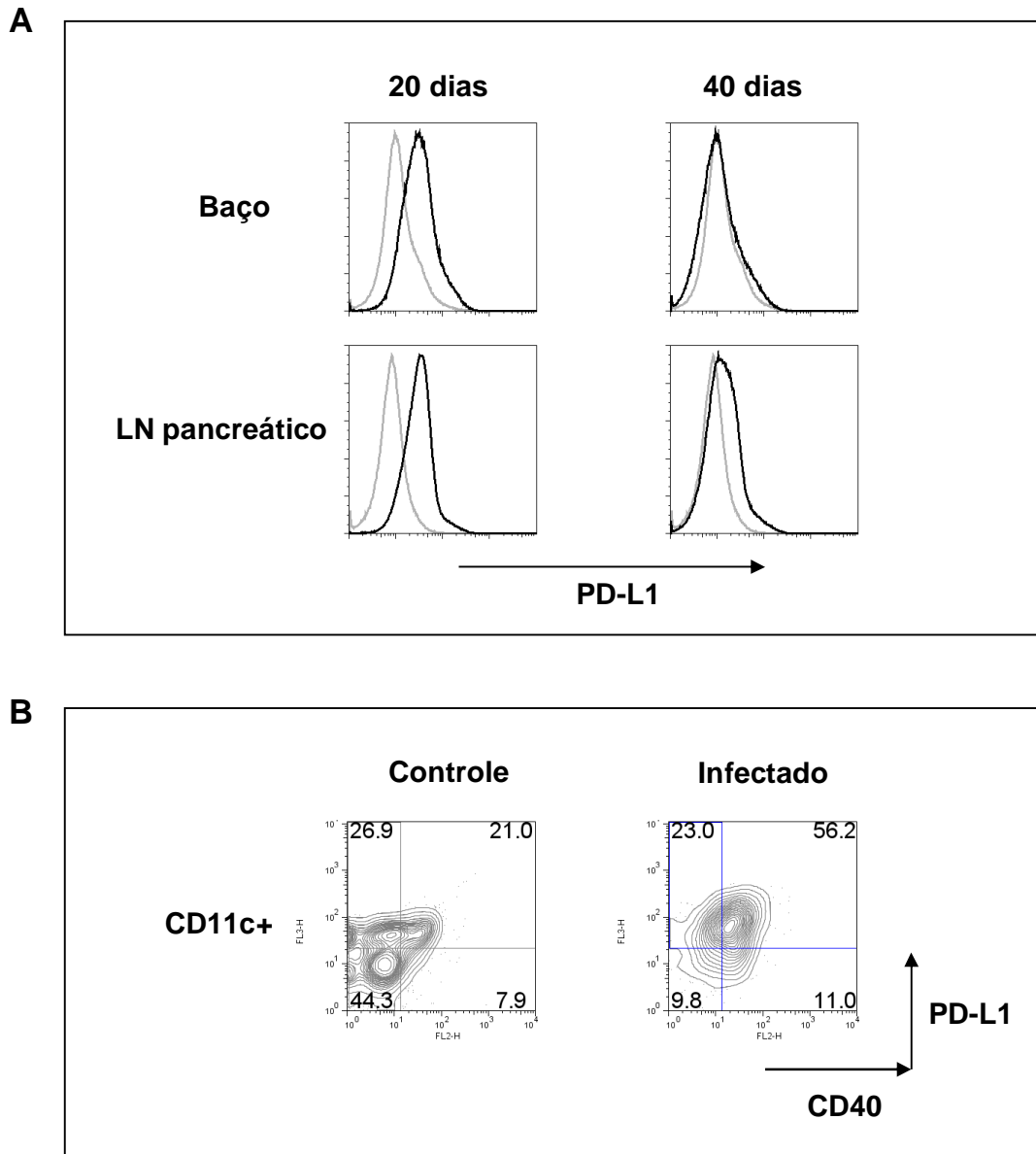


Figura 16. **Expressão de PD-L1 em esplenócitos e em células do linfonodo pancreático de animais NOD infectados pelo *T. cruzi*.** **A)** Histogramas representam a expressão de PDL1 em células totais do baço e linfonodo pancreático. A linha cinza representa animais normais, enquanto a linha preta representa animais ao vigésimo dia de infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. **B)** Expressão de PD-L1 e CD40 em células CD11c+ do baço de animais NOD infectados ou não, no 20º dia pós infecção. Dados representativos de ao menos dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

A infecção pelo *T. cruzi* também provoca um aumento da população T que expressa a molécula de PD-1. Entretanto, esse aumento só é visto no 40º pós infecção, sendo que a população CD4+ PD-1+ se concentra nos órgãos linfóides periféricos, enquanto a população CD8+ PD-1+ é detectada sobretudo nos sítios inflamatórios (Figura 17).

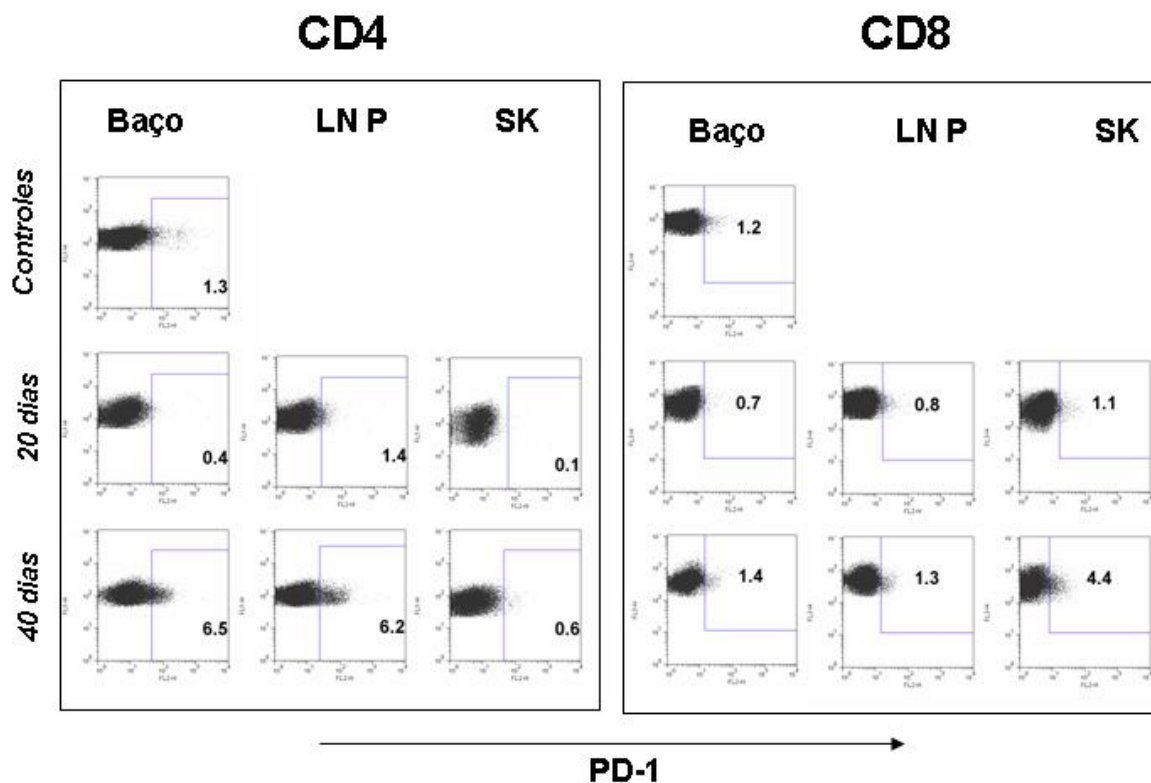


Figura 17. **Expressão de PD-1 sobre células T de animais infectados pelo *T. cruzi*.** Números representam a proporção das células expressando PD-1 dentro da população CD4+ ou T CD8+. LNP = linfonodo pancreático; SK = células de infiltrado de músculo esquelético. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2.5 - A infecção pelo *T. cruzi* induz a alterações na população Gr1+ no sangue periférico e, conseqüentemente, no baço.

Observamos também que houve aumento significativo na população GR1+ no baço de animais infectados, durante a fase aguda da doença (Figura 12). O GR1 (Ly6C/Ly6G) é expresso em populações celulares distintas e têm sido descrito como marcador de células mielóides supressoras em diversos modelos experimentais (GABRILOVICH, D.I. & NAGARAJ, S., 2009).

A infecção pelo *T. cruzi* altera a composição de células Gr1+ não só no baço (Figura 12), mas também no sangue periférico (Figura 18). A análise por citometria de fluxo mostra que a população Gr1+ é uma população heterogênea, tanto no tamanho quanto na complexidade celular, e com diferentes níveis de expressão de Gr1 (Figura 19). O tratamento *in vivo* com o anticorpo depletante RB6-8C5 (anti-Gr1) confirma a expressão do Gr1 nestas populações (Figura 18).

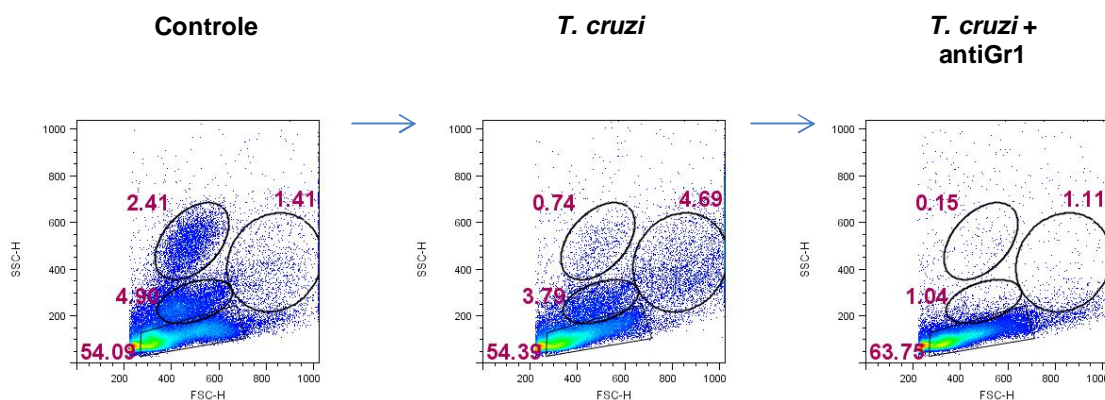


Figura 18. Citometria de fluxo de sangue periférico de animais NOD infectados antes e dois dias após o tratamento com anti-GR1. Décimo dia de infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Tratamento feito com 200ug de RB6-8C5 dois dias antes da análise. Números representam proporção da população selecionada em relação a todas as demais. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 3$ cada grupo.

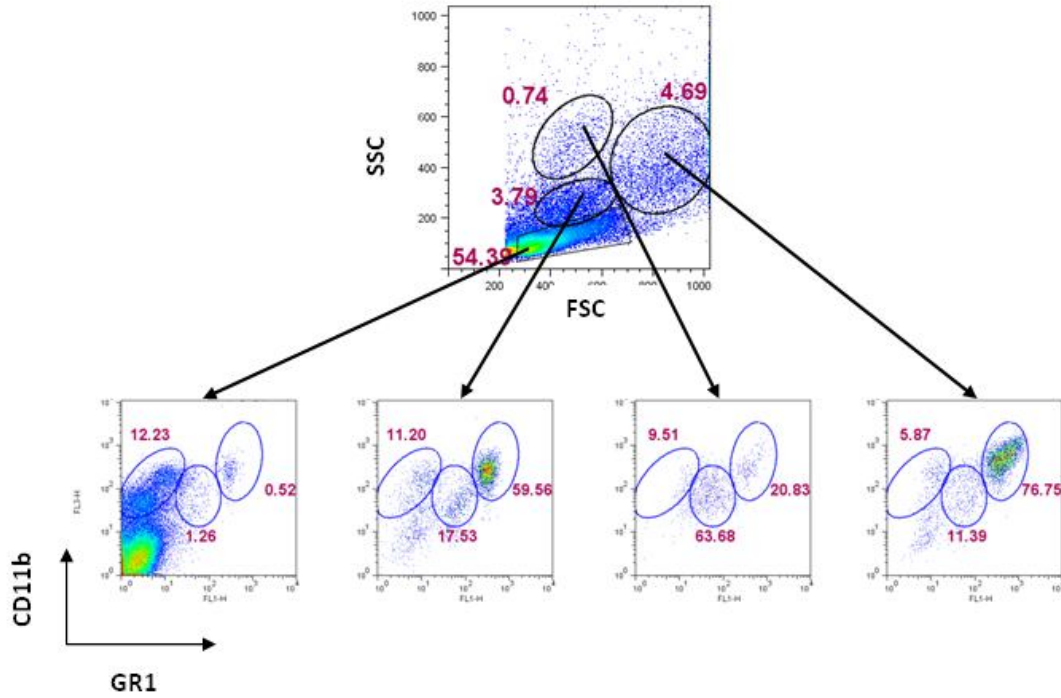
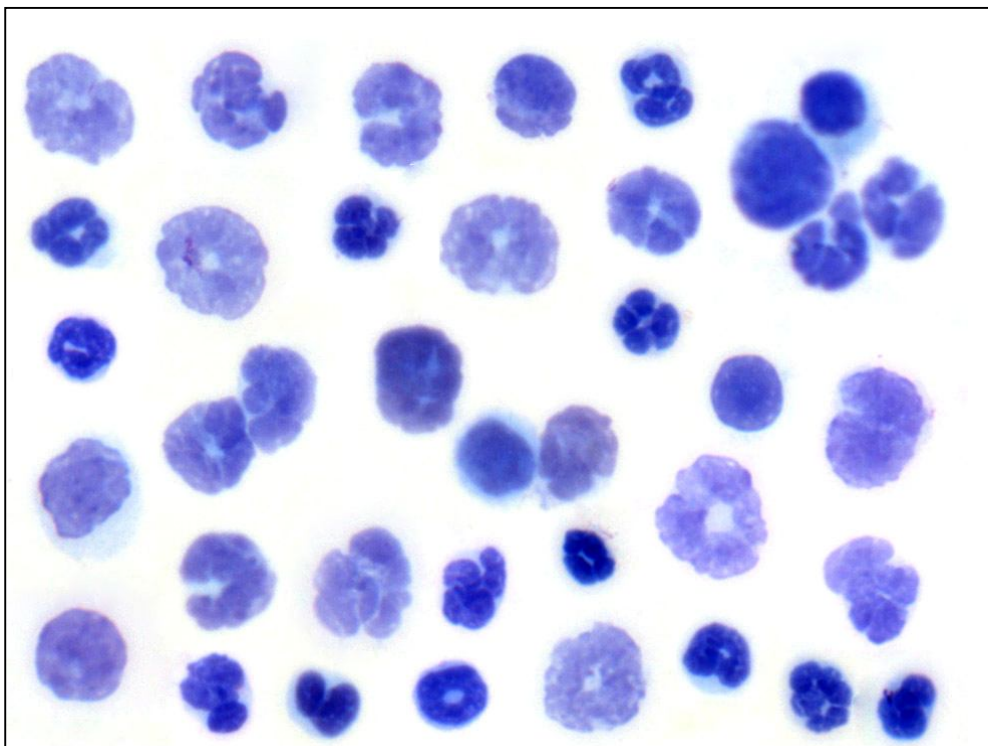


Figura 19. Variação na expressão de Gr1 em diferentes populações do sangue periférico de animal NOD infectado pelo *T. cruzi*. Décimo dia pós infecção pela cepa Tulahuen. Números representam proporção da população selecionada. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 3$ cada grupo.

A análise citológica das células GR1+ (isoladas por *sorting* em citometria de fluxo) do baço de animais NOD com 20 dias de infecção mostra células de diferentes morfologias, estando presente, em sua maioria, células de aspecto neutrofílico com núcleos irregulares ou em forma de anel, de variados tamanhos (Figura 20A).

A



B

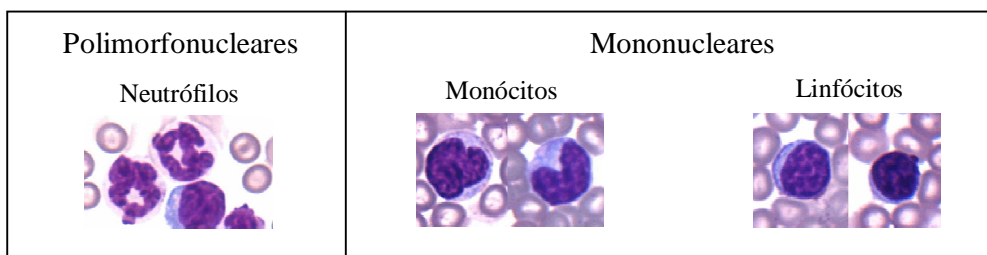


Figura 20. **Morfologia das células GR1+ isoladas do baço de animais infectados pelo *T. cruzi*.** **A)** Células GR1+ isoladas por *sorting* em citometria de fluxo (85% de pureza) de animais NOD aos 22 dias de infecção. **B)** Células do sangue periférico de animais normais. Esfregaço corado com Panótico. Aumento 250x. n = 5 animais.

4.2.6 - O tratamento de animais infectados com anti-Gr1 reverte a proteção contra o diabetes.

Afim de investigar se o aumento da população GR1+ durante a infecção possui relação com a proteção do diabetes observado durante a fase aguda, os animais NOD foram tratados com 200ug de anti-GR1 durante do sétimo, nono e décimo segundo dia pós-infecção. Os animais infectados e depletados de células GR1+ desenvolveram hiperglicemia em taxas significativamente maiores que seus controles, os quais receberam mesma quantidade de imunoglobulina de rato (Figura 21).

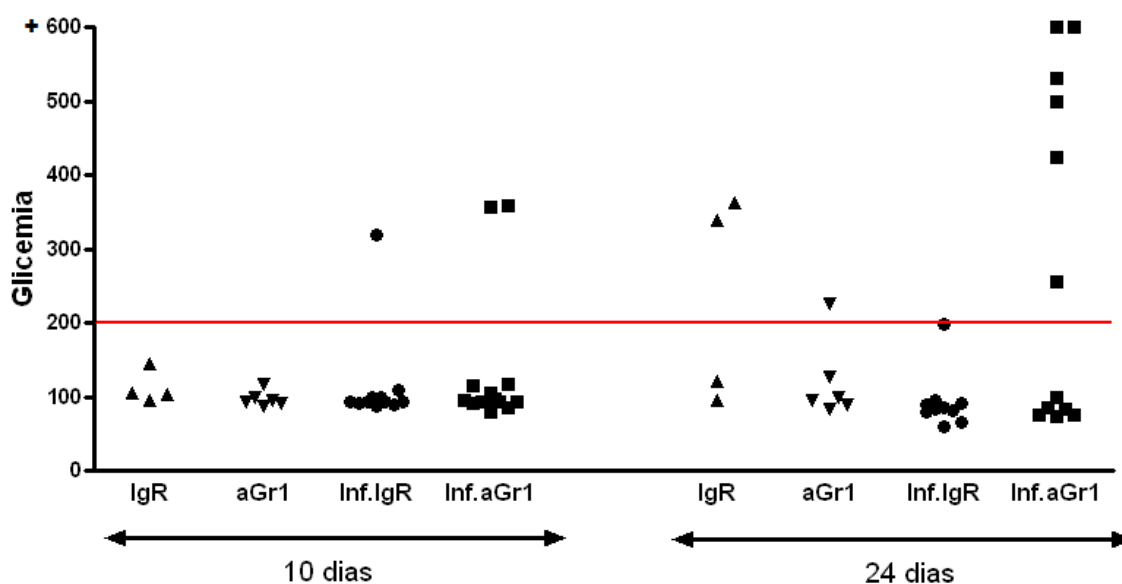


Figura 21. **Efeito do tratamento com anti-Gr1 sobre a glicemia de animais NOD, infectados ou não.** Animais normoglicêmicos com 4 meses de vida infectados com 5000 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Animais tratados com 200ug de anti-Gr1 (clone RB6-8C5) nos sétimo, nono e décimo segundo dias pós-infecção, por via intraperitoneal. Linha vermelha sinaliza a glicemia de 200 µg/dl, valor considerado como limite para a normoglicemia. Valor de $p=0,048$ entre o grupo Inf.IgR e Inf.aGr1, quando comparados através do teste Logrank. aGr1 = animais que receberam anti-Gr1; IgR = animais que receberam imunoglobulina de rato; Inf = animais infectados. Dados representativos de três experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2.7 - A depleção de células Gr1+ induz aumento da celularidade esplênica em animais infectados, com expansão de células T CD8+.

O tratamento de animais NOD com anti-Gr1 a partir do sétimo dia pós-infecção induz aumento da celularidade total do baço destes animais, quando comparado a animais que receberam imunoglobulina de rato (Figura 22A). A análise das populações linfocitárias deste órgão mostrou aumento significativo apenas da população T CD8+, não ocorrendo alterações estatisticamente significantes nos números de células T CD4+ (Figura 22B).

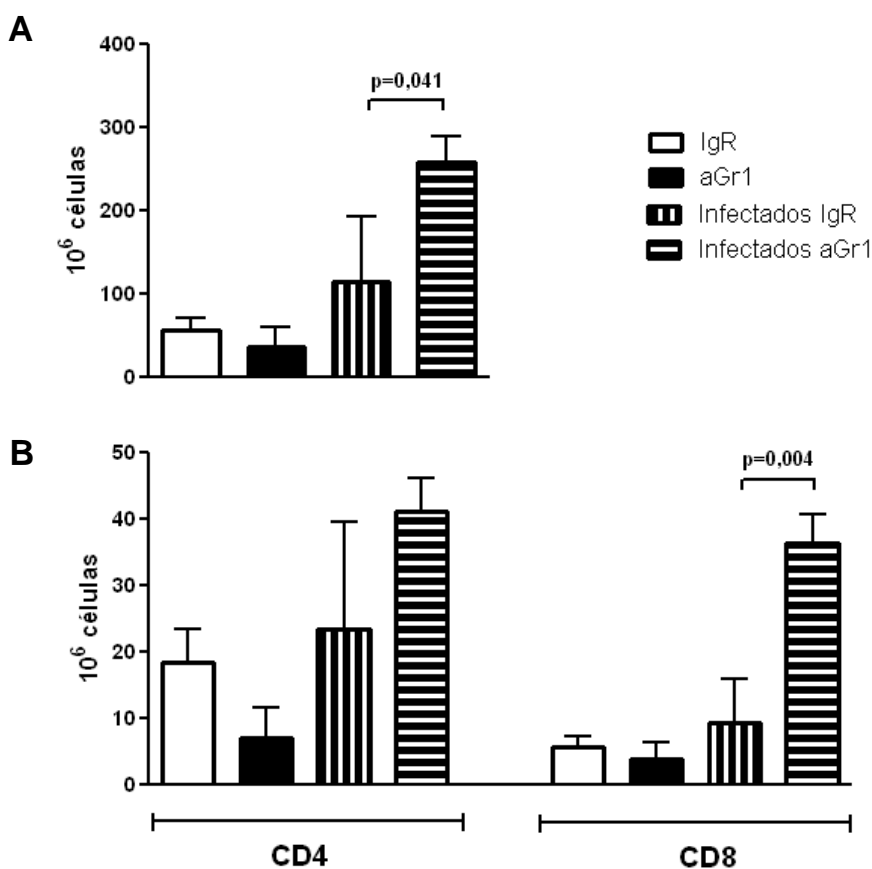


Figura 22. Efeito do tratamento com anti-Gr1 sobre a celularidade do baço e suas principais populações de linfócitos T. Tratamento realizado por via intraperitoneal com 200ug de RB6-8C5 ou imunoglobulina total de rato, por três dias alternados, a partir do 7° dia pós-infecção. **A)** Celularidade total; **B)** Número absoluto de células CD4 e CD8. Barras representam o desvio padrão. Valores de p obtidos pelo teste t Student. Análise realizada em animais NOD no 22° dia pós infecção pelo *T. cruzi*. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2.8 - A depleção de células Gr1+ induz leve aumento da memória efetora e amplia o número de células T CD8 capazes de produzir IFN γ .

Além de induzir a expansão de células T CD8, a administração do anticorpo RB6-8C5 a partir do sétimo dia pós-infecção induz aumento na proporção de células CD62L^{neg} (Figura 23A). Ademais, duplica a população CD8+ capaz de produzir IFN γ prontamente sob estímulo com anti-CD3, e reduz a que produz IL-10 (Figura 23B).

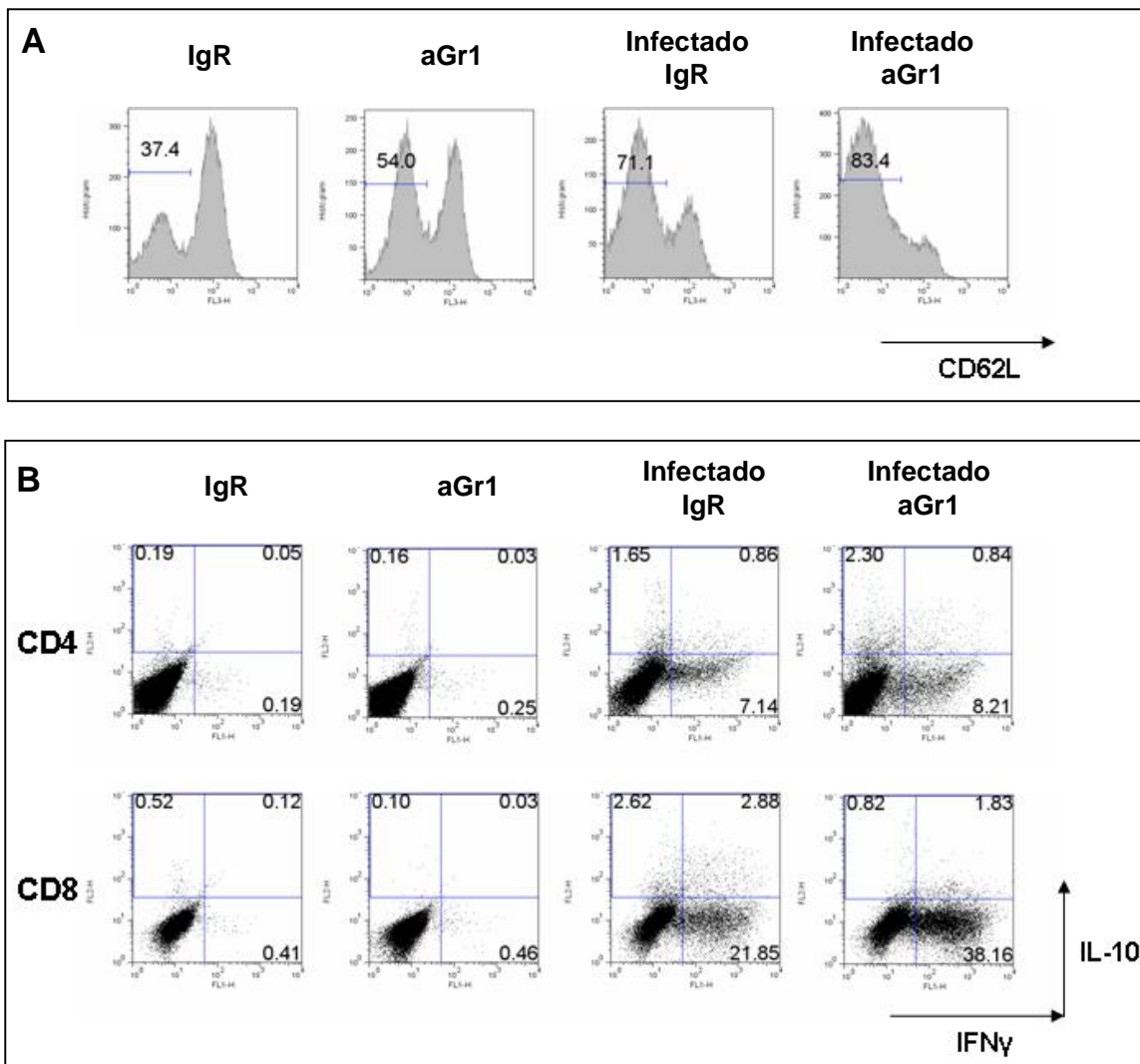
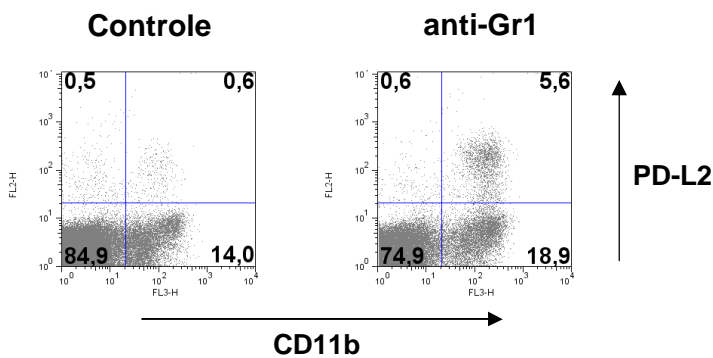


Figura 23. Efeito da depleção de células Gr1+ sobre a expressão de CD62L e produção de IFN γ por células T. **A)** Expressão de CD62L sobre células T CD8 esplênicas. **B)** Produção de IFN γ e IL-10 em esplenócitos após estímulo *in vitro* com anti-CD3 solúvel. 22º dia pós-infecção. Análise realizada nas mesmas condições descritas na Figura 22. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 4$ cada grupo.

4.2.9- Depleção de células Gr1+ em animais NOD infectados induz aumento de células CD11b+ que expressam PD-L2.

A depleção de células Gr1+ induz aumento de células CD11b expressando PD-L2 no sangue periférico (Figura 24). Esta é uma alteração importante que pode estar relacionado ao mecanismo pelo qual o tratamento com anti-Gr1 reverte a proteção ao diabetes observado em animais NOD infectados.

A



B

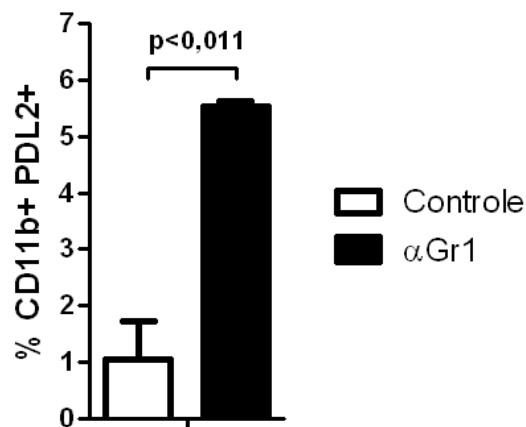


Figura 24. Expressão de CD11b e PD-L2 em sangue periférico de animais NOD infectados, após tratamento com anti-Gr1. Animais analisados dois dias após tratamento com 200 μ g de RB6-8C5, no décimo dia pós-infecção com cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Dot-plots (A) e gráficos (B) representativos de dois experimentos. $n \geq 3$ cada grupo.

4.3 - RESULTADOS: PARTE III

4.3.1 - A ciclofosfamida induz diabetes em animais NOD através de mecanismo imuno-farmacológico.

A ciclofosfamida é uma droga citotóxica capaz de acelerar o desenvolvimento do diabetes em animais NOD. Embora o mecanismo pelo qual a droga promove tal efeito não esteja completamente estabelecido, tem-se demonstrado que este se dá por ação imunofarmacológica e não por efeito citotóxico direto sobre as células beta-pancreáticas (HARADA, M. & MAKINO, S., 1984). De fato, tratando animais NOD *knockout* para o gene da β 2-microglobulina com 250ug/kg de ciclofosfamida, verificamos que nenhum destes animais desenvolve hiperglicemia (NOD b2M -/- fêmeas com 4 meses de vida, n=12; dados não mostrados). O mesmo acontece com animais NOD infectados pelo *T. cruzi* (Figura 14).

Entretanto, animais NOD fêmeas normais que não desenvolveram diabetes até o sétimo mês de vida (e que, a partir de então, possivelmente não o desenvolveriam naturalmente) ficam rapidamente hiperglicêmicos após serem tratados com a ciclofosfamida (Figura 14). Afim de identificar as alterações celulares que correlacionam com este efeito diabetogênico da ciclofosfamida, animais NOD fêmeas normoglicêmicos com sete meses de vida foram tratados com uma única dose de ciclofosfamida (250 mg/kg). Após 8 dias, os animais que já se apresentavam hiperglicêmicos devido ao tratamento foram eutanasiados, analisados, e seus dados comparados aos de animais não tratados normoglicêmicos, ao de animais não tratados que desenvolveram naturalmente diabetes, e ao de animais tratados que até o 8º dia não haviam desenvolvido a doença ainda. Todos animais utilizados tinham por volta de 7 meses de vida.

4.3.2 - O tratamento com única dose de ciclofosfamida não determina redução da celularidade do baço ao oitavo dia pós-tratamento.

Os animais NOD apresentam uma redução progressiva na celularidade dos órgãos linfóides periféricos, que é mais acentuada naqueles que desenvolveram o diabetes. De fato, o baço dos animais diabéticos possui menos da metade da celularidade de animais de mesma idade que não desenvolveram a doença (Figura 25).

Já os animais tratados com ciclofosfamida (250 mg/kg) apresentam, ao oitavo dia pós-tratamento, quantidades de células no baço iguais, ou até superiores, ao de animais NOD não tratados e não diabéticos (Figura 25).

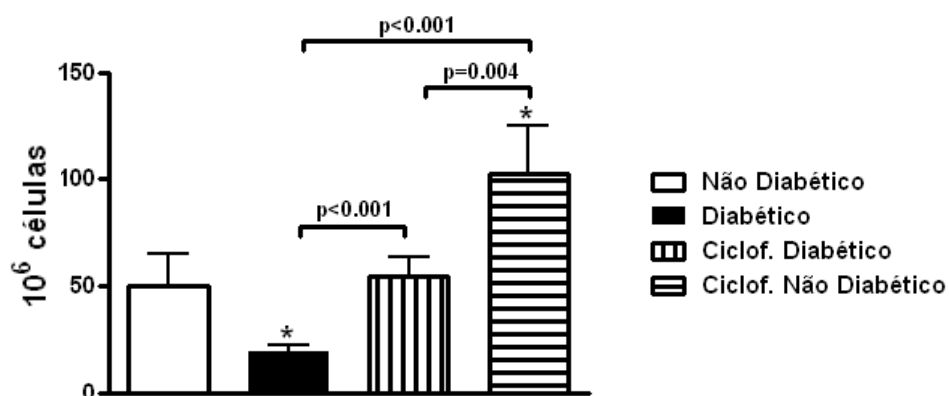


Figura 25. **Contagem do número de células mononucleares do baço de animais NOD após tratamento com ciclofosfamida.** Animais foram tratados com 250mg/kg de ciclofosfamida via intraperitoneal e analisados 8 dias após. Barras representam o desvio padrão. * representa os casos em que $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Não Diabético. Teste t Student. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

4.3.3 - O tratamento com ciclofosfamida induz redução na proporção de células T CD8 com fenótipo de memória.

O tratamento com ciclofosfamida induz alterações no fenótipo das células T CD8+, com redução da proporção de células de memória central ($CD44^{high} CD62L^{+}$) e efetora ($CD44^{high} CD62L^{neg}$) e com um aumento na proporção de células *naive* ($CD44^{low} CD62L^{+}$) (Figura 26). Os animais que desenvolveram espontaneamente o diabetes também apresentam uma menor proporção de células com fenótipo de memória efetora, e uma maior proporção de células *naive* (Figura 26).

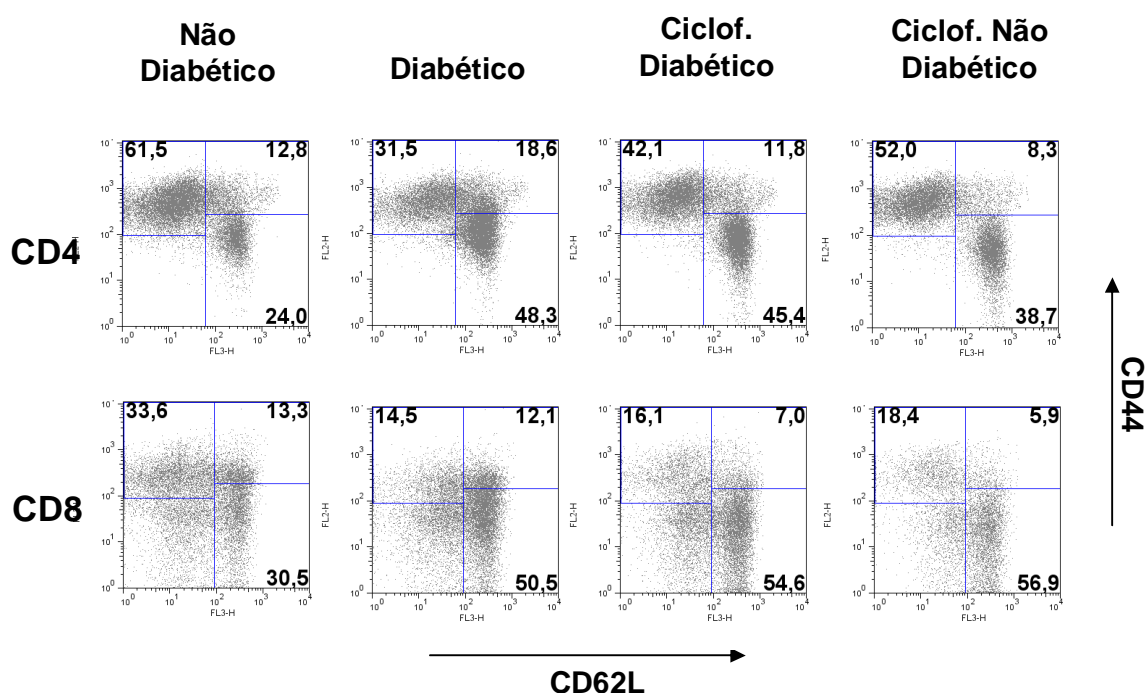


Figura 26. Expressão de CD44 e CD62L em células T do baço de animais NOD tratados com ciclofosfamida. Animais foram tratados com 250mg/kg de ciclofosfamida via intraperitoneal e analisados 8 dias após. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

4.3.4 - Animais NOD apresentam, no oitavo dia pós-tratamento com ciclofosfamida, redução de células Treg no baço, mas não no infiltrado que ocorre no pâncreas destes animais.

Em estudo feito em animais C57Bl/6 concluiu-se que a ciclofosfamida em baixas doses mata preferencialmente células Treg, em detrimento a outras células CD4+ (LUTSIK, M.E. et al, 2005). Em nosso estudo verificamos que, no oitavo dia pós-tratamento, há uma redução no número de células Treg no baço, a níveis semelhantes àquele encontrado em animais que desenvolveram naturalmente o diabetes (Figura 27 e Figura 28A), sendo a população CD25+ a mais afetada (Figura 28B).

No pâncreas entretanto, a redução encontrada 8 dias após o tratamento é mínima, ou praticamente inexistente. Curiosamente, animais que desenvolveram diabetes espontaneamente possuem as maiores proporções de células T Foxp3+ entre os infiltrados pancreáticos analisados (Figura 28A)

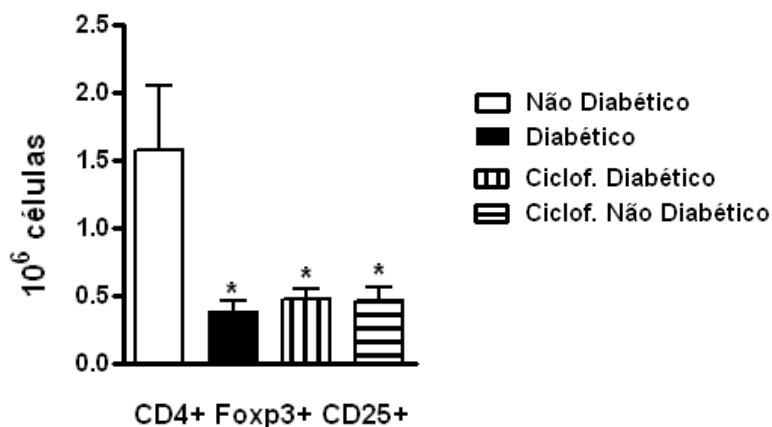


Figura 27. Número de células T CD4 Foxp3+ CD25+. Análise realizada em esplenócitos de animais NOD após tratamento com ciclofosfamida. * representa os casos em que $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Não Diabético, através do teste t Student. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

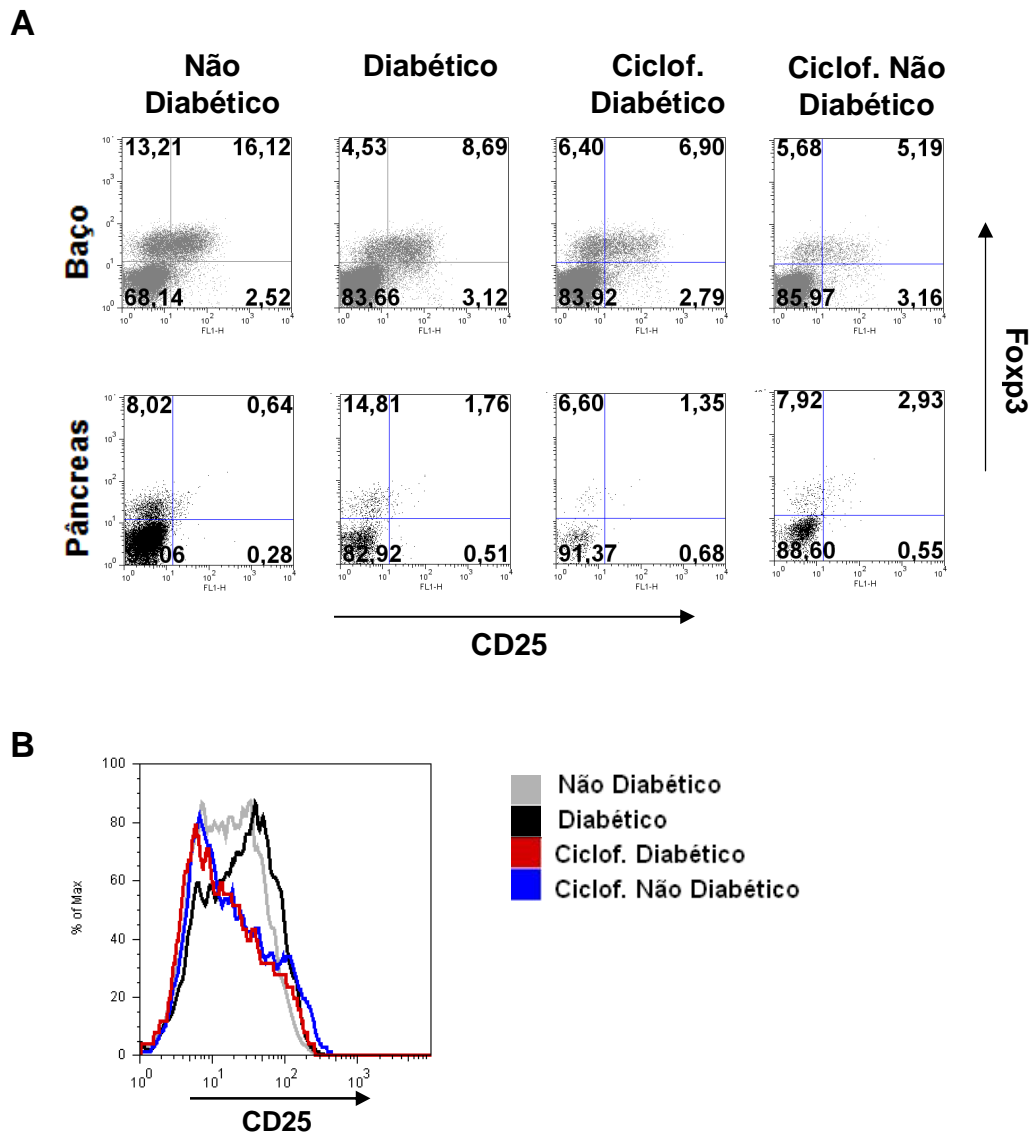


Figura 28. **Expressão de Fcpx3 e CD25 sobre células do baço e células do infiltrado pancreático.** **A)** *Dot plots* representativos de animais NOD tratados ou não com ciclofosfamida, mostrando a expressão de Fcpx3 e CD25 em células CD4⁺ do baço e pâncreas. **B)** Histograma mostrando o nível de expressão de CD25 sobre as células CD4⁺ Fcpx3⁺ do baço. Dados representativos de dois experimentos. n ≥ 6 cada grupo.

4.3.5 - Animais que desenvolvem diabetes espontaneamente possuem o menor nível de expressão de PD-L1 sobre linfócitos T.

O PDL1 é expresso em uma variedade de células hematopoiéticas, incluindo células T CD4 e T CD8, onde exerce papel supressor, após ligação a moléculas de B7.1 em células apresentadoras de antígeno (BUTTE, M.J. et al, 2007). Observamos, em animais que desenvolveram diabetes espontaneamente, os menores níveis de expressão de PD-L1 entre os grupos analisados, quer sejam do baço, linfonodo pancreático e, no caso das T CD4, também no infiltrado pancreático (Figura 29).

Entre os animais tratados com ciclofosfamida, entretanto, não há redução da expressão do PD-L1. Além disso, há uma ligeira tendência de maior expressão do PD-L1 entre os linfócitos CD4+ dos animais tratados, e que ainda não desenvolveram o diabetes, comparado aos animais tratados, e que já se encontram hiperglicêmicos (Figura 29).

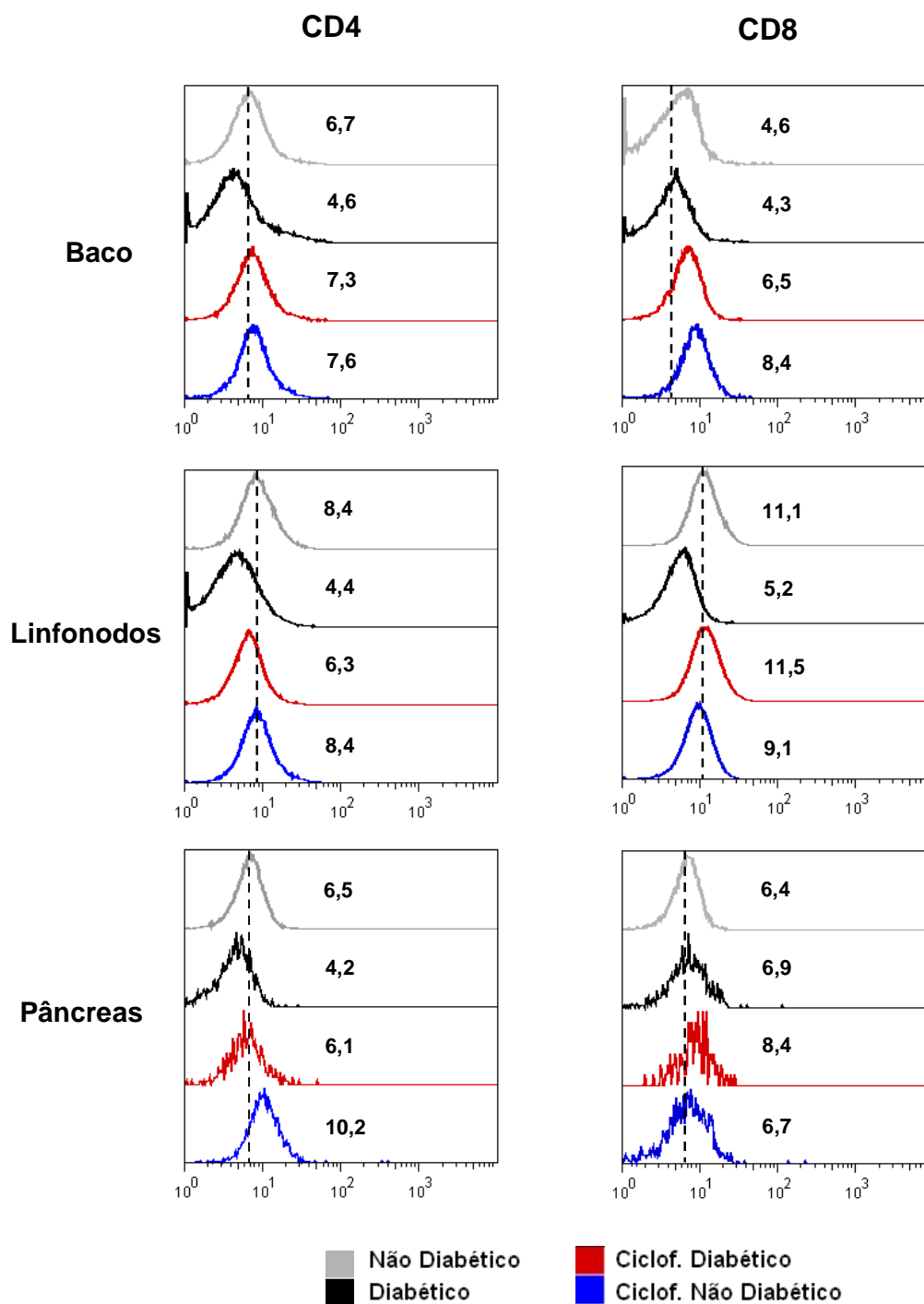


Figura 29. Níveis de expressão de PD-L1 no baço, linfonodo e células que infiltram o pâncreas em animais NOD tratados ou não com ciclofosfamida. Números representam células a média geométrica da fluorescência de cada grupo. Dados representativos de dois experimentos. $n \geq 6$ cada grupo.

5 - DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, a doença de Chagas tem sido estudada experimentalmente através do emprego de diversas espécies animais. De todos, o mais utilizados são os camundongos, pelas vantagens inerentes ao modelo, como grande disponibilidade de reagentes e facilidades na manutenção da colônia, dentre outros, e por apresentarem características imunopatológicas semelhantes ao caso humano (revisto em ANDRADE, S.G., 2000). O estudo da infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino levou ao entendimento de diversas propriedades da relação parasito-hospedeiro, como a importância da cepa infectiva do parasita, bem como das características da resposta imune do hospedeiro, para o desfecho da doença (ANDRADE, V. et al, 1985; ANDRADE, S.G. et al, 1985; CARDILLO, F. et al, 1996).

Entretanto, o estudo da infecção pelo *T. cruzi* em modelos animais propensos ao desenvolvimento de doenças autoimunes tem sido pouco abordado. Em específico, não há trabalhos publicados, até a presente data, sobre o estudo da doença na linhagem murina NOD. Estes animais têm sido os mais utilizados para o estudo do diabetes autoimune, por ser o modelo murino cuja etiologia da doença mais se assemelha ao humano (GIARRATANA, N. et al, 2007). Contudo, os animais NOD podem vir a desenvolver também outras síndromes autoimunes, como tireoidite (MANY, M.C. et al, 1996), sialoadenite (HU, Y. et al, 1992), anemia hemolítica (BAXTER, A.G. & MANDEL, T.E., 1991) e polineuropatia periférica autoimune (SALOMON, B. et al, 2001). Neste trabalho estudamos e descrevemos, de forma inédita, características da resposta imune celular de animais NOD ao *Trypanosoma cruzi*.

Os animais NOD são relativamente mais suscetíveis à infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi* que animais BALB/c (Figuras 1 e 2). Não é, entretanto, tão susceptível como certas linhagens, a exemplo dos animais C57Bl/6 (CARDILLO, F. et al, 2007), tendo em vista que apenas 25% destes animais sucumbem à fase aguda da doença. O maior parasitismo nestes animais aponta para uma resposta ineficiente contra o parasita (Figura 2). De fato, estes animais têm uma expansão celular muito mais reduzida que animais BALB/c (Figura 3), principalmente em se tratando de células T CD8 (Figura 4). As células T CD8 têm sido descritas como uma população de grande importância para uma resposta efetiva contra o *T. cruzi*. Animais *knockout* para $\beta 2$ -

microglobulina (não possuem células T CD8) falham em montar uma resposta inflamatória nos tecidos infectados pelo parasita, não controlando a parasitemia e desenvolvendo mortalidade precoce (TARLETON, R.L et al, 1992). De modo semelhante, Rottenberg e colaboradores (ROTTENBERG, M.E. et al, 1993) mostraram que animais deficientes de CD4 ou CD8 são altamente suscetíveis à infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*.

Na resposta imune celular, em animais normais, a célula T naive, após reconhecimento do seu antígeno específico, expande vigorosamente e se modifica fenotipicamente. A maioria destas células perde o CD62L e deixam os órgãos linfóides periféricos em direção ao sítio inflamatório, recebendo a denominação de células efectoras (SALLUSTO, F. et al, 1999). Dentro desta população se encontram os linfócitos T CD8 citotóxicos, capazes de lisar células infectadas, bem como células produtoras de IFN γ , que ativam macrófagos, e que são cruciais para o controle parasitário (TZELEPIS, F. et al, 2006; NICKELL, S.P. & SHARMA, D., 2000; MARTIN, D.L. & TARLETON, R.L., 2005).

Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, observamos que animais BALB/c, os quais são mais resistentes, desenvolvem uma maior expansão de células T CD8 com fenótipo efector, quando comparado a animais NOD (Figura 5). Esta observação, realizada no baço, reflete-se posteriormente na qualidade do infiltrado inflamatório no músculo, com uma predominância maior de células T CD8 em animais BALB/c, contra uma predominância maior de células T CD4 nos animais NOD (Figura 6), e pode estar relacionado à maior resistência observado em animais BALB/c (SUN, J. & TARLETON, R.L., 1999). Realizando investigação semelhante, Roffe e colaboradores relataram que a animais suscetíveis ao *T. cruzi* possuem uma menor proporção de células T CD8, notadamente células CD44^{hi}CD62L^{neg}, no baço e nos infiltrados do coração, quando comparado a animais mais resistentes (ROFFE, E. et al, 2012). A importância destas células T CD8 efectoras na proteção durante a fase aguda parece residir, entre outros fatores, na sua capacidade de produção de IFN γ e, deste modo, ativar os mecanismos microbicidas dos fagócitos (revisto em PADILLA, M.A. et al, 2009A; SILVERINO, J.C. et al, 2012; TZELEPIS, F. et al, 2006).

Diferente da resposta a outros patógenos, como vírus, por exemplo, a resposta celular de linfócitos T CD8 ao *T. cruzi* é relativamente atrasada, sendo normalmente detectável somente a partir do décimo dia, e atingindo o pico por volta do 23º dia pós-infecção (Revisto em PADILLA, M.A. et al, 2009A). De fato, verificamos maior expansão destas células no 20º dia, com redução subsequente (Figura 3). Tem-se sugerido que isto se dá por insuficiente estimulação via TLR (PADILLA, M.A. et al 2009B). Entretanto, estudo feito utilizando-se animais deficientes para TLR4, TLR2, TLR9 e MyD88 mostrou que estes ligantes não são essenciais para a geração de uma resposta restrita a MHC-I, de modo que tais animais desenvolvem células T CD8 com capacidade citotóxica e de produção de IFN γ semelhantes a animais normais (OLIVEIRA, A.C. et al, 2010). Além disso, pode-se cogitar a hipótese de que a inicial expansão de Tregs, observado aos 4 dias pós-infecção (Figura 15), bem como o aumento da expressão de PD-L1 no baço e linfonodos (Figura 16) possam estar contribuindo para este fenômeno, de modo que estudos futuros precisam ser feitos neste sentido. Notadamente, o aumento da expressão de PD-L1 em células dendríticas CD11c+ do baço (Figura 16B) indica para uma capacidade tolerogênica destas (PROBST, H.C. et al, 2005), e sua participação individual deve ser investigada tanto no processo de proteção à diabetes mediado pela infecção, quanto na susceptibilidade à doença de Chagas.

A análise do perfil de citocinas também pode explicar a maior resistência em animais BALB/c. Esplenócitos destes animais produzem espontaneamente quantidades expressivamente maiores de IFN γ durante o estágio inicial da infecção, observado ao décimo dia pós-infecção (Figura 7A). Embora a origem deste pico de produção de IFN γ não tenha sido aqui investigada, o fato de se dar no estágio inicial da infecção leva a crer que provenha, ao menos em parte, de células NK ou NKT, visto que estas são eficientes produtoras de IFN γ durante a infecção pelo *T. cruzi* (CARDILLO, F. et al, 1996). Isto explicaria o fato do mesmo não ocorrer em animais NOD, visto que esta linhagem apresenta deficiência de células NKT (HAMMOND, K.J.L. et al, 2001).

O IFN γ é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos no sistema imune. Ela promove uma série de alterações no hospedeiro tornando-o apto a combater o patógeno, tais como aumento na expressão de moléculas de MHC por APCs, indução do complexo de imuno-proteossoma (STREHL, B. et al, 2005) e mudança de isotipo em

células B para IgG2a (SNAPPER, C.M. & PAUL, W.E., 1987). Além disso, o IFN γ é uma citocina fundamental para ativação de macrófagos, tornando-o capazes de eliminação do *T. cruzi* (LYKENS, J.E. et al, 2010.). De fato, o IFN γ promove expressão de iNOS (LOWESTEIN, C.J. et al, 1993) e produção de NO nestas células, que juntamente com sua indução de ROS (CASSATELLA, M.A. et al, 1990), culmina na formação de peroxinitrito, fundamental para a ação tripanocida destas células (ALVAREZ, M.N. et al, 2011). Além disso, induz aumento da capacidade fagocítica, com o aumento da expressão de receptores Fc γ RI (ERBE, D.V. et al, 1990) e de complemento em fagócitos mononucleares (STRUNK, R.C. et al, 1985). A elevada produção inicial de IFN γ observada em animais BALB/c (Figura 7A) pode estar sendo responsável por uma resposta celular rápida à infecção nestes animais, controle precoce da parasitemia (Figura 2) o que, provavelmente, resulta num menor parasitismo tissular, menor dano tecidual e maior sobrevida destes animais.

A análise da produção de citocinas por células do infiltrado inflamatório mostrou, entretanto, que há uma maior produção de IFN γ por células T CD4 e T CD8 de animais NOD (Figura 8). Esta maior produção de IFN γ no sítio inflamatório de animais suscetíveis (que foi observado tardiamente, aos 40 dias pós-infecção) pode ser uma tentativa de resolver a maior replicação parasitária tecidual e estar participando, ao menos indiretamente, pela maior mortalidade observada em animais NOD. Isto porque o IFN γ ativa a produção de radicais livres por macrófagos e cardiomiócitos (dentre os quais o peroxinitrito) que, na tentativa de controle do parasita, induz apoptose de cardiomiócitos (LEVRAND, S. et al, 2006) e lesões neuronais e do miocárdio (CARVALHO, C.M. et al, 2012; ALMEIDA-LEITE, C.M. et al, 2007), provocando disfunção cardíaca e falência deste órgão (GAO, C.Q. et al, 2002; CHANDRA, M. et al, 2002; ROCHA RODRIGUES, D.B. et al, 2012).

Animais BALB/c apresentaram, também, uma maior produção de IL-17, quando comparado a animais NOD (Figura 7B). Embora o papel desta citocina na infecção pelo *T. cruzi* seja mais controverso (DA MATTA GUEDES, P.M. et al., 2010), animais deficientes para IL-17 quando infectados apresentam maior parasitemia e mortalidade comparado a seus controles selvagens, além de apresentarem falência de múltiplos órgãos (MIYAZAKI, Y. et al, 2010). Curiosamente, células mononucleares de animais

IL-17A $-/-$ produzem menores quantidades de outras citocinas pró-inflamatórias, entre as quais o IFN γ (MIYAZAKI, Y. et al, 2010).

Animais NOD, além da produção inicial menor de IFN γ por esplenócitos, apresentaram maiores níveis de IL-10 (Figura 7C). Esta maior produção não é pontual, e sim persistente durante toda a fase aguda, e correlaciona com os maiores índices parasitêmicos observados nestes animais NOD. A IL-10 é uma citocina produzida por um grupo bastante heterogêneo de células (revisto em MOORE, K.W. et al, 2001) e primariamente anti-inflamatória (CARDILLO, F. et al, 1996), com diversos efeitos no sistema imune inato e adaptativo. Ela suprime a apresentação antigênica por APCs, através da inibição da expressão de MHC e das moléculas co-estimulatórias, além de inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por diversas populações celulares (MOORE, K.W. et al, 2001; MAYNARD, C.L. & WEAVER, C.T., 2008; JOSS, A. et al 2000). Na infecção pelo *T. cruzi*, tem-se descrito que linhagens mais suscetíveis produzem maiores quantidades de IL-10 no baço, quando comparado às mais resistentes. O bloqueio de IL-10 com anticorpo neutralizante é capaz de proteger animais outrora susceptíveis à fase aguda da doença (REED, S.G. et al, 1994). Além disso, animais geneticamente deficientes de IL-10 possuem menor parasitemia no sangue periférico e no tecido, e maior produção de IFN γ e NO por células esplênicas. Ademais, o tratamento com IL-10 recombinante induz aumento na parasitemia nestes animais (ABRAHAMSOHN, I.A. et al, 1996). Por outro lado, IL10 é necessário para prevenir uma hiper-reatividade imune durante a infecção pelo *T. cruzi*, de modo que animais geneticamente deficientes de IL-10 morrem precocemente, apesar da baixa parasitemia (HUNTER, C.A. et al, 1997). Estes animais apresentam elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN γ e TNF α , que provocam sintomas semelhantes à de síndrome do choque tóxico (HOLSCHER, C. et al, 2000). Estudos mais recentes, entretanto, têm gerado contradição no que diz respeito à importância de IL-10 para o controle parasitário. De fato, Roffe e colaboradores demonstraram que animais geneticamente deficientes de IL-10 apresentam maiores índices parasitêmicos no tecido e no sangue periférico (ROFFE, E. et al, 2012). Mais contraditório ainda é a importância da IL-10 no diabetes autoimune. Enquanto o tratamento de animais NOD com IL-10 recombinante reduz a incidência de diabetes nestes animais (ZHENG, X.X. et al, 1997), a expressão transgênica de IL-10 em células beta-pancreáticas acelera o desenvolvimento da doença (WOGENSEN, L. et al, 1994). Por outro lado, Serreze e colaboradores mostraram que animais NOD.IL-10 $-/-$ não

diferem de animais selvagens quanto ao desenvolvimento do diabetes (SERREZE, D.V. et al, 2001).

De importância menos estabelecida na doença de Chagas estão as células Treg. Estas células, caracterizadas pela expressão do Foxp3 e CD25, têm sido descritas como pivô na regulação do sistema imune, atuando em sua manutenção homeostática (FONTENOT, J.D. et al, 2003; HORI, S. 2003), bem como na supressão observado em transplantes (BURRELL, B.E. et al, 2012), tumores (WHITESIDE, T.L. et al, 2012) e doenças infecciosas (BELKAID, Y., 2008). Na infecção pelo *T. cruzi*, entretanto, há poucos estudos, e um consenso ainda não foi estabelecido. A maioria dos experimentos foi realizada durante a fase aguda, depletando-se as populações CD25+ antes da infecção. Um dos grupos encontrou aumento de parasitemia e mortalidade com o tratamento (MARIANO, F.S. et al., 2008), enquanto outro verificou o contrário (TONELLI, R.R. et al., 2011). Já um terceiro estudo grupo não encontrou diferença entre os grupos (KOTNER, J. & TARLETON, R., 2007).

No presente estudo verificamos que as células Treg aumentam proporcionalmente logo no início da infecção, aos 4 dias, independente da linhagem (Figura 15 e dados não mostrados). É possível que este aumento seja decorra de uma produção inicial de IL-2 (HOFER, T. et al, 2012), e contribua para o atraso da resposta de T CD8+ (CHAPPERT, P. et al, 2010; KASTENMULLER, W. et al, 2011) observado por diversos estudos na infecção pelo *T. cruzi* (PADILLA, M.A. et al, 2009A). Entretanto, após o décimo dia, a proporção de células Treg diminui, atingindo valores mínimos ao 40º dia pós-infecção (Figura 10). Isto provavelmente não é decorrente de uma migração para os sítios inflamatórios, uma vez que a presença destas células no músculo é mínima (Figura 11). Ao invés disso, é provável que se dê por morte celular, em função do aumento de expressão do CD25 sobre as células T efetoras (Figura 10A), o que as tornam competidoras eficazes pelo IL-2 presente no microambiente de apresentação antigênica, e, portanto, permitem a expansão destas em detrimento das Treg (HOFER, T. et al, 2012), resultando na efetivação da resposta ao parasita.

Ao comparar animais BALB/c e NOD, observamos que a primeira linhagem possui quantidades significativamente maiores de células Treg (Figura 9 e 10). Isto não se relaciona com a maior celularidade observado no BALB/c, principalmente em se tratando de linfócitos T CD8 (Figura 4), uma vez que se tem descrito que as Treg

limitam a expansão destas células (MCNALLI, A. et al, 2011; DE GOER DE HERVE, M.G. et al, 2012). Entretanto, o fato de ocorrer justamente o inverso, sugere que outro mecanismo participa do controle de expansão de células T CD8 em animais NOD infectados pelo *T. cruzi*.

De fato, a análise de outras populações celulares mostrou que em animais NOD infectados, há aumento significativo de células CD11b+Gr1+ no baço, quando comparado a animais BALB/c (Figura 12). O Gr1 (comumente identificado pelo RB6-8C5) é expresso por um grupo heterogêneo de células de origem mielóide, notadamente granulócitos, subpopulação de monócitos e macrófagos (DALEY, J.M. et al, 2008), células dendríticas plasmocitóides (NAKANO, H. et al, 2001) e células supressoras mielóides (KUSMARTSEV, S.A. et al, 2000). Por citometria de fluxo, identificamos que este anticorpo é capaz de depletar ao menos três diferentes populações celulares (Figuras 18 e 19). A separação de células esplênicas Gr1+ (por citometria de fluxo, com 85% de pureza) de animais NOD infectados, e posterior análise citológica, mostraram que grande parte destas células têm aparência neutrofílica com núcleo em formato de anel, e em menor proporção, aparência monocítica (Figura 20A).

A identificação de diferentes populações celulares pelo RB6-8C5 têm sido relatado por diversos autores, e isto parece se dar devido ao fato deste anticorpo reconhecer um epítipo comum ao Ly6G e Ly-6C sob células de origem mielóide (FLEMING, T.J. et al, 1993). Há controvérsia contudo, quanto ao reconhecimento de linfócitos pelo RB6-8C5: alguns estudos indicam que reconhece o Ly-6C expresso por linfócitos T CD8+ (TATE, M.D. et al, 2009), enquanto outros mostram que não (NAGENDRA, S. & SCHLUETER, A.J., 2004). Há a possibilidade, entretanto, do RB6-8C5 não reconhecer o Ly-6C em animais NOD, como sugerido por Fu e colaboradores (FU, W. et al, 2012).

As células supressoras de origem mielóides (MDSC) são células capazes de suprimir a expansão de linfócitos T (VIRTUOSO, L.P. et al, 2012). São uma população heterogênea de células imaturas que, devido a variadas condições patogênicas, têm seu desenvolvimento parcialmente bloqueado, e acumulam-se no baço e infiltrados inflamatórios (revisto em GABRILOVICH, D.I. & NAGARAJ, S., 2009). De fato, estudos mostraram que a administração de LPS e IFN γ é capaz de inibir o

desenvolvimento de células dendríticas a partir de precursores mielóides, levando ao desenvolvimento de MDSC com características granulocíticas e monocíticas (GREIFENBERG, V. et al, 2009).

Duas principais populações de MDSC têm sido descritas: uma polimorfonuclear (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{neg}) e outra mononuclear (CD11b⁺ Ly6G^{neg} Ly6c⁺), ambas positivas para Gr1 e CD11b (MOVAHEDI, K. et al, 2008). Elas são capazes de inibir a proliferação de células T CD8⁺, por mecanismo independente de MHC de classe I, mas dependente de IFN γ e, no caso da monocítica, também dependente de NO (MOVAHEDI, K. et al, 2008). Embora estas células sejam extensivamente estudadas em tumores, sua participação, em doenças infecciosas e autoimunes tem sido menos abordado. Em nosso estudo observamos que a infecção com o *T. cruzi* induz alteração das populações Gr1⁺ no sangue periférico (Figura 18), e acúmulo da subpopulação granulocítica no baço de animais NOD (Figura 12 e 20A). A depleção destas células a partir do sétimo dia pós-infecção, pela administração de anti-Gr1 (RB6-8C5), induz aumento de linfócitos CD8⁺ no baço destes animais, mas não de linfócitos CD4⁺ (Figura 22B). Este aumento numérico é acompanhado de um incremento na capacidade destas células CD8⁺ em produzir IFN γ após estímulo com anti-CD3 (Figura 23B), indicando que ao menos uma das populações Gr1⁺ induzidas pela infecção é capaz não apenas de inibir a proliferação destes linfócitos, como também de responderem efetivamente à uma estimulação antigênica. Este efeito de células Gr1⁺ sobre células T CD8 e sua produção de IFN γ é semelhante ao descrito em outros estudos, embora em modelo experimental não relacionado (HAVERKAMP, J.M. et al, 2011).

A depleção de células Gr1⁺ também induz diabetes em animais NOD, outrora protegidos pela infecção com o *T. cruzi* (Figura 21). Resultados semelhantes foram relatados na proteção do diabetes induzida por anti-CD20 (HU, C. et al, 2012). Analisando os dados em conjunto, pode-se especular que a população Gr1⁺ esteja sendo induzida em animais NOD como resposta à infecção, e inibindo a progressão da destruição das ilhotas de Langerhans através de uma supressão *bystander* de células T CD8⁺ específicas para antígenos β -pancreáticos (Figura 30), uma vez que linfócitos T CD8 são essenciais para o desenvolvimento do diabetes (WONG, F.S. et al, 1996).

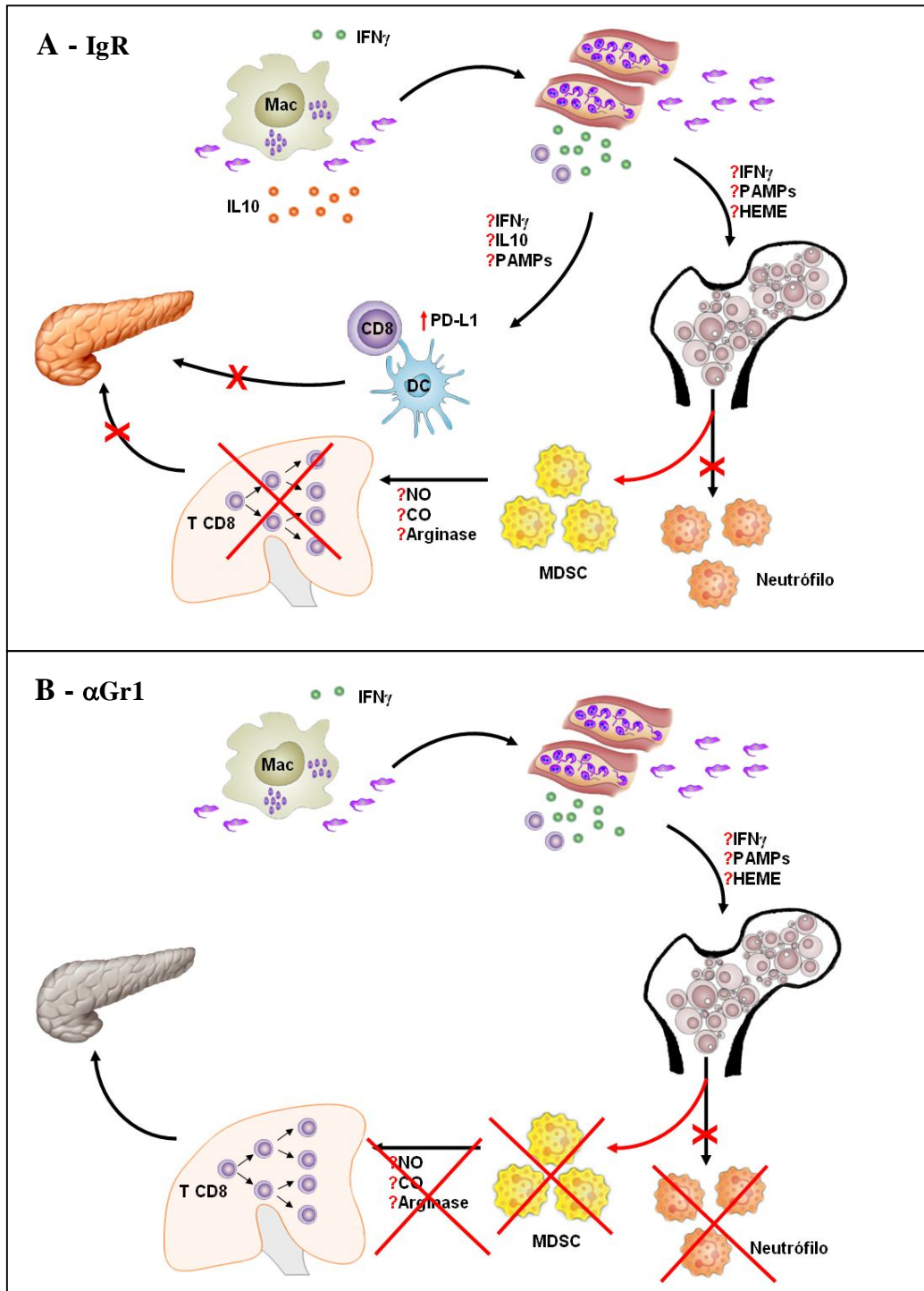


Figura 30. Desenho esquemático ilustrando como a infecção pelo *T. cruzi* pode estar inibindo o desenvolvimento do diabetes tipo I em animais NOD, e como a depleção de células Gr1+ pode estar revertendo este efeito. A) animais NOD infectados e B) animais NOD infectados cujas células Gr1+ foram depletadas. NO = óxido nítrico, CO = monóxido de carbono, MDSC = célula supressora de origem mielóide.

A inibição no desenvolvimento espontânea do diabetes em animais NOD é verificada também em outros modelos de infecção, seja por bactérias, protozoários ou helmintos (revisto em ZACCONE, P. & COOKE, A., 2011). Entretanto, poucos destes estudos relatam que tal proteção se mantém mesmo após estímulo diabetogênico, como por exemplo, o tratamento com ciclofosfamida (NEWLAND, S.A. et al, 2011). Aqui mostramos que os animais NOD fêmeas infectados pelo *T. cruzi* estão protegidos do desenvolvimento do diabetes ainda que tratados com esta droga (Figura 14). O mecanismo responsável por esta robusta proteção parece ser diverso e complexo, de modo que, além das células Gr1+, outros mecanismos podem estar contribuindo para esta inibição. Isto porque esta proteção se estende para além da fase aguda da infecção (Figura 1), quando as células Gr1+ reduzem consideravelmente (Figura 12). Além disso, apenas metade dos animais NOD desenvolve o diabetes após depleção das populações Gr1+ (Figura 21).

Dentre os mecanismos em potencial que certamente poderiam estar atuando encontram-se as células Treg. De fato, alguns estudos indicam para um papel crucial destas células na proteção contra o diabetes em animais NOD (TIAN, B. et al, 2009; BETTINI, M.L. et al, 2012) . Entretanto, ao analisarmos a dinâmica destas células durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, verificamos que, apesar de um leve aumento ao 4º dia, ocorre uma progressiva redução de sua proporção frente às células T convencionais (Figura 15). Além do mais, o tratamento com ciclofosfamida, uma droga com citotoxicidade preferencial para Tregs em detrimento de células T convencionais (LUTSIK, M.E. et al, 2005), não é capaz de induzir o diabetes nos animais infectados (Figura 14). Deste modo, a menos que a infecção proporcione um redirecionamento ou incremento da funcionalidade das células Treg (o que pode ser futuramente investigado), é pouco provável que estas células sejam as responsáveis pela proteção ao diabetes observado durante a fase aguda (NEWLAND, S.A. et al, 2011).

Embora as Tregs não pareçam ter papel na proteção ao diabetes durante a infecção pelo *T. cruzi*, o mesmo não pode ser afirmado no modelo do diabetes acelerada por ciclofosfamida. De fato o tratamento com uma única dose de ciclofosfamida reduz drasticamente o número de células T CD4+ CD25+ Foxp3+ no baço de animais NOD fêmeas a níveis semelhantes ao encontrado em animais que desenvolveram espontaneamente o diabetes (Figura 27). Estes dados ratificam estudos já publicados utilizando-se animais machos (BRODE, S. et al, 2006). Entretanto, diferente do baço, as

quantidades de células F_{oxp3}⁺ nos infiltrados do pâncreas não se encontram reduzidas com o tratamento (Figura 28A). A explicação para isto pode estar no fato de que células CD25 ciclam continuamente em resposta à constante estimulação por antígenos próprios (LUTSIAK, M.E. et al, 2005), e que portanto são preferencialmente eliminados pela ciclofosfamida (Figura 28B). Por outro lado, células F_{oxp3}⁺ CD25^{neg} seriam células menos sensíveis ao tratamento com ciclofosfamida, pois constituem um reservatório periférico, cujas células são recrutadas para o grupo de células CD25⁺ em condições de linfopenia, através de expansão homeostática ou ativação (ZELENAY, S. et al, 2005). Contraditoriamente, animais que desenvolvem espontaneamente o diabetes possuem quase o dobro de células F_{oxp3}⁺ no pâncreas, comparado a animais não diabéticos de mesma idade (Figura 28A). A importância deste achado deve ser futuramente investigada, uma vez que está descrito que a simples expressão de F_{oxp3} em uma célula T CD4, mesmo na ausência do CD25, é capaz de conferir capacidade supressora a esta, tanto nos órgãos linfóides periféricos (KHATTRI, R. et al, 2003; FONTENOT, J.D. et al, 2005), quanto nos sítios inflamatórios (BORSELLINO, G. et al, 2007).

Outro mecanismo que poderia estar atuando na inibição do diabetes, mas cuja importância difere entre os modelos acima descritos, é o eixo PD1/PDL1. O PD-L1 está presente constitutivamente em grande parte das células hematopoiéticas maduras, e sua expressão é aumentada após a ativação celular (KEIR, M.E. et al., 2008). Ele é capaz de se ligar ao PD-1 expresso por células T ativadas ou ao B7.1 de células dendríticas, sendo que ambos desencadeiam sinais supressores (BUTTE, M.J. et al, 2007; revisto em RILEY, J.L., 2009). A participação do eixo PD-1/PD-L1 têm sido extensivamente estudado no diabetes autoimune, com resultados promissores não só nesta, mas também em outras doenças autoimunes, em tumores e em certas doenças virais crônicas (revisto em FRANCISCO, L.M. et al, 2010; e em FLIES, D.B. et al, 2011). Particularmente no diabetes autoimune, Ansari e colaboradores demonstraram a importância do eixo PD-1/PD-L1, ao verificarem que o bloqueio de PD-1 ou PD-L1 é capaz de precipitar a doença em animais NOD, independente da idade (ANSARI, M.J. et al, 2003).

Identificamos que a infecção pelo *T. cruzi* induz aumento na expressão de PD-L1 em células esplênicas e do linfonodo pancreático (Figura 16A), confirmando achado relacionado de outro grupo (DULGERIAN, L.R. et al, 2011). Este aumento não é específico a determinada população celular, mas sim generalizada, sendo observado em

células dendríticas (Figura 16B), linfócitos T CD4, T CD8 e linfócitos B (dados não mostrados), e pode ser induzido também *in vitro* pela cultura de esplenócitos com o parasita, vivo ou morto (dados não mostrados). Este aumento, entretanto, é observado na fase inicial da infecção, sendo que aos 40 dias já há redução a níveis semelhantes ao de animais não infectados (Figura 16A). Tudo isto leva a crer que uma ou mais citocinas estejam participando deste fenômeno. De fato, Kinter e colaboradores mostraram que citocinas que compartilham a cadeia γ comum são capazes de induzir *in vitro* a expressão de PD-1 e PD-L1 diretamente em linfócitos T e, de forma indireta, a expressão de PD-L1 e PD-L2 em macrófagos (KINTER, A.L. et al, 2008). Por outro lado, e contrariando os achados *in vivo*, não foi observado aumento na expressão de PD-L1 em cultura de células do linfonodo pancreático, através da estimulação *in vitro* com o parasita (dados não mostrados). É possível que alguma população celular que esteja presente no baço, contudo ausente no linfonodo (ou ao menos presente em quantidades insuficientes), seja necessária para que isto aconteça.

O aumento na expressão de PD-L1 com a infecção é precoce (Figura 16A), em comparação ao PD-1. Este último só aumenta no final da fase aguda, ou seja, durante o período de contração linfocitária (Figuras 16 e 17). Além disso, a expressão de PD-1 difere espacialmente, com células T CD4 expressando PD-1 nos órgãos linfóides periféricos, enquanto as células T CD8 o expressa nos sítios inflamatórios (Figura 17). Este mecanismo de expressão diferencial utiliza, como ponto de controle, a expressão do PD-1 em linfócitos T e permite que a resposta efetora ao parasita se estabeleça. Experimentos futuros devem ser realizados para verificar se este aumento de PD-1 observado em animais infectados atinge clones específicos para antígenos beta-pancreáticos. É necessário investigar também a capacidade tolerogênica das células dendríticas PD-L1+ sobre estes linfócitos, uma vez que grande parte das células CD11c+ passam a expressar o PD-L1 juntamente com o CD40 (Figura 16B), um marcador de ativação destas células (INOUE, S. et al, 2012)

Embora os animais que desenvolvem diabetes espontaneamente apresentem diminuição da expressão de PD-L1 sobre linfócitos T, notadamente em células T CD4 (YADAV, D. et al, 2009), o mesmo não é verificado na indução do diabetes por ciclofosfamida (Figura 29). Este achado corrobora os dados de Newland e colaboradores. Utilizando um modelo de infecção de camundongos NOD por *S. typhimurium* semelhante ao aqui apresentado, estes autores verificaram que o eixo PD-

L1/PD-1 é o responsável pela proteção contra o diabetes nestes animais, e que a administração de ciclofosfamida não era capaz de reverter tal proteção (NEWLAND, S.A. et al, 2011). Contudo, verificamos que a depleção de células Gr1+ é capaz de reverter o papel protetor da infecção pelo *T. cruzi* (Figura 21), mesmo que este induza aumento na expressão de PD-L1 (Figura 16). O mecanismo responsável por isto pode estar envolvendo a indução da expressão de PD-L2 em células CD11b+, observado em animais NOD infectados após tratamento com anti-Gr1 (Figura 24). Embora a função destas células não tenha sido aqui estudada, é possível que participem contrabalanceando o aumento do PD-L1 observado com a infecção. Isto porque o PD-L2 compete com o PD-L1 pela ligação ao PD-1, com a vantagem de possuir 2 a 6 vezes maior afinidade por este (YOUNGNAK, P. et al, 2003). Diferente do PD-L1 entretanto, o PD-L2 tem sido descrito com papel ambíguo dependendo do modelo experimental, atuando em vários deles como molécula co-estimulatória (LIANG, S.C. et al, 2006; TSENG, S.Y. et al, 2001). De fato, no modelo de infecção pelo *T. cruzi*, enquanto o PD-L1 desempenha atividade supressora, o PD-L2 é importante para o controle parasitário (DULGERIAN, L.R. et al, 2011).

Outros mecanismos podem estar colaborando para a proteção ao diabetes induzida pela infecção. Como indica a figura 25, a hipoclonalidade pode estar relacionado ao desenvolvimento do diabetes tipo I, visto que o tratamento com a ciclofosfamida induz a doença precocemente em animais NOD que possuem menor número de células esplênicas, quando comparado aos tratados que ainda não ficaram diabéticos. Assim, o aumento da celularidade e de clones T poderiam estar envolvidos em mecanismo da regulação da memória efetora de T CD8, que claramente se alterada com a infecção no modelo experimental descrito, e onde não há desenvolvimento de diabetes. Por outro lado, o papel de células NKT na regulação da atividade efetora de células T utilizando-se inibidores ou modelos ausentes da molécula de CD1 pode ser útil para estudos futuros, no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na inibição do diabetes durante a infecção. Isto porque células NKT invariáveis aumentam na infecção pelo *T. cruzi* (ANTUNEZ, M.I. & CARDONI, R.L., 2004) e são capazes de inibir o desenvolvimento do diabetes após ativação mediada por células CD1d+ carregadas com glicolipídios (SHARIF, S. et al, 2001). Experimentos futuros devem ser realizados para esclarecer o papel destes mecanismos no diabetes autoimune.

6 - CONCLUSÕES

-Animais NOD são mais susceptíveis que animais BALB/c à infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi*.

- Esta maior susceptibilidade está correlacionado a uma menor expansão de células T CD8 efetora, bem como uma menor produção inicial de IFN γ e IL-17 e maior produção de IL-10 por esplenócitos.

-A infecção pelo *T. cruzi* inibe o desenvolvimento do diabetes autoimune em animais NOD.

-A depleção de células Gr1+ é capaz de reverter a proteção ao diabetes induzida pela infecção com o *T. cruzi*.

-Alterações na expressão de PD-L1 está correlacionado com o desenvolvimento espontâneo do diabetes, bem como com a proteção mediada pelo *T. cruzi*. Entretanto, não mostrou relação com o diabetes induzida pela ciclofosfamida.

-Há diminuição da proporção de células Treg com a infecção, bem como com o tratamento com ciclofosfamida, embora ocorra proteção ao diabetes no primeiro, e aceleração no segundo.

-Múltiplos mecanismos colaboram para a proteção contra o desenvolvimento da diabetes autoimune

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, p. 231-44, 1996.
- ACHA-ORBEA, H.; MCDEVITT, H. O. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 8, p. 2435-9, 1987.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, p. S64-71, 2012.
- ADAMS, A.; MACDERMOTT, E. J.; LEHMAN, T. J. Pharmacotherapy of lupus nephritis in children: a recommended treatment approach. **Drugs**, v. 66, n. 9, p. 1191-207, 2006.
- AGATA, Y.; KAWASAKI, A.; NISHIMURA, H.; ISHIDA, Y.; TSUBATA, T.; YAGITA, H.; HONJO, T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **Int Immunol**, v. 8, n. 5, p. 765-72, 1996.
- ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1961-7, 1996.
- ALMEIDA-LEITE, C. M.; GALVAO, L. M.; AFONSO, L. C.; CUNHA, F. Q.; ARANTES, R. M. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. **Neurobiol Dis**, v. 25, n. 1, p. 170-8, 2007.
- ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 8, p. 6627-40, 2011.
- ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 447-85, 2005.
- ANDRADE, S. G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A., *et al* (Ed.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 11, p.177-200.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHAES, J. B.; NETTO, M. B. 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, 1985.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B. Biodemes and zymodemes of Trypanosoma cruzi strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1996.

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

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

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am J Pathol**, v. 127, n. 3, p. 467-73, 1987.

ANSARI, M. J.; SALAMA, A. D.; CHITNIS, T.; SMITH, R. N.; YAGITA, H.; AKIBA, H.; YAMAZAKI, T.; AZUMA, M.; IWAI, H.; KHOURY, S. J.; AUCHINCLOSS, H., JR.; SAYEGH, M. H. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. **J Exp Med**, v. 198, n. 1, p. 63-9, 2003.

ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. *Trypanosoma cruzi*: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection. **Exp Parasitol**, v. 106, n. 3-4, p. 85-94, 2004.

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

ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature**, v. 181, n. 4613, p. 931, 1958.

ARNUSH, M.; SCARIM, A. L.; HEITMEIER, M. R.; KELLY, C. B.; CORBETT, J. A. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. **J Immunol**, v. 160, n. 6, p. 2684-91, 1998.

ASKENASE, P. W.; HAYDEN, B. J.; GERSHON, R. K. Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. **J Exp Med**, v. 141, n. 3, p. 697-702, 1975.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, 2001.

ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 601-4, 1999.

BACH, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev**, v. 15, n. 4, p. 516-42, 1994.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, 2006.

BAGER, P.; VINKEL HANSEN, A.; WOHLFAHRT, J.; MELBYE, M. Helminth infection does not reduce risk for chronic inflammatory disease in a population-based cohort study. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 55-62, 2012.

BARRETT, J. C.; CLAYTON, D. G.; CONCANNON, P.; AKOLKAR, B.; COOPER, J. D.; ERLICH, H. A.; JULIER, C.; MORAHAN, G.; NERUP, J.; NIERRAS, C.; PLAGNOL, V.; POCIOT, F.; SCHUILENBURG, H.; SMYTH, D. J.; STEVENS, H.; TODD, J. A.; WALKER, N. M.; RICH, S. S. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nat Genet**, v. 41, n. 6, p. 703-7, 2009.

BAXTER, A. G.; MANDEL, T. E. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 9, p. 2051-5, 1991.

BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 4, p. 918-21, 2008.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 551-89, 2009.

BETTINI, M. L.; PAN, F.; BETTINI, M.; FINKELSTEIN, D.; REHG, J. E.; FLOESS, S.; BELL, B. D.; ZIEGLER, S. F.; HUEHN, J.; PARDOLL, D. M.; VIGNALI, D. A. Loss of epigenetic modification driven by the Foxp3 transcription factor leads to regulatory T cell insufficiency. **Immunity**, v. 36, n. 5, p. 717-30, 2012.

BINGISSER, R. M.; TILBROOK, P. A.; HOLT, P. G.; KEES, U. R. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. **J Immunol**, v. 160, n. 12, p. 5729-34, 1998.

BINGLEY, P. J.; GALE, E. A. Progression to type 1 diabetes in islet cell antibody-positive relatives in the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial: the role of additional immune, genetic and metabolic markers of risk. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 881-90, 2006.

BONIFACIO, E.; ATKINSON, M.; EISENBARTH, G.; SERREZE, D.; KAY, T. W.; LEE-CHAN, E.; SINGH, B. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2451-8, 2001.

BORSELLINO, G.; KLEINWIETFIELD, M.; DI MITRI, D.; STERNJAK, A.; DIAMANTINI, A.; GIOMETTO, R.; HOPNER, S.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; DELL'ACQUA, M. L.; ROSSINI, P. M.; BATTISTINI, L.; ROTZSCHKE, O.; FALK, K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1225-32, 2007.

BOSMA, A.; ABDEL-GADIR, A.; ISENBERG, D. A.; JURY, E. C.; MAURI, C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 477-90, 2012.

BROCK, N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. **Cancer**, v. 78, n. 3, p. 542-7, 1996.

BROCK, N.; HOHORST, H. J. Metabolism of cyclophosphamide. **Cancer**, v. 20, n. 5, p. 900-4, 1967.

BRODE, S.; RAINE, T.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6603-12, 2006.

BRODSKY, R. A. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. **ScientificWorldJournal**, v. 2, p. 1808-15, 2002.

BRONTE, V.; WANG, M.; OVERWIJK, W. W.; SURMAN, D. R.; PERICLE, F.; ROSENBERG, S. A.; RESTIFO, N. P. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. **J Immunol**, v. 161, n. 10, p. 5313-20, 1998.

BURNET, S. F. M. **The clonal selection theory of acquired immunity**. Vanderbilt University Press Nashville, 1959.

BURRELL, B. E.; NAKAYAMA, Y.; XU, J.; BRINKMAN, C. C.; BROMBERG, J. S. Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation. **J Immunol**, v. 189, n. 10, p. 4705-11, 2012.

BUTTE, M. J.; KEIR, M. E.; PHAMDUY, T. B.; SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 111-22, 2007.

CARDILLO, F.; CUNHA, F. Q.; TAMASHIRO, W. M.; RUSSO, M.; GARCIA, S. B.; MENGEL, J. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand J Immunol**, v. 55, n. 1, p. 96-104, 2002.

CARDILLO, F.; NIHEI, J.; MENGEL, J. **NKT cell expansion in absence of B cells may be related to an increased regulatory NKT cell function during *Trypanosoma cruzi* infection** European Congress of Immunology. Glasgow-UK: Immunology 2012.

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

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

CARTER, L.; FOUSER, L. A.; JUSSIF, J.; FITZ, L.; DENG, B.; WOOD, C. R.; COLLINS, M.; HONJO, T.; FREEMAN, G. J.; CARRENO, B. M. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 3, p. 634-43, 2002.

CARVALHO, C. M.; SILVERIO, J. C.; DA SILVA, A. A.; PEREIRA, I. R.; COELHO, J. M.; BRITTO, C. C.; MOREIRA, O. C.; MARCHEVSKY, R. S.; XAVIER, S. S.; GAZZINELLI, R. T.; DA GLORIA BONECINI-ALMEIDA, M.; LANNES-VIEIRA, J. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma*

cruzi-infected rhesus monkeys: association with heart injury. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1644, 2012.

CASSATELLA, M. A.; BAZZONI, F.; FLYNN, R. M.; DUSI, S.; TRINCHIERI, G.; ROSSI, F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. **J Biol Chem**, v. 265, n. 33, p. 20241-6, 1990.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana; estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 1, n. 1, p. 159-218, 1909.

CHANDRA, M.; TANOWITZ, H. B.; PETKOVA, S. B.; HUANG, H.; WEISS, L. M.; WITTNER, M.; FACTOR, S. M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L. A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). **Int J Parasitol**, v. 32, n. 7, p. 897-905, 2002.

CHANG, W. S.; KIM, J. Y.; KIM, Y. J.; KIM, Y. S.; LEE, J. M.; AZUMA, M.; YAGITA, H.; KANG, C. Y. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 6707-10, 2008.

CHAPPERT, P.; LEBOEUF, M.; RAMEAU, P.; LALFER, M.; DESBOIS, S.; LIBLAU, R. S.; DANOS, O.; DAVOUST, J. M.; GROSS, D. A. Antigen-specific Treg impair CD8(+) T-cell priming by blocking early T-cell expansion. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 2, p. 339-50, 2010.

CHATZIGEORGIOU, A.; HALAPAS, A.; KALAFATAKIS, K.; KAMPER, E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In Vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-58, 2009.

CHEMNITZ, J. M.; PARRY, R. V.; NICHOLS, K. E.; JUNE, C. H.; RILEY, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 945-54, 2004.

CHESSLER, A. D.; CARADONNA, K. L.; DA'DARA, A.; BURLEIGH, B. A. Type I interferons increase host susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 2112-9, 2011.

CHO, H. Y.; LEE, S. W.; SEO, S. K.; CHOI, I. W.; CHOI, I. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v. 1779, n. 12, p. 811-9, 2008.

COBBOLD, S. P.; ADAMS, E.; GRACA, L.; DALEY, S.; YATES, S.; PATERSON, A.; ROBERTSON, N. J.; NOLAN, K. F.; FAIRCHILD, P. J.; WALDMANN, H. Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance. **Immunol Rev**, v. 213, p. 239-55, 2006.

CONDAMINE, T.; GABRILOVICH, D. I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. **Trends Immunol**, v. 32, n. 1, p. 19-25, 2011.

CONNORS, T. A.; COX, P. J.; FARMER, P. B.; FOSTER, A. B.; JARMAN, M. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. **Biochem Pharmacol**, v. 23, n. 1, p. 115-29, 1974.

COOKE, A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 12-7, 2009.

COOPER, M. D.; HERRIN, B. R. How did our complex immune system evolve? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 1, p. 2-3, 2010.

CRIPPS, J. G.; GORHAM, J. D. MDSC in autoimmunity. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 7, p. 789-93, 2011.

CRIPPS, J. G.; WANG, J.; MARIA, A.; BLUMENTHAL, I.; GORHAM, J. D. Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver. **Hepatology**, v. 52, n. 4, p. 1350-9, 2010.

CUERVO, H.; GUERRERO, N. A.; CARBAJOSA, S.; BESCHIN, A.; DE BAETSELIER, P.; GIRONES, N.; FRESNO, M. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2656-65, 2011.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 626-35, 2009.

DA MATTA GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010.

DAHLEN, E.; DAWE, K.; OHLSSON, L.; HEDLUND, G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3585-93, 1998.

DALEY, J. M.; THOMAY, A. A.; CONNOLLY, M. D.; REICHNER, J. S.; ALBINA, J. E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 1, p. 64-70, 2008.

DE GOER DE HERVE, M. G.; JAAFOURA, S.; VALLEE, M.; TAOUFIK, Y. FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory. **Nat Commun**, v. 3, p. 986, 2012.

DELANO, M. J.; SCUMPIA, P. O.; WEINSTEIN, J. S.; COCO, D.; NAGARAJ, S.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; O'MALLEY, K. A.; WYNN, J. L.; ANTONENKO, S.; AL-QURAN, S. Z.; SWAN, R.; CHUNG, C. S.; ATKINSON, M. A.; RAMPHAL, R.; GABRILOVICH, D. I.; REEVES, W. H.; AYALA, A.; PHILLIPS, J.; LAFACE, D.; HEYWORTH, P. G. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-

1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. **J Exp Med**, v. 204, n. 6, p. 1463-74, 2007.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 2, p. 108-17, 2000.

DOLCETTI, L.; PERANZONI, E.; UGEL, S.; MARIGO, I.; FERNANDEZ GOMEZ, A.; MESA, C.; GEILICH, M.; WINKELS, G.; TRAGGIALI, E.; CASATI, A.; GRASSI, F.; BRONTE, V. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 1, p. 22-35, 2010.

DONG, H.; ZHU, G.; TAMADA, K.; CHEN, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nat Med**, v. 5, n. 12, p. 1365-9, 1999.

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

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

DULGERIAN, L. R.; GARRIDO, V. V.; STEMPIN, C. C.; CERBAN, F. M. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v. 133, n. 1, p. 29-40, 2011.

DUNMORE, S. J.; BROWN, J. E. The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. **J Endocrinol**, v. 216, n. 1, p. T37-45, 2013.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, n. 21, p. 1360-8, 1986.

ERBE, D. V.; COLLINS, J. E.; SHEN, L.; GRAZIANO, R. F.; FANGER, M. W. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. **Mol Immunol**, v. 27, n. 1, p. 57-67, 1990.

FALCONE, M.; FACCIOTTI, F.; GHIDOLI, N.; MONTI, P.; OLIVIERI, S.; ZACCAGNINO, L.; BONIFACIO, E.; CASORATI, G.; SANVITO, F.; SARVETNICK, N. Up-regulation of CD1d expression restores the immunoregulatory function of NKT cells and prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol**, v. 172, n. 10, p. 5908-16, 2004.

FEHERVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4+ Tregs and immune control. **J Clin Invest**, v. 114, n. 9, p. 1209-17, 2004.

FLEMING, T. J.; FLEMING, M. L.; MALEK, T. R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. **J Immunol**, v. 151, n. 5, p. 2399-408, 1993.

FLIES, D. B.; SANDLER, B. J.; SZNOL, M.; CHEN, L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. **Yale J Biol Med**, v. 84, n. 4, p. 409-21, 2011.

FOLEY, G. E.; FRIEDMAN, O. M.; DROLET, B. P. Studies on the mechanism of action of cytoxan. Evidence of activation in vivo and in vitro. **Cancer Res**, v. 21, p. 57-63, 1961.

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

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1142-51, 2005.

FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunol Rev**, v. 236, p. 219-42, 2010.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L. J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M. C.; HORTON, H. F.; FOUSSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M. R.; CARRENO, B. M.; COLLINS, M.; WOOD, C. R.; HONJO, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027-34, 2000.

FU, W.; WOJTKIEWICZ, G.; WEISSLEDER, R.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 361-8, 2012.

GABRILOVICH, D.; ISHIDA, T.; OYAMA, T.; RAN, S.; KRAVTSOV, V.; NADAF, S.; CARBONE, D. P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. **Blood**, v. 92, n. 11, p. 4150-66, 1998.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 3, p. 162-74, 2009.

GAO, C. Q.; SAWICKI, G.; SUAREZ-PINZON, W. L.; CSONT, T.; WOZNIAK, M.; FERDINANDY, P.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 2, p. 426-33, 2003.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, n. 5, p. 723-37, 1970.

GHIRINGHELLI, F.; LARMONIER, N.; SCHMITT, E.; PARCELLIER, A.; CATHELIN, D.; GARRIDO, C.; CHAUFFERT, B.; SOLARY, E.; BONNOTTE, B.; MARTIN, F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 2, p. 336-44, 2004.

- GIARRATANA, N.; PENNA, G.; ADORINI, L. Animal models of spontaneous autoimmune disease: type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse. **Methods Mol Biol**, v. 380, p. 285-311, 2007.
- GINZLER, E. M.; DOOLEY, M. A.; ARANOW, C.; KIM, M. Y.; BUYON, J.; MERRILL, J. T.; PETRI, M.; GILKESON, G. S.; WALLACE, D. J.; WEISMAN, M. H.; APPEL, G. B. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. **N Engl J Med**, v. 353, n. 21, p. 2219-28, 2005.
- GONI, O.; ALCAIDE, P.; FRESNO, M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. **Int Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1125-34, 2002.
- GRABIE, N.; GOTSMAN, I.; DACOSTA, R.; PANG, H.; STAVRAKIS, G.; BUTTE, M. J.; KEIR, M. E.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H.; LICHTMAN, A. H. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart. **Circulation**, v. 116, n. 18, p. 2062-71, 2007.
- GREIFENBERG, V.; RIBECHINI, E.; ROSSNER, S.; LUTZ, M. B. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 10, p. 2865-76, 2009.
- GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; OLIVEIRA, C. J.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, G. K.; CAMPANELLI, A. P.; MILANEZI, C. M.; AZUMA, M.; HONJO, T.; TEIXEIRA, M. M.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 1873-81, 2011.
- HAMMOND, K. J.; PELLICCI, D. G.; POULTON, L. D.; NAIDENKO, O. V.; SCALZO, A. A.; BAXTER, A. G.; GODFREY, D. I. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1164-73, 2001.
- HARADA, M.; MAKINO, S. Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. **Diabetologia**, v. 27, n. 6, p. 604-6, 1984.
- HARIBHAI, D.; WILLIAMS, J. B.; JIA, S.; NICKERSON, D.; SCHMITT, E. G.; EDWARDS, B.; ZIEGELBAUER, J.; YASSAI, M.; LI, S. H.; RELLAND, L. M.; WISE, P. M.; CHEN, A.; ZHENG, Y. Q.; SIMPSON, P. M.; GORSKI, J.; SALZMAN, N. H.; HESSNER, M. J.; CHATILA, T. A.; WILLIAMS, C. B. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. **Immunity**, v. 35, n. 1, p. 109-22, 2011.
- HAVERKAMP, J. M.; CRIST, S. A.; ELZEY, B. D.; CIMEN, C.; RATLIFF, T. L. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 3, p. 749-59, 2011.
- HOFER, T.; KRICHEVSKY, O.; ALTAN-BONNET, G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. **Front Immunol**, v. 3, p. 268, 2012.
- HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313-8, 1999.

HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHAUB, G. A.; MOSSMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4075-83, 2000.

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, 2003.

HSIEH, C. S.; LEE, H. M.; LIO, C. W. Selection of regulatory T cells in the thymus. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 3, p. 157-67, 2012.

HU, C.; DU, W.; ZHANG, X.; WONG, F. S.; WEN, L. The role of Gr1+ cells after anti-CD20 treatment in type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. **J Immunol**, v. 188, n. 1, p. 294-301, 2012.

HU, Y.; NAKAGAWA, Y.; PURUSHOTHAM, K. R.; HUMPHREYS-BEHER, M. G. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. **Am J Physiol**, v. 263, n. 4 Pt 1, p. E607-14, 1992.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3311-6, 1997.

HYTTINEN, V.; KAPRIO, J.; KINNUNEN, L.; KOSKENVUO, M.; TUOMILEHTO, J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 1052-5, 2003.

IDF. **IDF Diabetes Atlas**. 5 edição. Bruxelas-Belgica: International Diabetes Federation, 2011.

INOUE, S.; NIIKURA, M.; TAKEO, S.; MINEO, S.; KAWAKAMI, Y.; UCHIDA, A.; KAMIYA, S.; KOBAYASHI, F. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing gammadelta T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 30, p. 12129-34, 2012.

ISHIDA, Y.; AGATA, Y.; SHIBAHARA, K.; HONJO, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J**, v. 11, n. 11, p. 3887-95, 1992.

IWATA, Y.; FURUICHI, K.; KITAGAWA, K.; HARA, A.; OKUMURA, T.; KOKUBO, S.; SHIMIZU, K.; SAKAI, N.; SAGARA, A.; KUROKAWA, Y.; UEHA, S.; MATSUSHIMA, K.; KANEKO, S.; WADA, T. Involvement of CD11b+ GR-1 low cells in autoimmune disorder in MRL-Fas *lpr* mouse. **Clin Exp Nephrol**, v. 14, n. 5, p. 411-7, 2010.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 6, p. 1683-90, 2000.

KASTENMULLER, W.; GASTEIGER, G.; SUBRAMANIAN, N.; SPARWASSER, T.; BUSCH, D. H.; BELKAID, Y.; DREXLER, I.; GERMAIN, R. N. Regulatory T cells selectively control CD8+ T cell effector pool size via IL-2 restriction. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 3186-97, 2011.

KEIR, M. E.; BUTTE, M. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KEIR, M. E.; LIANG, S. C.; GULERIA, I.; LATCHMAN, Y. E.; QIPO, A.; ALBACKER, L. A.; KOULMANDA, M.; FREEMAN, G. J.; SAYEGH, M. H.; SHARPE, A. H. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 883-95, 2006.

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

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

KINTER, A. L.; GODBOUT, E. J.; MCNALLY, J. P.; SERETI, I.; ROBY, G. A.; O'SHEA, M. A.; FAUCI, A. S. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 6738-46, 2008.

KNIP, M.; VEIJOLA, R.; VIRTANEN, S. M.; HYOTY, H.; VAARALA, O.; AKERBLUM, H. K. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S125-36, 2005.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 2, p. 861-9, 2007.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol**, v. 20, n. 5, p. 207-16, 1998.

KUSMARTSEV, S. A.; LI, Y.; CHEN, S. H. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. **J Immunol**, v. 165, n. 2, p. 779-85, 2000.

L'AGE-STEHR, J.; DIAMANTSTEIN, T. Studies on induction and control of cell-mediated autoimmunity. I. Induction of "autoreactive" T lymphocytes in mice by cyclophosphamide. **Eur J Immunol**, v. 8, n. 9, p. 620-4, 1978.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C. R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D.; BORDE, M.; CHERNOVA, I.; IWAI, Y.; LONG, A. J.; BROWN, J. A.; NUNES, R.; GREENFIELD, E. A.; BOURQUE, K.; BOUSSIOTIS, V. A.; CARTER, L. L.; CARRENO, B. M.;

MALENKOVICH, N.; NISHIMURA, H.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; SHARPE, A. H. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 261-8, 2001.

LEHUEN, A.; DIANA, J.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 501-13, 2010.

LEVRAND, S.; VANNAY-BOUCHICHE, C.; PESSE, B.; PACHER, P.; FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 6, p. 886-95, 2006.

LIANG, S. C.; GREENWALD, R. J.; LATCHMAN, Y. E.; ROSAS, L.; SATOSKAR, A.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 58-64, 2006.

LOWENSTEIN, C. J.; ALLEY, E. W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A. M.; SNYDER, S. H.; RUSSELL, S. W.; MURPHY, W. J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 20, p. 9730-4, 1993.

LUTSIK, M. E.; SEMNANI, R. T.; DE PASCALIS, R.; KASHMIRI, S. V.; SCHLOM, J.; SABZEVARI, H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2862-8, 2005.

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; KARP, C. L.; ALIBERTI, J.; FLICK, M. J.; JORDAN, M. B. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **J Immunol**, v. 184, n. 2, p. 877-85, 2010.

MAKARENKOVA, V. P.; BANSAL, V.; MATTA, B. M.; PEREZ, L. A.; OCHOA, J. B. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. **J Immunol**, v. 176, n. 4, p. 2085-94, 2006.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 1980.

MALEK, T. R.; YU, A.; VINCEK, V.; SCIBELLI, P.; KONG, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 167-78, 2002.

MANY, M. C.; MANIRATUNGA, S.; DENEFF, J. F. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune thyroiditis. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 104 Suppl 3, p. 17-20, 1996.

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

MARKLE, J. G.; FRANK, D. N.; MORTIN-TOTH, S.; ROBERTSON, C. E.; FEAZEL, L. M.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; VON BERGEN, M.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J.; DANSKA, J. S. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1084-8, 2013.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev**, v. 201, p. 304-17, 2004.

MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 174, n. 3, p. 1594-601, 2005.

MATHEWS, M.; JIA, H. P.; GUTHMILLER, J. M.; LOSH, G.; GRAHAM, S.; JOHNSON, G. K.; TACK, B. F.; MCCRAY, P. B., JR. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 2740-5, 1999.

MAYNARD, C. L.; HARRINGTON, L. E.; JANOWSKI, K. M.; OLIVER, J. R.; ZINDL, C. L.; RUDENSKY, A. Y.; WEAVER, C. T. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 931-41, 2007.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunol Rev**, v. 226, p. 219-33, 2008.

MCALCER, M. A.; REIFSNYDER, P.; PALMER, S. M.; PROCHAZKA, M.; LOVE, J. M.; COPEMAN, J. B.; POWELL, E. E.; RODRIGUES, N. R.; PRINS, J. B.; SERREZE, D. V.; ET AL. Crosses of NOD mice with the related NON strain. A polygenic model for IDDM. **Diabetes**, v. 44, n. 10, p. 1186-95, 1995.

MCNALLY, A.; HILL, G. R.; SPARWASSER, T.; THOMAS, R.; STEPTOE, R. J. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 18, p. 7529-34, 2011.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 475-82, 1978.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M. C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J Immunol**, v. 151, n. 8, p. 4200-8, 1993.

MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S.; SHIMANOE, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 1150-7, 2010.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORI, Y.; KATO, T.; KODAKA, T.; KANAGAWA, E. M.; HORI, S.; KANAGAWA, O. Protection of IFN-gamma signaling-deficient NOD mice from diabetes by cyclophosphamide. **Int Immunol**, v. 20, n. 9, p. 1231-7, 2008.

MOVAHEDI, K.; GUILLIAMS, M.; VAN DEN BOSSCHE, J.; VAN DEN BERGH, R.; GYSEMANS, C.; BESCHIN, A.; DE BAETSELIER, P.; VAN GINDERACHTER, J. A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 4233-44, 2008.

NAGARAJ, S.; GUPTA, K.; PISAREV, V.; KINARSKY, L.; SHERMAN, S.; KANG, L.; HERBER, D. L.; SCHNECK, J.; GABRILOVICH, D. I. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 828-35, 2007.

NAGENDRA, S.; SCHLUETER, A. J. Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. **Cytometry A**, v. 58, n. 2, p. 195-200, 2004.

NAKANO, H.; YANAGITA, M.; GUNN, M. D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med**, v. 194, n. 8, p. 1171-8, 2001.

NEWLAND, S. A.; PHILLIPS, J. M.; MASTROENI, P.; AZUMA, M.; ZACCONE, P.; COOKE, A. PD-L1 blockade overrides Salmonella typhimurium-mediated diabetes prevention in NOD mice: no role for Tregs. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 10, p. 2966-76, 2011.

NICKELL, S. P.; SHARMA, D. Trypanosoma cruzi: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. **Exp Parasitol**, v. 94, n. 4, p. 207-16, 2000.

NIHEI, J. **Estudo de células que migram para os infiltrados inflamatórios na ausência de linfócitos B e durante a infecção experimental pelo T cruzi: o papel de células T NK1.1**. 2005. (Mestrado). Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA.

NISHIZUKA, Y.; SAKAKURA, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. **Science**, v. 166, n. 3906, p. 753-5, 1969.

NURIEVA, R.; THOMAS, S.; NGUYEN, T.; MARTIN-OROZCO, N.; WANG, Y.; KAJA, M. K.; YU, X. Z.; DONG, C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. **EMBO J**, v. 25, n. 11, p. 2623-33, 2006.

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

OLIVEIRA, A. C.; DE ALENCAR, B. C.; TZELEPIS, F.; KLEZEWSKY, W.; DA SILVA, R. N.; NEVES, F. S.; CAVALCANTI, G. S.; BOSCARDIN, S.; NUNES, M. P.; SANTIAGO, M. F.; NOBREGA, A.; RODRIGUES, M. M.; BELLIO, M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against

Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000870, 2010.

ONKAMO, P.; VAANANEN, S.; KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**, v. 42, n. 12, p. 1395-403, 1999.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 385-90, 2009.

PADILLA, A. M.; SIMPSON, L. J.; TARLETON, R. L. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 1245-52, 2009.

PAGE, M.; THORPE, R. Purification of IgG by Precipitation with Sodium Sulfate or Ammonium Sulfate. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Protein Protocols Handbook**. Hatfield UK: Humana Press, 2002. cap. 983-984,

PAPIERNIK, M.; DE MORAES, M. L.; PONTOUX, C.; VASSEUR, F.; PENIT, C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **Int Immunol**, v. 10, n. 4, p. 371-8, 1998.

PARRY, R. V.; CHEMNITZ, J. M.; FRAUWIRTH, K. A.; LANFRANCO, A. R.; BRAUNSTEIN, I.; KOBAYASHI, S. V.; LINSLEY, P. S.; THOMPSON, C. B.; RILEY, J. L. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 21, p. 9543-53, 2005.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M.; FRANCO, R. M.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. Chagas' disease as a foodborne illness. **J Food Prot**, v. 72, n. 2, p. 441-6, 2009.

PETERSON, P.; ORG, T.; REBANE, A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 948-57, 2008.

PHILLIPS, J. M.; PARISH, N. M.; RAINE, T.; BLAND, C.; SAWYER, Y.; DE LA PENA, H.; COOKE, A. Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. **Rev Diabet Stud**, v. 6, n. 2, p. 97-103, 2009.

PORTELA-LINDOSO, A. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. [Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]. **Rev Saude Publica**, v. 37, n. 1, p. 107-15, 2003.

POSTOL, E. **O papel das células NK1.1+ no lupus eritematoso sistêmico experimental**. 1999. 171f. (Tese de Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

- PROBST, H. C.; MCCOY, K.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; VAN DEN BROEK, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. **Nat Immunol**, v. 6, n. 3, p. 280-6, 2005.
- RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 267-96, 2007.
- REDONDO, M. J.; JEFFREY, J.; FAIN, P. R.; EISENBARTH, G. S.; ORBAN, T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. **N Engl J Med**, v. 359, n. 26, p. 2849-50, 2008.
- REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135-40, 1994.
- REVELLI, S.; DAVILA, H.; MORENO, H.; BOTTASSO, O. Depressed adjuvant arthritis in chronically *Trypanosoma cruzi* infected rats: reversal by cyclophosphamide. **J Rheumatol**, v. 19, n. 4, p. 513-6, 1992.
- REVELLI, S.; GOMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O.; BASOMBRIO, M. A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v. 85, n. 2, p. 147-50, 1999.
- RILEY, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. **Immunol Rev**, v. 229, n. 1, p. 114-25, 2009.
- RING, S.; OLIVER, S. J.; CRONSTEIN, B. N.; ENK, A. H.; MAHNKE, K. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 6, p. 1287-96 e2, 2009.
- ROCHA RODRIGUES, D. B.; DOS REIS, M. A.; ROMANO, A.; PEREIRA, S. A.; TEIXEIRA VDE, P.; TOSTES, S., JR.; RODRIGUES, V., JR. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 361730, 2012.
- RODRIGUEZ, P. C.; QUICENO, D. G.; OCHOA, A. C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1568-73, 2007.
- RODRIGUEZ, P. C.; QUICENO, D. G.; ZABALETA, J.; ORTIZ, B.; ZEA, A. H.; PIAZUELO, M. B.; DELGADO, A.; CORREA, P.; BRAYER, J.; SOTOMAYOR, E. M.; ANTONIA, S.; OCHOA, J. B.; OCHOA, A. C. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. **Cancer Res**, v. 64, n. 16, p. 5839-49, 2004.
- ROEP, B. O.; ATKINSON, M.; VON HERRATH, M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 12, p. 989-97, 2004.

ROFFE, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L. R.; MURPHY, P. M. 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, 2012.

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, 1993.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. 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, 1995.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; ARAKI, K.; AHMED, R. From vaccines to memory and back. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 451-63, 2010.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-12, 1999.

SALOMON, B.; RHEE, L.; BOUR-JORDAN, H.; HSIN, H.; MONTAG, A.; SOLIVEN, B.; ARCELLA, J.; GIRVIN, A. M.; PADILLA, J.; MILLER, S. D.; BLUESTONE, J. A. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. **J Exp Med**, v. 194, n. 5, p. 677-84, 2001.

SATO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; TANJI, M. M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M. L.; DUARTE, A. J. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Infect Immun**, v. 60, n. 3, p. 1024-30, 1992.

SCHMIELAU, J.; FINN, O. J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. **Cancer Res**, v. 61, n. 12, p. 4756-60, 2001.

SERREZE, D. V.; CHAPMAN, H. D.; POST, C. M.; JOHNSON, E. A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; RABINOVITCH, A. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 1352-9, 2001.

SETOGUCHI, R.; HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 723-35, 2005.

SHALEV, I.; SCHMELZLE, M.; ROBSON, S. C.; LEVY, G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. **Semin Immunol**, v. 23, n. 4, p. 282-92, 2011.

SHARIF, S.; ARREAZA, G. A.; ZUCKER, P.; MI, Q. S.; SONDHI, J.; NAIDENKO, O. V.; KRONENBERG, M.; KOEZUKA, Y.; DELOVITCH, T. L.; GOMBERT, J. M.; LEITE-DE-MORAES, M.; GOUARIN, C.; ZHU, R.; HAMEG, A.; NAKAYAMA, T.;

TANIGUCHI, M.; LEPAULT, F.; LEHUEN, A.; BACH, J. F.; HERBELIN, A. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. **Nat Med**, v. 7, n. 9, p. 1057-62, 2001.

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

SIPPEL, T. R.; WHITE, J.; NAG, K.; TSVANKIN, V.; KLAASSEN, M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; WAZIRI, A. Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 22, p. 6992-7002, 2011.

SMITH, K. A. Toward a molecular understanding of adaptive immunity: a chronology, part I. **Front Immunol**, v. 3, p. 369, 2012.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-7, 1987.

SONGINI, M.; MUNTONI, S. High incidence of type I diabetes in Sardinia. **Lancet**, v. 337, n. 8748, p. 1047, 1991.

STREHL, B.; SEIFERT, U.; KRUGER, E.; HEINK, S.; KUCKELKORN, U.; KLOETZEL, P. M. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. **Immunol Rev**, v. 207, p. 19-30, 2005.

STRUNK, R. C.; COLE, F. S.; PERLMUTTER, D. H.; COLTEN, H. R. gamma-Interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and in murine fibroblasts transfected with human C2 and factor B genes. **J Biol Chem**, v. 260, n. 28, p. 15280-5, 1985.

SUN, J.; TARLETON, R. L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 2, p. 161-9, 1993.

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

TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, 1992.

TATE, M. D.; DENG, Y. M.; JONES, J. E.; ANDERSON, G. P.; BROOKS, A. G.; READING, P. C. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7441-50, 2009.

TERRAZAS, L. I.; WALSH, K. L.; PISKORSKA, D.; MCGUIRE, E.; HARN, D. A., JR. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5294-303, 2001.

THAYER, T. C.; WILSON, S. B.; MATHEWS, C. E. Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 39, n. 3, p. 541-61, 2010.

TIAN, B.; HAO, J.; ZHANG, Y.; TIAN, L.; YI, H.; O'BRIEN, T. D.; SUTHERLAND, D. E.; HERING, B. J.; GUO, Z. Upregulating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in pancreatic lymph nodes in diabetic NOD mice by adjuvant immunotherapy. **Transplantation**, v. 87, n. 2, p. 198-206, 2009.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 457-67, 2010.

TODD, J. A.; KNIP, M.; MATHIEU, C. Strategies for the prevention of autoimmune type 1 diabetes. **Diabet Med**, v. 28, n. 10, p. 1141-3, 2011.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575-81, 1983.

TONELLI, R. R.; TORRECILHAS, A. C.; JACYSYN, J. F.; JULIANO, M. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 481-92, 2011.

TSENG, S. Y.; OTSUJI, M.; GORSKI, K.; HUANG, X.; SLANSKY, J. E.; PAI, S. I.; SHALABI, A.; SHIN, T.; PARDOLL, D. M.; TSUCHIYA, H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. **J Exp Med**, v. 193, n. 7, p. 839-46, 2001.

TZELEPIS, F.; DE ALENCAR, B. C.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 4, p. 2477-81, 2006.

UCHIDA, S.; SUZUKI, K.; AKIYAMA, S.; MIYAMOTO, M.; JUJI, T.; FUJIWARA, M. Suppressive effect of cyclophosphamide on the progression of lethal graft-versus-host disease in mice--a therapeutic model of fatal post-transfusion GVHD. **Ther Immunol**, v. 1, n. 6, p. 313-8, 1994.

VAENA DE AVALOS, S.; BLADER, I. J.; FISHER, M.; BOOTHROYD, J. C.; BURLEIGH, B. A. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **J Biol Chem**, v. 277, n. 1, p. 639-44, 2002.

VIRTUOSO, L. P.; HARDEN, J. L.; SOTOMAYOR, P.; SIGURDSON, W. J.; YOSHIMURA, F.; EGILMEZ, N. K.; MINEV, B.; KILINC, M. O. Characterization of iNOS(+) Neutrophil-like ring cell in tumor-bearing mice. **J Transl Med**, v. 10, p. 152, 2012.

WRIGHT, J. D.; HU, Q.; MILLER, A.; LIU, S.; ABRAMS, S. I. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27690, 2011.

WANG, B.; GONZALEZ, A.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 8, p. 1762-9, 1996.

WANG, J.; OKAZAKI, I. M.; YOSHIDA, T.; CHIKUMA, S.; KATO, Y.; NAKAKI, F.; HIAI, H.; HONJO, T.; OKAZAKI, T. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. **Int Immunol**, v. 22, n. 6, p. 443-52, 2010.

WANG, L.; PINO-LAGOS, K.; DE VRIES, V. C.; GULERIA, I.; SAYEGH, M. H.; NOELLE, R. J. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 27, p. 9331-6, 2008.

WANG, Z.; JIANG, J.; LI, Z.; ZHANG, J.; WANG, H.; QIN, Z. A myeloid cell population induced by Freund adjuvant suppresses T-cell-mediated antitumor immunity. **J Immunother**, v. 33, n. 2, p. 167-77, 2010.

WATERSTON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J. F.; AGARWAL, P.; AGARWALA, R.; AINSCOUGH, R.; ALEXANDERSSON, M.; AN, P.; ANTONARAKIS, S. E.; ATTWOOD, J.; BAERTSCH, R.; BAILEY, J.; BARLOW, K.; BECK, S.; BERRY, E.; BIRREN, B.; BLOOM, T.; BORK, P. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 520-62, 2002.

WHITESIDE, T. L.; SCHULER, P.; SCHILLING, B. Induced and natural regulatory T cells in human cancer. **Expert Opin Biol Ther**, v. 12, n. 10, p. 1383-97, 2012.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). . **Fact sheet N°340.**, 2010. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> >. Acesso em: 10 Jan 2012.

WILLCOX, A.; RICHARDSON, S. J.; BONE, A. J.; FOULIS, A. K.; MORGAN, N. G. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**, v. 155, n. 2, p. 173-81, 2009.

WOGENSEN, L.; LEE, M. S.; SARVETNICK, N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1379-84, 1994.

WONG, F. S.; VISINTIN, I.; WEN, L.; FLAVELL, R. A.; JANEWAY, C. A., JR. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. **J Exp Med**, v. 183, n. 1, p. 67-76, 1996.

WRIGHT, J. R. Host defense functions of pulmonary surfactant. **Biol Neonate**, v. 85, n. 4, p. 326-32, 2004.

WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661-78, 2007.

YADAV, D.; HILL, N.; YAGITA, H.; AZUMA, M.; SARVETNICK, N. Altered availability of PD-1/PD ligands is associated with the failure to control autoimmunity in NOD mice. **Cell Immunol**, v. 258, n. 2, p. 161-71, 2009.

YAO, S.; WANG, S.; ZHU, Y.; LUO, L.; ZHU, G.; FLIES, S.; XU, H.; RUFF, W.; BROADWATER, M.; CHOI, I. H.; TAMADA, K.; CHEN, L. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5811-8, 2009.

YIN, B.; MA, G.; YEN, C. Y.; ZHOU, Z.; WANG, G. X.; DIVINO, C. M.; CASARES, S.; CHEN, S. H.; YANG, W. C.; PAN, P. Y. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. **J Immunol**, v. 185, n. 10, p. 5828-34, 2010.

YOUN, J. I.; GABRILOVICH, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 11, p. 2969-75, 2010.

YOUN, J. I.; NAGARAJ, S.; COLLAZO, M.; GABRILOVICH, D. I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **J Immunol**, v. 181, n. 8, p. 5791-802, 2008.

YOUNG, M. R.; NEWBY, M.; WEPSIC, H. T. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. **Cancer Res**, v. 47, n. 1, p. 100-5, 1987.

YOUNGNAK, P.; KOZONO, Y.; KOZONO, H.; IWAI, H.; OTSUKI, N.; JIN, H.; OMURA, K.; YAGITA, H.; PARDOLL, D. M.; CHEN, L.; AZUMA, M. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, n. 3, p. 672-7, 2003.

YUI, M. A.; MURALIDHARAN, K.; MORENO-ALTAMIRANO, B.; PERRIN, G.; CHESTNUT, K.; WAKELAND, E. K. Production of congenic mouse strains carrying NOD-derived diabetogenic genetic intervals: an approach for the genetic dissection of complex traits. **Mamm Genome**, v. 7, n. 5, p. 331-4, 1996.

ZACCONE, P.; COOKE, A. Infectious triggers protect from autoimmunity. **Semin Immunol**, v. 23, n. 2, p. 122-9, 2011.

ZELENAY, S.; LOPES-CARVALHO, T.; CARAMALHO, I.; MORAES-FONTES, M. F.; REBELO, M.; DEMENGEOT, J. Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 4091-6, 2005.

ZHENG, X. X.; STEELE, A. W.; HANCOCK, W. W.; STEVENS, A. C.; NICKERSON, P. W.; ROY-CHAUDHURY, P.; TIAN, Y.; STROM, T. B. A

noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. **J Immunol**, v. 158, n. 9, p. 4507-13, 1997.

ZHU, B.; BANDO, Y.; XIAO, S.; YANG, K.; ANDERSON, A. C.; KUCHROO, V. K.; KHOURY, S. J. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5228-37, 2007.

ZOGLMEIER, C.; BAUER, H.; NORENBERG, D.; WEDEKIND, G.; BITTNER, P.; SANDHOLZER, N.; RAPP, M.; ANZ, D.; ENDRES, S.; BOURQUIN, C. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 7, p. 1765-75, 2011.