

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Paulo Henrique Tolentino Moura

Efeitos do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade à
infecção por *Trypanosoma cruzi*, avaliada pelo perfil de
citocinas produzidas por células apresentadoras de antígenos e
linfócitos

Montes Claros
2018

Paulo Henrique Tolentino Moura

Efeitos do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi*, avaliada pelo perfil de citocinas produzidas por células apresentadoras de antígenos e linfócitos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dra. Mariléia Chaves Andrade

Montes Claros
2018

M929e

Moura, Paulo Henrique Tolentino.

Efeitos do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi*, avaliada pelo perfil de citocinas produzidas por células apresentadoras de antígenos e linfócitos [manuscrito] / Paulo Henrique Tolentino Moura. – 2018.

92 f. : il.

Bibliografia: f. 82-92

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Mariléia Chaves Andrade.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Alergia e Imunologia. 3. Etanol. I. Andrade, Mariléia Chaves. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar de Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Virgílio Mesquita Gomes

Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa: Prof. Antônio Dimas Cardoso

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Correa Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arruda

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dário Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Hercílio Martelli Junior

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador: Luiz Fernando Resende



MESTRANDO(A): PAULO HENRIQUE TOLENTINO MOURA

TÍTULO DO TRABALHO: "Efeitos do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade à infecção por Trypanosoma cruzi, avaliada pelo perfil de citocinas produzidas por Células Apresentadoras de Antígenos e Linfócitos".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

BANCA (TITULARES)

PROF^a. DR^a. MARILÉIA CHAVES ANDRADE, ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. EDUARDO ROBSON DUARTE

PROF^a. DR^a. CARLA SILVANA DE OLIVEIRA E SILVA

ASSINATURAS

Mariléia Chaves Andrade
Eduardo Robson Duarte
Carla S. O. Silva

BANCA (SUPLENTES)

PROF. DR. SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE

PROF^a. ANA PAULA VENUTO MOURA

ASSINATURAS

APROVADA

REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / ppgcs@unimontes.br

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucilene e Lindomar, modelos de sabedoria, de honestidade e de integridade. Foram também meus primeiros professores. Verdadeiros mestres na minha vida e na minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à Virgem Maria por esta oportunidade. Aos meus professores do PPGCS/Unimontes, sou grato por toda dedicação e cuidado, especialmente à minha orientadora Mariléia. Professora, seu facínio pela ciência, pela pesquisa e pela imunologia foram contagiantes e fonte imensurável de inspiração. Agradeço aos professores da graduação do curso médico da Unimontes, especialmente ao professores Antônio Prates, Henderson, Ana Cristina, Lucinéia e Fatinha. Professores, tudo começou com suas orientações na iniciação científica. Agradeço as oportunidades, os ensinamentos e o incentivo para o seguimento nesta vida acadêmica. Agradeço aos colegas discentes do PPGCS e à querida Du. Não chegaria até aqui sem o apoio de todos vocês. Na conclusão deste mestrado, destaco de maneira especial as colegas Janaína, Patrícia, Eloá e Amanda. Obrigado por todo incentivo e auxílio nos momentos mais difíceis. Agradeço aos meus amigos e familiares por todo apoio emocional, especialmente ao meu irmão André e aos meus pais Lucilene e Lindomar. Agradeço ainda à Prefeitura de Pirapora-MG pela compreensão e incentivo.

LISTA DE ABREVIATURAS

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

APC - Células apresentadora de antígenos (*Antigen Presenting Cell*)

IL – Interleucinas (*Interleukins*)

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral-alfa (*Tumor Necrosis Factor-alfa*)

CD – Grupos de diferenciação (*Clusters of Differentiation*)

EtOH- Etanol

OMS – Organização Mundial de Saúde

NK- *Natural killer*

IFN-g- Interferon-gama

MHC II- Complexo de histocompatibilidade principal-II (*Major histocompatibility complex*)

NO – Óxido nítrico

iNO – óxido nítrico induzível

PAF - Plaqueta

LTB4- Leucotrieno

5-LO - lipoxigenase 5

TGF-b - Fator de crescimento transformante b

LPS- Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharide*)

TGF-β- Fator de crescimento transformante-β (*Transforming growth factor-β*)

LTBP- *Latent TGF-beta binding protein*

Th - T auxiliar (*T helper*)

IgE – Imunoglobulina E

PPP - Período pré-patente

PP – Período patente

PMP - Pico máximo de parasitemia

DPMP - Dia do pico máximo de parasitemia

HE – Hematoxilina e Eosina

FITC- Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

NaCl- Cloreto de sódio

PBS- Tampão fosfato (*Phosphate buffered saline*)

SFB- Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Delineamento Experimental.....	28
3.2 Amostra	28
3.2.1 Modelo de administração oral de etanol (EtOH).....	29
3.2.2 Infecção experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> e curva de parasitemia.....	29
3.3 Obtenção e preparo de suspensões celulares para avaliação de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T.....	30
3.3.1 Contagem das células viáveis	31
3.4 Detecção de citocinas intracitoplasmáticas em células apresentadoras de antígeno e linfócitos T pela Citometria de Fluxo	31
3.5 - Imunofenotipagem celular pela Citometria de Fluxo no contexto ex-vivo.....	33
3.6 Análise estatística dos dados	34
4 PRODUTOS CIENTÍFICOS	35
4.1 Artigo Científico: Efeitos do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
5 CONCLUSÃO.....	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), induz resposta imune cuja eficiência é importante para que a infecção persista ou seja eliminada. Com o consumo de etanol (EtOH) ocorre alteração da expressão de moléculas de co-sinalização em células apresentadoras de antígenos (APCs) que possuem papel fundamental na determinação da função efetora de linfócitos T, direcionando o perfil dessas células para a tolerância ou para a inflamação. Nosso estudo avaliou o perfil fenotípico das APCs e linfócitos T em camundongos da linhagem C57/BL6 não infectados e infectados com *T. cruzi* e que ingeriram ou não etanol (EtOH) durante 15 dias. Observou-se maior parasitemia nos primeiros dias de inoculação no grupo que ingeriu EtOH. Os animais que ingeriram EtOH apresentaram aumento significativo na produção de IL-4 por linfócitos T CD4+. Os que ingeriram EtOH e foram infectados com *T. cruzi* apresentaram, em linfócitos T CD4+, aumento significativo IFN- γ e IL-4, além de tendência de aumento de IL-10. Apresentaram também tendência de aumento de IL-10 em Linfócitos T CD8+. Percebeu-se em células NK redução significativa do IFN- γ no grupo que ingeriu álcool e foi infectado pelo *T. cruzi*. Portanto, o consumo do etanol repercute de forma mais significativa sobre a população de linfócitos T e células NK, promovendo predomínio de perfil inflamatório *T helper 2*, caracterizado pela diminuição de moléculas de ativação celular, como IFN- γ , aumento de moléculas associadas com atividades de modulação de linfócitos T CD8+ (IL-10) e aumento de IL-4 em linfócitos T CD4+. Os resultados adquiridos com este trabalho permitem concluir que há um aumento da parasitemia no terceiro dia de detecção, refletindo maior suscetibilidade à infecção nos animais que ingeriram etanol.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*; Alergia e Imunologia; Etanol.

ABSTRACT

Infection by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), induces immune response whose efficiency is important for the infection to persist or be eliminated. With the consumption of ethanol (EtOH), there is a change in the expression of co-signaling molecules in antigen presenting cells (APCs) that play a fundamental role in the determination of T-lymphocyte effector function, directing the profile of these cells to tolerance or inflammation. Our study evaluated the phenotypic profile of APCs and T lymphocytes in uninfected and *T. cruzi* infected mice of the C57/BL6 lineage and ingested or not ethanol (EtOH) for 15 days. Greater parasitemia were observed in the first days of inoculation in the group that consumed EtOH. Animals that ingested EtOH showed a significant increase in IL-4 production by CD4 + T lymphocytes. Those who ingested EtOH and were infected with *T. cruzi* showed a significant increase in IFN- γ and IL-4 in CD4 + T lymphocytes, in addition to an increase in IL-10. They also showed a tendency to increase IL-10 in CD8 + T lymphocytes. Significant reduction in IFN- γ was observed in NK cells in the alcohol-ingested group and infected by *T. cruzi*. Therefore, the consumption of ethanol has a significant impact on the population of T lymphocytes and NK cells, promoting a predominance of T helper 2 inflammatory profile, characterized by the decrease of cellular activation molecules, such as IFN- γ , increase of molecules associated with activities modulation of CD8 + T lymphocytes (IL-10) and increase of IL-4 in CD4 + T lymphocytes. The results obtained with this study allow to conclude that there is an increase in parasitemia on the third day of detection, reflecting a higher susceptibility to infection in the animals that ingested ethanol.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Allergy and Immunology; Ethanol.

1. Introdução

Há 108 anos Carlos Chagas descreveu a doença de Chagas, reportando seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), transmitido pelo inseto da ordem Hemiptera (CHAGAS, 1909).

É reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (HOTEZ; MOLYNEUX; FENWICK, 2007). E estima-se em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina. Estimativas recentes para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2010, indicavam 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da Iniciativa dos Países do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458), seguidos da Bolívia (607.186). Todavia, estes dados divergem de outras estimativas realizadas por diferentes grupos de pesquisa de métodos para definição de infecção por *T. cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da doença de Chagas nas Américas. No entanto, os autores concordam que o número de infectados é ainda muito expressivo no contexto sanitário e social do continente, requerendo prioridade e atenção por parte dos países (DIAS, J.C.P ; et al., 2016).

Apesar dos grandes avanços obtidos no controle da transmissão natural, dados da OMS mostram que ainda existe a incidência de 200 mil novos casos ao ano (WHO., 2003).

No recente II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas, publicado em 2016, apresenta-se uma avaliação do ano 2000 ao ano 2055, com uma estimativa do número de pessoas infectadas no Brasil, estimativa de casos com a forma digestiva e estimativa de casos com a forma cardíaca (DIAS, J.C.P ; et al., 2016).

Para o ano de 2020, a estimativa de infectados no Brasil será de 1.365.585 a 3.213.142 pessoas. Destes, a estimativa de pessoas com a forma digestiva será de 136.559 a 321.314; e a estimativa de pessoas com a forma cardíaca será de 409.676 a 963.943 (DIAS, J.C.P ; et al., 2016).

Tabela 1 - Projeções das estimativas de prevalência de infecção por *T. cruzi* e da doença de Chagas na fase crônica com a forma cardíaca e com a forma digestiva no Brasil, no período de 2000 a 2055.

Ano	Estimativa da população brasileira	Faixa etária de referência			Estimativa do número de pessoas infectadas		Estimativa de casos com a forma digestiva		Estimativa de casos com a forma cardíaca	
		Faixa etária	População	%	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b
2000	173.448.346	≥5	156.133.836	90,0	1.592.565	3.747.212	159.257	374.721	477.770	1.124.164
2005	185.150.806	≥10	150.944.641	81,5	1.539.635	3.622.671	153.964	362.267	461.891	1.086.801
2010	195.497.797	≥15	145.563.676	74,5	1.484.749	3.493.528	148.475	349.353	445.425	1.048.058
2015	204.450.649	≥20	139.901.357	68,4	1.426.994	3.357.633	142.699	335.763	428.098	1.007.290
2020	212.077.375	≥25	133.880.929	63,1	1.365.585	3.213.142	136.559	321.314	409.676	963.943
2025	218.330.014	≥30	127.334.466	58,3	1.298.812	3.056.027	129.881	305.603	389.644	916.808
2030	223.126.917	≥35	120.096.221	53,8	1.224.981	2.882.309	122.498	288.231	367.494	864.693
2035	226.438.916	≥40	112.013.898	49,5	1.142.542	2.688.334	114.254	268.833	342.763	806.500
2040	228.153.204	≥45	102.983.115	45,1	1.050.428	2.471.595	105.043	247.160	315.128	741.479
2045	228.116.279	≥50	92.984.144	40,8	948.438	2.231.619	94.844	223.162	284.531	669.486
2050	226.347.688	≥55	82.097.220	36,3	837.392	1.970.333	83.739	197.033	251.218	591.100
2055	222.975.532	≥60	70.485.475	31,6	718.952	1.691.651	71.895	169.165	215.686	507.495

Fonte: DIAS, JCP *et al* . II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília , v. 25, n. esp, p. 7-86, jun. 2016.

A transmissão natural da doença se faz pelo contato do hospedeiro vertebrado com as fezes do inseto vetor, contaminadas com as formas tripomastigotas do protozoário (COURA, 2015). A infecção dos insetos ocorre durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, quando os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos e, uma vez no intestino do inseto, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em formas tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são expelidos com as fezes e/ou urina do inseto vetor no local da picada, após o repasto sanguíneo, e penetram no hospedeiro através da pele lesada ou mucosa. A forma tripomastigota se desenvolve no interior de diferentes tipos de células do hospedeiro vertebrado e

se transformam na forma amastigota que se multiplica por sucessivas divisões binárias, evoluindo, posteriormente, para a forma tripomastigota. As células infectadas rompem-se e os parasitos livres invadem células próximas ou alcançam a corrente sanguínea, disseminando a infecção para os diferentes órgãos e sistemas (DIAS, J.C.P., 2000).

Outros mecanismos de transmissão, alternativos ao vetorial, têm sido descritos e incluem a via transfusional, a transmissão congênita, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (DIAS, J.C.P., 2000). Um novo problema epidemiológico, econômico, social e político foi criado com a internacionalização da doença de Chagas devido à migração legal e ilegal de pessoas dos países endêmicos da América Latina para países não endêmicos da América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, em particular os Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Suíça, Japão, países asiáticos emergentes e Austrália (ANDRADE, D. V.; GOLLOB; DUTRA, 2014; PEREZ-MOLINA; NORMAN; LOPEZ-VELEZ, 2012).

Essas migrações criaram novos problemas epidemiológicos e de saúde pública para os países que receberam os migrantes infectados. Esses problemas incluem riscos de transfusão e transmissão congênita, bem como a necessidade de cuidados médicos para pacientes com Chagas e controles adicionais sobre bancos de sangue em países com pouca experiência sobre esse assunto. Por outro lado, além dos aspectos médicos, sociais e econômicos, foi criado um conflito político em relação ao controle da imigração (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

A fase aguda da doença é muitas vezes assintomática ou pode se limitar a um estado febril que dura de quatro a oito semanas (COURA, 2015; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Após um período mínimo de incubação de uma ou duas semanas, alguns indivíduos recentemente infectados podem desenvolver sinais e sintomas graves, tais como febre, calafrios, náusea e vômito, diarreia, erupção cutânea e irritação da meninge. Podem apresentar ainda uma lesão inflamatória no local da entrada do parasito (chagoma), edema periorbital unilateral (sinal de Romana), conjuntivite, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Anormalidades laboratoriais não são

específicas e podem incluir anemia, trombocitopenia e elevação das enzimas hepáticas e cardíacas (TANOWITZ et al., 2009).

Em muitos pacientes, com o desenvolvimento da resposta imune específica tanto celular como humoral, a parasitemia diminui e os sinais e sintomas são resolvidos completamente em cerca de dois a quatro meses, ocorrendo a recuperação de um estado aparentemente saudável. Esses indivíduos entram, então, na fase crônica da doença de Chagas e perdura por toda a vida do indivíduo infectado (MONCAYO; SILVEIRA, 2009; TANOWITZ *et al.*, 2009).

Durante o processo de evolução da infecção por *T. cruzi*, as respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem. Entretanto, a participação de cada uma dessas respostas pode ser mais evidente em fases distintas da infecção (ANDRADE, D. V. *et al.*, 2014). A resposta inata é normalmente mais importante nas fases iniciais da infecção, uma vez que linfócitos e anticorpos específicos precisam de um tempo para serem gerados. Por outro lado, a resposta adaptativa desempenha um papel importante após a cronificação da doença ou mesmo em respostas secundárias (COURA, 2015).

Dessa forma, a resposta imune que se segue à infecção é bastante complexa e representa um importante fator na determinação da evolução da inflamação. Já tem sido bem aceito que a ausência de patologia chagásica está principalmente associada com a habilidade do hospedeiro infectado para regular a resposta imune anti-*T. cruzi*. Entretanto, essa resposta que controla a parasitemia persistente, também pode contribuir para o dano inflamatório que causa a morbidade da doença de Chagas (SATHLER-AVELAR R *et al.*, 2009).

Assim, os mecanismos específicos envolvidos com o estabelecimento e até mesmo manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são heterogêneos. Acredita-se que essas manifestações sejam consequências de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune). O prolongado período de latência e a escassez no número de parasitos na fase crônica, contrapostos à intensidade e à extensão das lesões, têm levado

diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica (DIAS, J.C.P., 2000).

Alguns autores apontam, ainda, para a existência de reação cruzada entre componentes autólogos e antígenos do protozoário (ANDRADE, D. V. *et al.*, 2014; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015; DOSREIS, 2011). Entretanto, outros trabalhos sugerem que o parasitismo intracelular pode ser mais frequente do que previamente demonstrado por microscopia ótica, sugerindo haver, na patologia chagásica, uma participação direta da reatividade imunológica contra células parasitadas (LIDANI *et al.*, 2017; SOUZA, P. E. A. *et al.*, 2007). De fato, Higuchi e colaboradores, utilizando técnicas de imunohistoquímica, estabeleceram uma associação entre a presença de antígenos do *T. cruzi* e a formação de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco de pacientes com miocardite chagásica (HIGUCHI MDE *et al.*, 1993).

Contudo, o sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos demonstrou um grande número de células T e B circulantes. Embora inúmeros trabalhos utilizando modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção pelo *T. cruzi*, o papel dessas células ainda não está totalmente esclarecido na infecção humana (ROTTENBERG *et al.*, 1993; SOUZA, P. E. A. *et al.*, 2007).

A resposta das células T a uma infecção aguda tipicamente pode ser dividida nas seguintes fases: expansão, contração e memória. Durante a primeira fase, as células T CD8⁺ se dividem e se diferenciam em células efetoras que adquirem a capacidade de produzir as citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e proteínas citotóxicas tais como granzimas e perforinas (KAECH; CUI, 2012; LAIDLAW *et al.*, 2015). Este processo pelo qual os linfócitos T citotóxicos sofrem diferenciação e expansão clonal é regida pela sinalização através de antígenos, co-estimulação e receptores de citocinas (incluindo receptores para IL-2, IL-12, IL-27 e interferons de tipo I (KAECH; CUI, 2012).

Após a depuração de agentes patogênicos intracelulares, ocorre a fase de contração e resolução, na qual a maioria das células T CD8+ efetoras morrem e aproximadamente 5 a 10% das células sobrevivem. As células sobreviventes entram no terceiro estágio, a fase "memória", e se desenvolvem em células T de memória central (células T CM), células T de memória efetora e células T de memória residente, que são mantidas por longo prazo por IL-7 e IL-15. Pouco se sabe sobre os sinais que operam durante o segundo estágio (a fase de contração e resolução) para influenciar os tipos e a capacidade de proteção do desenvolvimento de memória das células T CD8+ (KAECH; CUI, 2012).

Sabe-se que durante a infecção aguda, existe uma intensa reação inflamatória. As citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, TNF- α e IFN- γ , são prontamente liberadas por células imunes ativadas e ativam ainda mais outras células inflamatórias (BILATE; CUNHA-NETO, 2008; MACHADO *et al.*, 2008).

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência à infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas. Citocinas e mediadores da resposta imune produzidos por estas células, como a IL-10, prostaglandinas, reativos intermediários de oxigênio ou de nitrogênio são moléculas que poderiam mediar a supressão da proliferação e ativação de linfócitos (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; DE BARROS-MAZON *et al.*, 2004), levando conseqüentemente à diminuição da intensidade da reação imune. Além disso, na doença de Chagas, também foi observado que monócitos de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada apresentam características moduladoras, como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10; enquanto monócitos derivados de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca parecem estar comprometidos com intensa resposta inflamatória, devido à alta expressão de TNF- α , sugerindo uma participação crítica dessas células na infecção (SOUZA, P. E. *et al.*, 2004).

Dentre essas citocinas, o IFN- γ possui um papel crítico no controle inicial da replicação do parasito onde, na ausência da resposta imune inata, este controle dependente de IFN- γ está comprometido. A regulação da expressão de quimiocinas e de IFN- γ , associados ao decréscimo do parasitismo tecidual, pode ser responsável pelo controle da inflamação em infecções experimentais por *T. cruzi* (MARTINS *et al.*, 2004; SILVA, J. S. *et al.*, 1992).

A ação dos parasitos em células monocíticas promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α e IL-12), quimiocinas e óxido nítrico (NO) (TALVANI, A. *et al.*, 2009; TALVANI, A. *et al.*, 2004). Essas interações fornecem a primeira linha de defesa, embora de eficácia limitada, contra a infecção e fornecem os sinais inflamatórios necessários para a resposta imune adaptativa (SATHLER-AVELAR R *et al.*, 2009). Um sistema de *feedback* positivo para IL-12 atua estimulando as células *natural killer* a sintetizar IFN- γ e gerar respostas de linfócitos tipo I, que estimula macrófagos para liberar mais TNF- α , IL-12, NO e quimiocinas (BASTOS *et al.*, 2007; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). Acredita-se que o NO derivado de macrófagos é crucial para esse processo (MACHADO *et al.*, 2008).

Portanto, está claro que na doença de Chagas, e na maioria das doenças infecciosas, a resposta inflamatória imunomediada do hospedeiro precisa atuar em equilíbrio adequado, para destruir o parasito ou atingir um nível de convivência compatível com uma pequena doença e restaurar integridade do tecido (MARTINS *et al.*, 2004).

Estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm sugerido que outros mediadores como por exemplo, eicosanoides, citocinas e quimiocinas também contribuem para induzir ativação de macrófagos e promoção da síntese de NO, possivelmente por regulação da expressão do iNOS. Assim, para examinar o papel relativo dos mediadores e das células na doença de Chagas, é necessário compreender as limitações dos modelos experimentais que tentam reproduzir os parâmetros clínicos, patológicos e imunes acometidos pelo *T. cruzi* (COELHO *et al.*, 2002; TALVANI, A. *et al.*, 2009).

Os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de lesões crônicas não são totalmente compreendidos. Estudos da resposta imune contra *T. cruzi* em humanos descreveram numerosas alterações de células T no sangue periférico de indivíduos infectados (MACHADO *et al.*, 2012). Alguns dos defeitos das células T que surgem em pacientes cronicamente infectados podem ser revertidos pelo tratamento antiparasitário, indicando que são provavelmente reflexo da estimulação antigênica crônica conduzida por parasitos persistentes (FERNANDEZ *et al.*, 2014).

O envolvimento potencial das células B na patogênese da doença de Chagas crônica foi ofuscado pela ênfase na pesquisa de células T. Estudos experimentais com camundongos mostraram que a infecção por *T. cruzi* diminuiu a produção de células B maduras, aumentou a inflamação e geração de células T de memória deficiente, indicando o papel crucial no controle da multiplicação parasitária e modulação das respostas das células T (CARDILLO *et al.*, 2007).

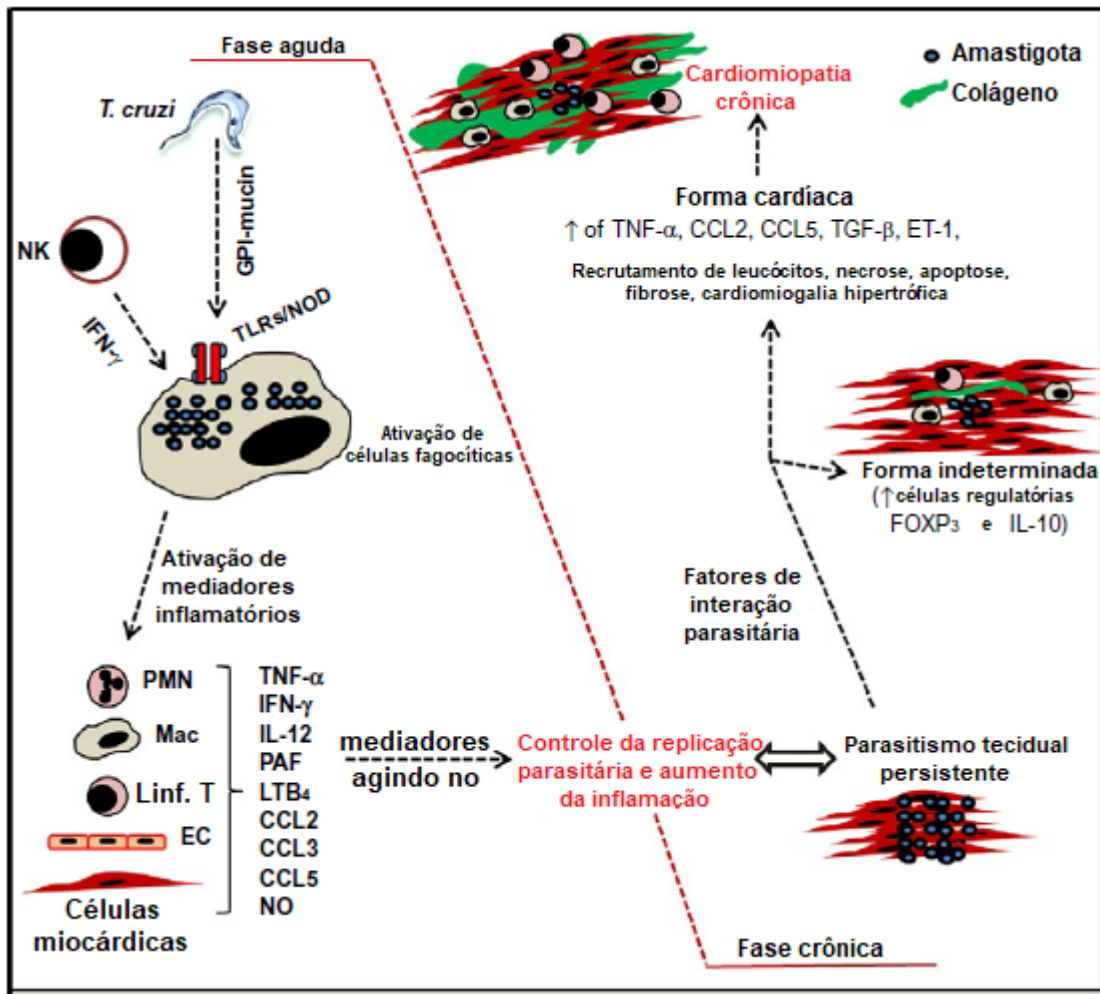
Como as células B e as células plasmáticas raramente são encontradas em lesões de tecido induzidas por *T. cruzi*, e a maioria das células B circulantes carecem de especificidade parasitária, presume-se em experimentos *in vitro* e *in vivo* que as células B desempenham um papel secundário no controle da infecção por *T. cruzi* (FERNANDEZ *et al.*, 2014).

Na maioria dos indivíduos há equilíbrio entre a replicação do parasito e a intensidade da resposta inflamatória. Esse equilíbrio é alcançado de tal forma que o hospedeiro é incapaz de eliminar o parasito, persistindo infectado durante toda a vida. No contexto clínico, isso é referido como a forma indeterminada da doença de Chagas. No contexto crônico, o controle do mecanismos imune e inflamatório estão atuando sistematicamente, ou nos tecidos infectados, de forma sutil, para manter a infecção sob controle e para modular as respostas inflamatórias e imunes, prevenindo danos nos tecidos. Na ausência de respostas inflamatórias e imunes, pode haver replicação parasitária aprimorada e morte do

hospedeiro, como observado em pacientes infectados utilizam fármacos imunossupressoras (BACAL *et al.*, 2010).

Por outro lado, cerca de 10 a 30% de indivíduos infectados irão desenvolver doenças cardíacas ou mega síndromes. Nesses pacientes que desenvolvem doença crônica grave, há evidencia de que existem mecanismos reguladores deficientes (por exemplo, perda relativa da IL-10 em relação à produção de IFN- γ), que podem contribuir para a patogênese da doença (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; GOMES, J. A. *et al.*, 2003). Portanto, é claro que na doença de Chagas e, na maioria das doenças infecciosas, a doença inflamatória e a resposta imune do hospedeiro deve atuar no equilíbrio adequado, para destruir o parasito ou atingir um nível de coexistência compatível com baixo desenvolvimento da doença, e restabelecer a integridade do tecido (TALVANI, ANDRÉ; TEIXEIRA, 2011).

Figura 1: Mediadores inflamatórios nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.



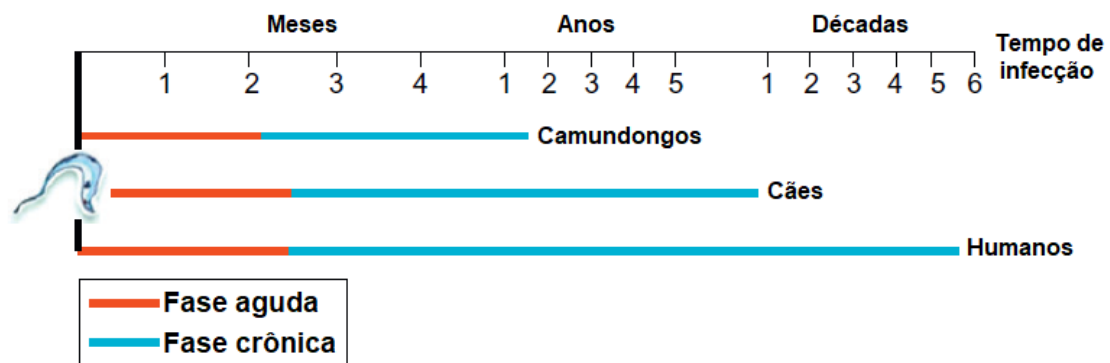
Fonte: TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Chapter 8 - Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. In: WEISS, L. M. e TANOWITZ, H. B. (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v.76, 2011. p.171-194. ISBN 0065-308X.

A persistência do parasito no hospedeiro é uma grande característica da doença de Chagas. As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células CD8⁺ ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (TALVANI, ANDRÉ; TEIXEIRA, 2011).

Em camundongos, a doença se desenvolve de forma diferente da observada em humanos, como demonstrado na Figura. 2. Durante a fase aguda da infecção experimental, caracterizada por alta parasitemia, as células T CD4⁺ são o subconjunto predominante, seguido pelas células T CD8⁺. À medida que a

doença progride, as células T CD8+ assumem o controle como o tipo de células inflamatórias predominantes. As células T CD4+ e CD8+ são relevantes para controlar a replicação parasitária (por exemplo, replicação descontrolada e alto parasitismo), mas novamente podem contribuir para causar inflamação e danos nos tecidos à medida que a doença progride (PASCUTTI *et al.*, 2003; RACHID *et al.*, 2006).

Figura 2. Cronograma da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos humanos e experimentais



Fonte: TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Chapter 8 - Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. In: WEISS, L. M. e TANOWITZ, H. B. (Ed.). Advances in Parasitology: Academic Press, v.76, 2011. p.171-194. ISBN 0065-308X.

Na figura 2 é apresentado um cronograma de infecção pelo *T. cruzi* em meses, anos e décadas em diferentes hospedeiros, com demonstração do período de fase aguda e de fase crônica descritas na literatura (TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Chapter, 2011).

A produção de quimiocinas é essencial para recrutar leucócitos em tecidos infectados (PAIVA *et al.*, 2009; YAMAUCHI *et al.*, 2007). Ao atrair leucócitos, as quimiocinas são relevantes para a proteção mediadora contra a infecção, mas também contribuem para a inflamação do tecido e eventuais danos. Por exemplo, na ausência de CCR5, as células T CD4+ e CD8+ não migram para o coração infectado e há replicação descontrolada de parasitos, que culmina na morte dos animais (MACHADO *et al.*, 2005; ROFFE *et al.*, 2006).

A depleção de células T CD4⁺ ou CD8⁺ na resposta imune da doença de Chagas resulta em uma infecção aguda descontrolada com consequente morte em modelos experimentais (DHIMAN; GARG, 2014; MARIANO *et al.*, 2008; PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009). Também já foi observada a presença de células T no infiltrado inflamatório de tecido endomiocárdico de pacientes infectados por *T. cruzi*, tanto em fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas (TARLETON, R. L., 2015b).

Apesar da grande importância de células T para o controle da parasitemia durante a fase aguda, conforme demonstrado em modelos experimentais, sabe-se que essas células ativadas são os principais componentes do infiltrado inflamatório observado em pacientes cardíacos e digestivos, relacionando sua presença e o perfil de citocinas secretadas por elas com a patologia durante a fase crônica (BRENER, 1962; DA SILVEIRA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2017). Sendo assim, é consistentemente encontrado na literatura que o balanço de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias durante a fase crônica, caracterizada por alta expressão da citocina IL-10, está relacionado com a forma clínica indeterminada, enquanto a alta expressão e desequilíbrio de citocinas inflamatórias, como por exemplo TNF- α e IFN- γ , está relacionada com o desenvolvimento de patologia, tanto na forma clínica cardíaca quanto na forma digestiva (DUTRA *et al.*, 2009).

O consumo crônico de álcool tem sido associado com significativo aumento da prevalência de doenças infecciosas e parasitárias e tem se sugerido que este aumento se deve ao efeito direto do álcool no sistema imune (KROLEWIECKI *et al.*, 2001).

O consumo crônico do álcool tem demonstrado aumento significativo da prevalência de infecções causadas por organismos oportunistas e patogênicos, como bactérias, vírus e fungos (SZABO, 1999). Em estudos laboratoriais, o consumo de álcool por camundongos também causou aumento nos níveis de infecção parasitária de *T. cruzi* (GOMES, N. D. G.; PEREIRA, 1989), *Giardia*

muris (IRIKOV; KOVALENKO, 2007), *Ancilostoma caninum* (VARDHANI; DEVI, 1991) e *Trichinella spiralis* (SEELIG; STEVEN; STEWART, 1999). Contudo, o álcool também afeta o sistema imune, cujos efeitos já foram bastante abordados na literatura científica (ANDRADE, L. O.; ANDREWS, 2005; ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009).

O consumo de álcool, seja de forma crônica ou aguda, resulta em alterações em componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo. O etanol mostrou ter um efeito nas duas subpopulações de células T CD4+, ou linfócitos T auxiliares (*T helper*, Th). Em alcoólatras humanos, há um aumento nas respostas Th1 e uma diminuição nas respostas Th2 (KROLEWIECKI *et al.*, 2001). As células Th1 dão origem a imunidade mediada por células que geram IFN- γ , linfotóxina e interleucina (IL2). Após a estimulação, induzem as respostas de anticorpos G2a da imunoglobulina (Ig) (VOLTA *et al.*, 2016). As células Th2 são responsáveis pela imunidade mediada por anticorpos, gerando IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 após a estimulação, induzem respostas de anticorpos IgG1 e IgE (KROLEWIECKI *et al.*, 2001; VOLTA *et al.*, 2016).

A administração de etanol a curto prazo, pode mudar a classe de resposta imune desencadeada para uma reatividade de tipo 2, quando promove aumento dos níveis séricos de IgE (DE ROUX *et al.*, 2006). Existem outras evidências na literatura, inclusive do nosso grupo de pesquisa, de que a apresentação de antígenos por células B pode levar a polarização Th2 e respostas alérgicas (ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2002), incluindo inflamação, eosinofilia, acúmulo e ativação de macrófagos. No entanto, há poucos dados na literatura sobre os mecanismos que afetam o desenvolvimento e a manutenção das células Th2 (LINDELL *et al.*, 2008).

Confirmando os estudos, uma investigação identificou um mecanismo de susceptibilidade à infecção pelos tripanosomatídeos, pela supressão de macrófagos, devido à resposta polarizada ao Th2, que reflete na expressão de IL-4 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; KIERSZENBAUM, 1981). Isso porque, os macrófagos residuais do fígado (células de Kupffer) desempenham

papel fundamental nas anormalidades imunes induzidas por etanol e na doença hepática (DENG *et al.*, 2002).

A maioria dos trabalhos publicados sobre os efeitos do álcool na células apresentadoras de antígeno (APCs) incluiu subconjuntos APCs "clássicos", como monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC), células de Kupffer (KC) e Langerhans em condições experimentais distintas (ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009). As APCs são células especializadas do sistema imune inato, que possuem um importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T, levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de uma resposta imune específica efetiva (SAALMULLER, 2006).

A ativação inespecífica de macrófagos e células NK acompanhados de ativação policlonal de linfócitos B e T e hipergamaglobulinemia são observados durante estágios iniciais da parasitemia (HATCHER *et al.*, 1981; LUNA-GOMES *et al.*, 2014). No entanto, estudos identificaram a presença de uma etapa de imunossupressão generalizada *in vitro* de macrófagos mediado por produtos de linfócitos T ativados (HATCHER *et al.*, 1981).

Além do consumo de álcool, infecções parasitárias em modelos experimentais como em camundongos, representam excelentes exemplos de infecções controladas exclusivamente por respostas Th1 ou Th2. A imunidade ao protozoário *Leishmania major* é totalmente dependente de Th1, e a imunidade a *Strongyloides stercoralis* é totalmente dependente de Th2 (LOCKSLEY; SCOTT, 1991).

Há muitos estudos na literatura com ênfase na elucidação da resposta imune em infecções causadas por protozoários associadas à doenças com alta morbimortalidade na população humana, como aquelas causadas pelos membros da família *Trypanosomatidae*. Diante da complexidade da rede de interações celulares e moleculares do sistema imune, acredita-se que ainda há muito a se investigar, principalmente no que diz respeito ao perfil de susceptibilidade e resistência do

indivíduo associado ao padrão de citocinas produzidas no microambiente da infecção (BESTETTI, 2016). Uma vez que o álcool sabidamente interfere nesse perfil, mudando a hierarquia de apresentação de antígenos para Linfócitos B e, com isso, favorecendo a geração de Linfócitos T produtores de grandes quantidades de IL-4, seria altamente relevante investigar a relação entre a ingestão de álcool com o curso da infecção por *T. cruzi*. Esse estudo torna-se ainda mais importante na medida que o exato papel da IL-4 na infecção por *T. cruzi* ainda não está totalmente definido e o fato do álcool ser uma droga de abuso lícita, amplamente consumida em todo o mundo.

Em modelo experimental, este estudo investigou o comportamento da infecção pelo *T. cruzi* em animais pré-expostos ao álcool. Avaliou-se a parasitemia e o perfil de citocinas das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e células NK) e linfócitos T esplênicos, estimulados após cultura com antígenos do parasito.

Nesse sentido, esta dissertação tem um caráter inovador, uma vez que ainda não se estudou essa relação consumo de álcool x infecção por *T. cruzi* no modelo proposto, e os conhecimentos gerados podem contribuir para ampliar as bases do conhecimento imunológico, fundamentais para a definição resistência e susceptibilidade em processos infecto-parasitários.

2 Objetivo

Avaliar o efeito do pré-tratamento com etanol na suscetibilidade de camundongos à infecção por *Trypanosoma cruzi*, analisado pelo perfil de citocinas produzido por leucócitos, com ênfase em APC e Linfócitos.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar, em APC esplênicas, a produção das citocinas (IL-4, IL-10, IFN-g) em células dendríticas CD11c+, macrófagos CD14+ e linfócitos B CD19+, utilizando a citometria de fluxo, em animais previamente tratados com etanol a 10% e posteriormente infectados com T. cruzi;
- Avaliar, em Linfócitos T esplênicos, TCD4 e TCD8, a produção das citocinas (IL-4, IL-10, IFN-g), utilizando a citometria de fluxo, em animais previamente tratados com etanol a 10% e posteriormente infectados com T. cruzi;
- Avaliar, em células Natural Killer, a produção das citocinas (IL-4, IL-10, IFN-g), utilizando a citometria de fluxo, em animais previamente tratados com etanol a 10% e posteriormente infectados com T. cruzi.

3 Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

Este estudo trata-se de um investigação experimental que foi realizado durante os meses de maio à novembro de 2014 no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz- MG, e análises realizadas no Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microorganismos/Unimontes- MG.

3.2 Amostras

Nesta pesquisa foram utilizados 20 camundongos da linhagem C57/BL6, adultos (8 semanas), provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais com cinco animais cada (Tabela I). É importante ressaltar que foi considerado como dia zero (0) o dia da infecção, que foi realizado após 15 dias de administração intragástrica de etanol. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido ao Comitê de uso animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ).

Identificação do grupo		Descrição do tratamento
Não Infectado	Água	Grupo controle tratado via intragástrica com água filtrada
	EtOH	Grupo controle etanol, tratado via intragástrica com solução de 10% de etanol por 15 dias
Infectado	Água	Grupo controle de infecção, infectados com <i>T. cruzi</i>
	EtOH	Grupo tratado via intragástrica com solução de 10% de etanol por 15 dias e infectados com <i>T. cruzi</i>

Quadro I: Descrição dos grupos experimentais e o tratamento utilizados nesta pesquisa

3.2.1 Modelo de administração oral (pré-tratamento) de etanol (EtOH)

Após contenção, os animais do grupo EtOH foram submetidos a 15 administrações intragástricas de 0,2 mL de etanol (10% v/v), diluído em água filtrada durante 15 dias consecutivos, através da técnica de gavagem. Os animais do grupo controle receberam somente água filtrada via intragástrica. A infecção pelo *T. cruzi* (descrita abaixo) foi realizada 24 horas após a última administração de EtOH, considerado como Dia 0.

3.2.2 Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* e curva de parasitemia

Vinte e quatro horas após a última administração intragástrica de EtOH, a cepa Y foi inoculada, por via intraperitoneal, com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos, quantificados de acordo com estudos anteriores (BRENER, 1962). Para a determinação da parasitemia, os animais foram avaliados diariamente, a partir do 2º dia após a infecção, até o 13º dia pós-inóculo (BRENER, 1962). Cinco µL de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental, empregando a média diária da parasitemia detectada dos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneos por mL de sangue, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

-Período pré-patente (PPP): Período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia de detecção do parasito no sangue periférico do animal, expresso em dias.

-Período patente (PP): Período compreendido entre o primeiro dia de exame a fresco positivo até a completa negatização da parasitemia, expresso em dias.

-Pico máximo de parasitemia (PMP): Este corresponde ao máximo de parasitemia, expresso em número de tripomastigotas sanguíneos/0.1 mL de sangue.

-Dia do pico máximo de parasitemia (DPMP): Este corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia, expresso em dias.

-Taxa de mortalidade: Para determinação da taxa de mortalidade os animais foram acompanhados diariamente durante todo o curso da infecção, e a mortalidade registrada foi expressa em porcentagem cumulativa.

3.3 Obtenção e preparo de suspensões celulares esplênicas para avaliação de células apresentadoras de antígenos e linfócitos T

Após a realização da eutanásia, o baço dos animais foi retirado em capela de fluxo laminar. Para tanto, o animal foi submetido à anestesia com administração intraperitoneal de Ketamina 50mg/kg e Xilazina 25mg/kg, seguido de deslocamento cervical. Posteriormente, fixado em um suporte. Utilizando-se pinças e tesouras estéreis, a pele do abdome e o peritônio do animal foram cortadas, expondo-se seus órgãos abdominais. Com o auxílio da pinça e da tesoura, o baço foi retirado com o mínimo de gordura possível aderida ao mesmo. O baço foi, então, colocado em um tubo cônico de poliestireno de 15 mL (Falcon® - Becton Dickinson) contendo 5 mL de RPMI 1640 estéril gelado acondicionado em isopor com gelo.

Em seguida, o baço foi colocado em um macerador de vidro estéril, juntamente com uma pequena quantidade de RPMI (2 mL). Após a maceração, o conteúdo foi despejado em um tubo cônico de poliestireno de 15 mL (Falcon® - Becton Dickinson) com aproximadamente 3 mL de RPMI 1640 estéril gelado. Durante todo o procedimento descrito a seguir, os tubos com as amostras foram mantidos em um isopor contendo gelo.

As suspensões celulares esplênicas foram submetidas a uma primeira lavagem por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas por meio de batidas no tubo com o dedo indicador e foi realizado o procedimento de lise osmótica das hemácias, adicionando 9 mL de água estéril e, imediatamente depois, 1 mL de PBS 10 X (0,15M, pH 7,2). Em seguida, a gordura presente na suspensão celular foi retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril, e foi realizada uma nova lavagem por centrifugação a 290 g, 10 minutos, 4°C. Após o descarte do sobrenadante, os leucócitos

esplênicos foram ressuspensos por meio de batidas no tubo com o dedo indicador. Subsequentemente, foi adicionado a cada tubo, 1 mL de PBS 5% SFB (0,15M, pH 7,2) gelado. Os tubos foram mantidos em isopor contendo gelo para a realização da contagem celular.

3.3.1 - Contagem das células viáveis

Para a diferenciação entre células viáveis e não-viáveis, foi utilizado o corante Azul de Tripán 0,4%. Uma solução estoque de Azul de Tripán 0,2% foi preparada em PBS (0,15M, pH 7,2). Para a contagem das células, foram misturados 50 µL da suspensão celular (1:100) em volume igual da solução de Azul de Tripán 0,2%. A solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e, utilizando-se a mesma pipeta, foi retirado uma alíquota de aproximadamente 10 µL da solução. Foram contadas as células não-coradas (viáveis) e as coradas (não-viáveis) dos 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico no aumento de 400X. A suspensão celular foi ajustada para a concentração de 1×10^7 células/mL.

3.4 Detecção de citocinas intracitoplasmáticas em células apresentadoras de antígeno e linfócitos T pela Citometria de Fluxo

Os ensaios de detecção de citocinas intracitoplasmáticas foram realizados de acordo com o protocolo descrito a seguir. Após a obtenção da suspensão celular peritoneal enriquecida de macrófagos, como descrito no item - Suspensão celular enriquecida de macrófagos peritoneais, 500 µL da suspensão celular ($1,0 \times 10^7$ céls/mL) foram incubados (37°C, 5% de CO₂, 4 horas, sem agitação), em tubos de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON), com 1000 µL de uma solução contendo o agente estimulador, PMA (Phorbol Myristate Acetate, 1 mg/mL), juntamente com 1 µL ionomicina (1mg/mL) e 10 µL de brefeldina A (1mg/mL). A utilização de Brefeldina A assegura a retenção das citocinas no interior celular, mantendo a citocina no complexo de Golgi. Além disto, foi avaliado também estímulos antigênicos para *T. cruzi*, utilizado antígeno solúvel de epimastigotas, obtido conforme descrito por Gomes et al. (2005). Para cada tubo, foi realizado

um controle sem a adição do estímulo PMA (Phorbol Miristate Acetate). Após 4 horas de incubação, foram adicionados à suspensão celular 110 µL de EDTA (0,1g/mL, 20mM) e foi realizada uma incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), e adicionado 200 µL de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas por meio de batidas no tubo com o dedo indicador. As células foram incubadas (30 minutos ao abrigo da luz, a 4°C) com o anticorpo antiMac3-FITC (antimacrófagos). Em seguida, as amostras foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), adicionando-se 200 µL de PBSWash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. O sobrenadante foi desprezado e posteriormente realizada a lise de hemácias adicionando-se a cada tubo, sob agitação no vórtex, 5 ml da solução de lise (Billig 10X pH 7.85). Foi realizada uma nova lavagem por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), adicionando-se 200 µL de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo. Posteriormente, foram adicionados a cada tubo 3 mL de uma solução de PBS contendo 0,5% de saponina (PBS-P), um detergente para fazer a permeabilização da membrana plasmática. Após incubação com PBS-P por 15 minutos à temperatura ambiente, as células foram lavadas por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), adicionando-se 200 µL de PBSWash (PBS-W, 15M pH 7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada tubo e foi realizada a marcação com os anticorpos anticitocinas. Aos wells de placas de 96 poços, fundo em U (FALCON® - BECTON DICKINSON), serão adicionados previamente 10 µL dos anticorpos anti (IL-12, TNF-, IL-4 e IL-10) marcados com PE de acordo com a diluição padrão estabelecida (Tabela 1). Vinte e cinco µL da suspensão celular (marcada com antiMac3) foram então transferidos dos tubos para cada well das placas de 96 poços já contendo os anticorpos anticitocinas, de acordo com o protocolo experimental. Após 30 minutos de incubação a 4°C, ao abrigo da luz, foram realizadas 2 lavagens por centrifugação (315 g, 7 minutos, 4°C), adicionando-se 200 µL de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) e posteriormente 200 µL de PBS-P a cada well. O sobrenadante será desprezado. As células foram, então, ressuspensas e fixadas com MFF (10g/L

de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/L de Cloreto de sódio, pH7.2). As amostras contendo suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos cônicos de polipropileno de 5 mL (BECTON DICKINSON). A aquisição para leitura dos parâmetros fenotípicos foi realizada em aparelho FACScalibur (BECTON DICKINSON), utilizando ajustes previamente determinados em experimentos de padronização.

Anticorpo	Fluorocromo
Anti-IL-4	PE
AntiIL-10	PE
Anti-IFN-γ	PE

Quadro II: Anticorpos para detecção de citocinas intracitoplasmáticas em macrófagos peritoneais pela citometria de fluxo. Todos os anticorpos utilizados foram produzidos pela BD Biosciences Pharmingen.

3.5 - Imunofenotipagem celular pela Citometria de Fluxo no contexto ex-vivo

As reações de imunofluorescência foram realizadas de acordo com protocolo sugerido pela BECTON DICKINSON (San Jose, CA, USA) e adaptado para placas de 96 poços, como descrito a seguir. A cada well da placa de 96 poços fundo em U (FALCON® - BECTON DICKINSON) foram adicionados 25 μ L da suspensão celular (1x10⁷ céls/ml), obtida segundo a descrição feita no item - Obtenção e preparo de suspensões celulares. Em seguida, foram adicionados a cada well da placa 10 μ L da solução de anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de interesse, marcados com diferentes fluorocromos, diluídos em tampão PBS 5%SFB (0,15M, pH 7,2), sendo a diluição de cada anticorpo deverá ser previamente obtida por padronização (Tabela 2). Para cada teste, foram utilizadas 250.000 células por poço, que foram incubando com os anticorpos por 30 min ao abrigo da luz a 4°C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens das amostras pela adição de 200 μ L de PBS-Wash (PBS-W, 15M pH7.4, contendo 0.5% FCS e 0.1% de azida sódica) a cada well, seguidas por centrifugação a 315 g, 7min, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas e

fixadas em 200µL de solução fixadora MaxFacsFix (MFF- 10g/L de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/L de Cloreto de sódio, pH7.2). As amostras, então, foram transferidas para tubos cônicos de poliestireno de 5 mL (BECTON DICKINSON) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo. A aquisição para leitura dos parâmetros fenotípicos foi realizada em aparelho FACScalibur (BECTON DICKINSON), utilizando-se ajustes previamente determinados em experimentos de padronização.

Anticorpo	Fluorocromo	Célula-alvo
AntiCD3	CY	Linfócito T
AntiCD3	FITC	Linfócito T
AntiCD4	FITC	Linfócito T
AntiCD11c	APC	Célula dentrítica/ Macrófago
AntiCD14	FITC	Macrófago
AntiCD19	FITC	Linfócito B
AntiNk1.1	FITC	Célula Natural Killer

Quadro III - Anticorpos para imunofenotipagem celular por citometria de fluxo no contexto ex-vivo. Todos os anticorpos utilizados foram produzidos pela BD *Biosciences Phamingen*.(APC- célula apresentadora de antígeno).

3.6 Análise estatística dos dados

Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 3.03. Para dados que apresentarem uma distribuição paramétrica foi empregado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Para dados com distribuição não paramétrica foi empregado o teste Kruskal-wallis, seguido pelo Teste de Dunns. Análises de correlação entre variáveis de distribuição paramétrica ou não paramétrica foram realizadas pelos testes de Pearson ou Spearman, respectivamente. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 Produtos Científicos

4.1 Artigo Científico: Ingesta de álcool antes da infecção por *Trypanosoma cruzi* causa aumento seletivo de interleucina 4 produzida por linfócitos T em modelo animal

Artigo Original a ser submetido para Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Publicação de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – SBMT. Versão impressa: ISSN 0037-8682. Versão On-line: ISSN 1678-9849. Missão: Publicar trabalhos científicos relacionados às doenças infecciosas e parasitárias, medicina preventiva, saúde pública e assuntos correlatos.



Autores:

- Paulo Henrique Tolentino Moura

Médico, mestrando em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Montes Claros. paulohtm@yahoo.com.br

- Beatriz P. Noronha

Biomédica, UNIBH.

amandinharcastro19@gmail.com

- Marcio Sobreira Silva Araújo

Pós Doutor. Centro de Pesquisas René Rachou. FioCruz/MG.

sobreira@cpqrr.fiocruz.br

-Mariléia Chaves Andrade.

Doutora em Imunologia. Professora da Universidade Estadual de Montes Claros.

andrade.marileia@gmail.com

CARTA DE APRESENTAÇÃO

Ao Editor Chefe da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,
Publicação de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – SBMT.

Apresentamos o artigo “Ingesta de álcool antes da infecção por *Trypanosoma cruzi* causa aumento seletivo de interleucina 4 produzida por linfócitos T em modelo animal”, de autoria de Paulo Henrique Tolentino Moura, Beatriz P. Noronha, Marcio Sobreira Silva Araújo e Mariléia Chaves Andrade para ser submetido para avaliação e publicação na categoria Artigo Original, da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Declaramos que este artigo submetido trata-se de pesquisa original que ainda não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico.

Declaramos ainda ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Concordamos que, caso o manuscrito seja aceito para publicação, será transferido todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Paulo Henrique Tolentino Moura

Beatriz P. Noronha

Marcio Sobreira Silva Araújo

Mariléia Chaves Andrade

Ingesta de álcool antes da infecção por *Trypanosoma cruzi* causa aumento seletivo de interleucina 4 produzida por linfócitos T em modelo animal

(Intake of alcohol before infection by *Trypanosoma cruzi* provides selective increase of interleukin 4 produced by T lymphocytes in animal model)

Autores:

- Paulo Henrique Tolentino Moura

Médico, mestrando em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Montes Claros. paulohtm@yahoo.com.br

- Beatriz P. Noronha

Biomédica, UNIBH.

amandinharcastro19@gmail.com

- Marcio Sobreira Silva Araújo

Pós Doutor. Centro de Pesquisas René Rachou. FioCruz/MG.

sobreira@cpqrr.fiocruz.br

-Mariléia Chaves Andrade.

Doutora em Imunologia. Professora da Universidade Estadual de Montes Claros.

andrade.marileia@gmail.com

RESUMO ESTRUTURADO

INTRODUÇÃO: A infecção por *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, induz uma resposta imune no hospedeiro cuja eficiência é importante para que a infecção persista ou seja eliminada. Com o consumo de etanol (EtOH) ocorre um grande impacto sobre as atividades do sistema imune, como alteração da expressão de moléculas de co-sinalização em células apresentadoras de antígenos (APCs) que possuem um papel fundamental na determinação da função efetora de linfócitos T, direcionando o perfil dessas células para a tolerância ou para a inflamação.

MÉTODOS: Nosso estudo avaliou o perfil fenotípico das APCs e linfócitos T em camundongos da linhagem C57/BL6 não infectados e infectados com *T. cruzi* e tratados e não tratados com etanol (EtOH) durante 15 dias.

RESULTADOS: Nosso resultado demonstrou maior parasitemia nos primeiros dias de inoculação no grupo infectado *T. Cruzi* e tratado com EtOH. Os animais tratados com EtOH apresentaram modificações funcionais relacionadas com alterações na produção de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ) por linfócitos T CD4+ e CD8+. O mesmo resultado reflete na expressão das célula NK, quanto a produção de citocinas (IL-10 e TNF- α). Por células dendríticas CD11c+, macrófagos CD14+, linfócitos B CD19+, não houve diferença significativas. O consumo do etanol repercutiu de forma mais significativa sobre a população de linfócitos T e células NK, levando a um predomínio de um perfil inflamatório por T helper 2, caracterizado pela diminuição de moléculas de ativação celular, como IFN- γ , e por um aumento de moléculas associadas com atividades de modulação de linfócitos T CD8+, como IL-10, associado à um aumento com significância estatística de IL-4 em linfócitos T CD4+.

CONCLUSÃO: Os resultados adquiridos com o desenvolvimento deste trabalho permitiram concluir que houve aumento na parasitemia no terceiro dia após a infecção, refletindo maior suscetibilidade à infecção nesses animais pré tratados com etanol. Observou-se que os linfócito T CD4+ contribuíram para um aumento de citocinas IL-4. Constatou-se que o principal mecanismo de proteção por células T CD8+, na fase aguda, seja relacionado com a produção de IFN- γ , mas houve uma tendência de aumento da citocina moduladora IL-10. Percebemos que os animais tratados com EtOH apresentam uma provável redução de IFN- γ induzido por células NK, mas sem aumento da produção de IL-10. Nossos resultados não demonstraram diferenças na produção de citocinas por macrófagos, monócitos e células B.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*; Alergia e Imunologia; Etanol

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Trypanosoma cruzi* infection, which causes Chagas' disease, induces an immune response in the host whose efficiency is important for the infection to persist or be eliminated. With the consumption of ethanol (EtOH), there is a great impact on the activities of the immune system, such as the alteration of the expression of co-signaling molecules in antigen-presenting cells (APCs), which play a fundamental role in the determination of T lymphocyte effector function, directing the profile of these cells to tolerance or to inflammation. **METHODS:** Our study evaluated the phenotypic profile of APCs and T lymphocytes in uninfected and *T. cruzi* infected and untreated C57 / BL6 mice (EtOH) for 15 days. **RESULTS:** Our results showed a higher parasitemia in the first days of inoculation in the infected group *T. cruzi* and treated with EtOH. The animals treated with EtOH exhibited functional modifications related to changes in the production of cytokines (IL-4, IL-10 and IFN- γ) by CD4 + and CD8 + T lymphocytes. The same result reflects on NK cell expression, as for the production of cytokines (IL-10 and TNF- α). For CD11c + dendritic cells, CD14 + macrophages, CD19 + B lymphocytes, there was no significant difference. The consumption of ethanol had a more significant effect on the population of T lymphocytes and NK cells, leading to a predominance of an inflammatory profile by T helper 2, characterized by the decrease of cellular activation molecules, such as IFN- γ , and by an increase of molecules associated with CD8 + T lymphocyte modulating activities, such as IL-10 associated with a statistically significant increase of IL-4 in CD4 + T lymphocytes. **CONCLUSION:** The results obtained with the development of this work allowed to conclude that there was an increase in parasitemia on the third day after infection, reflecting a higher susceptibility to infection in these animals pretreated with ethanol. It was observed that CD4 + T lymphocytes contributed to an increase in IL-4 cytokines. It was found that the main mechanism of protection by CD8 + T cells in the acute phase is related to the production of IFN- γ , but there was a tendency to increase the IL-10 modulating cytokine. We found that the animals treated with EtOH show a probable reduction of IFN- γ induced by NK cells, but without an increase in IL-10 production. Our results did not demonstrate differences in the production of cytokines by macrophages, monocytes and B cells.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Allergy and Immunology; Ethanol.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (HOTEZ; MOLYNEUX; FENWICK, 2007). Estima-se em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina, destacando-se a Argentina, o Brasil, o México e a Bolívia. (WHO, 2017; DIAS, J.C.P ; et al., 2016).

Possui duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda é muitas vezes assintomática ou pode se limitar a uma doença febril que dura de quatro a oito semanas (COURA, 2015; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Em muitos pacientes, com o desenvolvimento da resposta imune específica, tanto celular como humoral, a parasitemia diminui e os sinais e sintomas são resolvidos completamente em cerca de dois a quatro meses, ocorrendo a recuperação de um estado aparentemente saudável. Esses indivíduos entram na fase crônica da doença de Chagas, que perdura por toda a vida do indivíduo infectado (MONCAYO; SILVEIRA, 2009; TANOWITZ et al., 2009).

Durante o processo de evolução da infecção por *T. cruzi*, as respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem (ANDRADE, D. V. et al., 2014). A resposta inata é normalmente mais importante nas fases iniciais da infecção, uma

vez que linfócitos e anticorpos específicos precisam de um tempo para serem gerados. Por outro lado, a resposta adaptativa desempenha um papel importante após a cronificação da doença, ou mesmo em respostas secundárias (COURA, 2015).

Dessa forma, a resposta imune que se segue à infecção é bastante complexa e representa importante fator na determinação da evolução da inflamação. Já tem sido bem aceito que a ausência de patologia chagásica está principalmente associada com a habilidade do hospedeiro infectado para regular a resposta imune anti-*T.cruzi*. Entretanto, essa resposta que controla a parasitemia persistente também pode contribuir para o dano inflamatório, que causa a morbidade da doença de Chagas (SATHLER-AVELAR R et al., 2009).

Acredita-se que estas manifestações sejam consequências de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) (DIAS, J.C.P., 2000). Alguns autores apontam, ainda, para a existência de reação cruzada entre componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (ANDRADE, D. V. et al., 2014; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015; DOSREIS, 2011).

As células presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos demonstraram grande número de células T e B circulantes. Embora inúmeros trabalhos utilizando modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção pelo *T. cruzi*, o papel dessas células ainda

não está totalmente esclarecido na infecção humana (ROTTENBERG *et al.*, 1993; SOUZA, P. E. A. *et al.*, 2007).

Sabe-se que durante a infecção aguda, existe intensa reação inflamatória. As citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, TNF- α e IFN- γ , são prontamente liberadas por células imunes ativadas e ativam ainda mais outras células inflamatórias (BILATE; CUNHA-NETO, 2008; MACHADO *et al.*, 2008).

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência à infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas. Citocinas e mediadores da resposta imune como a IL-10, prostaglandinas, reativos intermediários de oxigênio ou de nitrogênio são moléculas que poderiam mediar a supressão da proliferação e ativação de linfócitos (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; DE BARROS-MAZON *et al.*, 2004), levando, conseqüentemente, à diminuição da intensidade da reação imune. Além disso, foi observado que monócitos de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada apresentam características moduladoras, como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10. Diferentemente, monócitos derivados de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca parecem estar comprometidos com intensa resposta inflamatória, devido à alta expressão de TNF- α , sugerindo participação crítica dessas citocinas na infecção (SOUZA, P. E. *et al.*, 2004).

Dentre as citocinas envolvidas, o IFN- γ possui papel crítico no controle inicial da replicação do parasito. A regulação da expressão de quimiocinas e de IFN- γ , associados ao decréscimo do parasitismo tecidual, pode ser responsável pelo controle da inflamação em infecções experimentais por *T. cruzi* (MARTINS *et al.*, 2004; SILVA, J. S. *et al.*, 1992).

A ação dos parasitos em células monocíticas promove a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α e IL-12), quimiocinas e óxido nítrico (NO) (TALVANI, A. *et al.*, 2009; TALVANI, A. *et al.*, 2004). Essas interações fornecem a primeira linha de defesa contra a infecção, embora de eficácia limitada, e fornecem os sinais inflamatórios necessários para a resposta imune adaptativa (SATHLER-AVELAR R *et al.*, 2009). Um sistema de *feedback* positivo para IL-12 atua estimulando as células *natural killer* a sintetizar IFN- γ e gerar respostas de linfócitos tipo I (*T helper* I), que estimula macrófagos para liberar mais TNF- α , IL-12, NO e quimiocinas (BASTOS *et al.*, 2007; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002).

A persistência do parasito no hospedeiro é característica marcante da doença de Chagas. As células T podem exercer citotoxicidade mediada por células CD8+ ou através da secreção de citocinas, que ativam macrófagos para destruir os agentes intracelulares.

Durante a fase aguda da infecção experimental, caracterizada por alta parasitemia, as células T CD4+ são o subconjunto predominante, seguido pelas células T CD8+. À medida que a doença progride, as células T CD8+ assumem o

controle como o tipo de células inflamatórias predominantes. As células T CD4+ e CD8+ são relevantes para controlar a replicação parasitária (por exemplo, replicação descontrolada e alto parasitismo), mas novamente podem contribuir para causar inflamação e danos nos tecidos à medida que a doença progride (PASCUTTI *et al.*, 2003; RACHID *et al.*, 2006)

Entretanto, toda essa resposta imunológica conhecida pode ser alterada em função do consumo de álcool. O consumo crônico do etanol tem demonstrado um aumento significativo da prevalência de infecções causadas por organismos oportunistas e patogênicos, tais como bactérias, vírus e fungos (SZABO, 1999).

Estudos têm revelado que o consumo de álcool, seja de forma crônica ou aguda, resulta em alterações em componentes celulares do sistema imune inato e adaptativo. Essas alterações são parcialmente mediadas por citocinas e mensageiros químicos (NELSON; KOLLS, 2002).

A administração de etanol a curto prazo pode mudar a classe de resposta imune desencadeada para uma reatividade de tipo II (*T helper* II), quando promove o aumento dos níveis séricos de IgE (DE ROUX *et al.*, 2006). Existem outras evidências na literatura, inclusive do nosso grupo de pesquisa, de que a apresentação de antígenos por células B pode levar a polarização *T helper* II e respostas alérgicas (ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2002), incluindo inflamação, eosinofilia, acúmulo e ativação de macrófagos. No entanto, há poucos dados na literatura sobre os mecanismos que afetam o desenvolvimento e a manutenção das células *T helper* II (LINDELL *et al.*, 2008).

Corroborando com os estudos (ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2002), já foi identificado um mecanismo de susceptibilidade à infecção pelos tripanosomatídeos, pela supressão de macrófagos devido à resposta polarizada ao *T helper* II, que reflete na maior expressão de IL-4 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; KIERSZENBAUM, 1981). Isso porque, os macrófagos residuais do fígado (células de Kupffer) desempenham um papel fundamental nas anormalidades imunes induzidas por etanol e na doença hepática (DENG *et al.*, 2002).

A maioria dos trabalhos publicados sobre os efeitos do álcool na células apresentadoras de antígeno (APCs) incluiu subconjuntos APCs "clássicos", como monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC), células de Kupffer (KC) e Langerhans em condições experimentais distintas (ANDRADE, M. C. *et al.*, 2009). As APCs são células especializadas do sistema imune inato que possuem importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, visto que apresentam o antígeno para os linfócitos T, levando à ativação dessa população celular e desencadeando o início de resposta imune específica efetiva (SAALMULLER, 2006).

Diante da complexidade da rede de interações celulares e moleculares do sistema imune, ainda há muito a se investigar, principalmente no que diz respeito ao perfil de susceptibilidade e resistência do indivíduo, associado ao padrão de citocinas produzidas no microambiente da infecção, especialmente as causadas pelos membros da família *Trypanosomatidae*. Uma vez que o álcool sabidamente

interfere nesse perfil, mudando a hierarquia de apresentação de antígenos para Linfócitos B e, com isso, favorecendo a geração de Linfócitos T produtores de grandes quantidades de IL-4, seria altamente relevante investigar a relação entre a ingestão de álcool com o curso da infecção por *T. cruzi*. Esse estudo torna-se ainda mais importante na medida que o exato papel da IL-4 na infecção por *T. cruzi* ainda não está totalmente definido e o fato do álcool ser uma droga de abuso lícita, amplamente consumida em todo o mundo (BESTETTI, 2016).

Em estudos laboratoriais, o consumo de álcool por camundongos causou um aumento nos níveis de infecção parasitária dos protozoários *Trypanosoma cruzi* (GOMES, N. D. G.; PEREIRA, 1989). Nesta pesquisa, de forma inovadora, foi realizada a análise dos níveis de parasitemia associado ao perfil de citocinas das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, células NK) e linfócitos T esplênicos, estimulados após cultura com antígenos do parasito, em camundongos que foram pré-expostos à administração do etanol e infectados pelo *T. cruzi*.

MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 20 camundongos da linhagem C57/BL6, adultos (8 semanas), provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz-MG. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais com cinco animais cada, sendo: um grupo controle tratado via intragástrica com água filtrada; um grupo controle tratado via intragástrica com solução de 10% de etanol por 15 dias; um grupo

controle infectado com *T. cruzi* e tratado via intragástrica com água; um grupo tratado via intragástrica com solução de 10% de etanol por 15 dias e infectados com *T. cruzi*.

Após contenção, os animais do grupo EtOH foram submetidos a 15 administrações intragástricas de 0,2 mL de etanol (10% v/v), diluído em água filtrada durante 15 dias consecutivos, através de gavagem. Os animais do grupo controle receberam somente água filtrada via intragástrica.

Foi considerado como dia zero o dia da infecção, que foi realizado após 15 dias de administração intragástrica de etanol. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido ao Comitê de uso animal da Fundação Oswaldo Cruz

Vinte e quatro horas após a última administração intragástrica de EtOH, a cepa Y foi inoculada, por via intraperitoneal, com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos, quantificados de acordo com Brener (1962). Para a determinação da parasitemia, os animais foram avaliados diariamente, a partir do 2º dia após a infecção, até o 13º dia pós-inóculo (BRENER, 1962).

Após a realização da eutanásia, o baço dos animais foi retirado em capela de fluxo laminar. Para tanto, o animal foi submetido à anestesia com administração intraperitoneal de Ketamina 50mg/kg e Xilazina 25mg/kg, seguido de deslocamento cervical. Posteriormente, fixado em um suporte. O baço dos animais foi retirado em capela de fluxo laminar, com o mínimo de gordura

possível, em seguida macerado e preparado conforme o protocolo de Brener (BRENER, 1962). Conforme demonstrado na Figura 1, houve incubação com anticorpos de superfície marcados com fluorocromos para identificação celular (Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD8, Anti-CD19, Anti-Mac3, Anti-NK1.1, Anti-CD11c). A seguir, incubação com anticorpos Anti-citocinas (Anti-IL4, Anti-IL10, Anti-INF γ , Anti-TNF), com fixação e posterior análise. Assim, realizou-se a detecção de citocinas intracitoplasmáticas em APCs e linfócitos T pela citometria de fluxo.

Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 3.03. Para dados que apresentaram uma distribuição paramétrica foi empregado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Para dados com distribuição não paramétrica foi empregado o teste Kruskal-wallis, seguido pelo Teste de Dunns. Análises de correlação entre variáveis de distribuição paramétrica ou não paramétrica foram realizadas pelos testes de Pearson ou Spearman, respectivamente. Em todas as análises, as diferenças serão consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Nos primeiros dias de análise o nível de parasitemia foi similar para os grupos controle e infectado (figura 1). Animais infectados com *T. cruzi* e pré-tratados

com EtOH, apresentaram maior contagem de parasitos no sangue desde o início do período patente (quarto dia após a infecção) até o sétimo dia pós-infecção, quando comparados ao grupo de controles infectados ($p < 0,05$). Interessantemente, por volta do quinto dia pós-infecção, em ambos os grupos observou-se um aumento do número de parasitos circulantes, destacando que no grupo pré-tratado com EtOH o nível de parasitemia se manteve maior que no grupo controle até o sétimo dia ($p < 0,05$). No sétimo dia, houve o pico de parasitemia para ambos os grupos e não observou-se mais a diferença no nível de parasitemia até o fim do experimento, sendo que ambos os grupos apresentaram a mesma dinâmica de controle da parasitemia, pelo menos no que diz respeito à diminuição de parasitos circulantes.

No grupo não infectado houve aumento no nível intracelular de IL-4 em linfócitos T CD4+ dos animais tratados com EtOH comparados com aqueles não tratados ($p < 0,05$). Esse mesmo perfil foi mantido no grupo infectado com *T. cruzi*, destacando para um nível ainda mais elevado de IL-4 ($p < 0,05$) no grupo tratado com EtOH quando comparado com seu respectivo controle (Figura 3A).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos que ingeriram EtOH e os que não ingeriram, quando analisada a frequência de linfócitos T CD4+ expressando IL-10, mesmo após a infecção (Figura 3B).

Na análise de IFN- γ no grupo não infectado, observou-se que não houve diferença significativa entre os animais não tratados com água ou com EtOH. No entanto, linfócitos T CD4+ de animais infectados com *T. cruzi* apresentam um

pronunciado aumento na produção de IFN- γ ($p < 0,05$) quando comparados com animais não infectados e que receberam água como pré-tratamento (Figura 3C).

Em animais não infectados, observou-se uma redução significativa de IL-4 em linfócitos T CD8+ ($p < 0,05$), no grupo tratado com água, quando comparado ao grupo tratado com EtOH (Figura 4A). No grupo infectado com *T. cruzi*, isso não foi observado. A infecção com *T. cruzi* contribuiu para uma reversão no perfil observado nos animais não infectados, no que diz respeito a uma diminuição da produção de IL-4 no grupo controle e aumento de IL-4 produzida por linfócitos T CD8+ no grupo pré-tratado com etanol, apesar dessa diferença não ter confirmação estatística ($p > 0,05$).

Em relação à análise de IL-10 e IFN- γ em linfócitos T CD8+, apesar de não haver diferença significativa nos grupos analisados, observou-se uma tendência a um aumento na produção dessas citocinas, potencializado tanto pelo pré-tratamento com EtOH quanto pela infecção com *T. cruzi* (Figura 4B e C).

Apesar dos dados sugerirem que o tratamento com EtOH e/ou a infecção contribuíram para uma redução da produção de IL-4 por células NK esplênicas (Figura 5A), não houveram diferenças significativas para comprovar essa observação ($p > 0,05$).

A análise de IL-10 sugere que o pré-tratamento com EtOH induz uma tendência de diminuição na produção dessa citocina por células NK, redução essa ainda mais

acentuada quando os animais foram infectados com *T. cruzi* e receberam EtOH (Figura 5B).

Interessantemente, a análise da produção de IFN- γ demonstrou que tanto o álcool quanto a infecção, contribuíram para queda drástica ($p < 0,05$) na produção dessa citocina por células NK esplênicas (Figura 5C), sendo que a soma dos efeitos (EtOH + *T. cruzi*), contribuiu ainda mais para esse perfil de baixa produção de IFN- γ por células NK ($p < 0,05$).

A produção de IL-10 por células dendríticas CD11c+ dos grupos avaliados, apesar de não observado diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$), demonstrou uma tendência à elevação após a administração de EtOH e/ou *T. cruzi*. Um possível aumento de TNF- α em células dendríticas pareceu se relacionar mais com a infecção do que com a administração de EtOH.

Em relação à população de macrófagos CD14+ esplênicos, os dados sugeriram que o pré-tratamento com EtOH contribuiu para tendência de aumento na produção de IL-10, o que não acontece após a infecção. Ao contrário, no contexto do álcool mais a infecção com o parasito, pareceu haver uma modulação na produção dessa citocina. Em relação ao TNF- α , uma situação interessante foi apresentada: o pré-tratamento com EtOH modulou a elevação dos níveis intracelulares dessa citocina induzida pela infecção com *T. cruzi*.

A análise de produção de citocinas por linfócitos B CD19+ demonstrou que tanto a administração de álcool quanto a infecção com *T. cruzi* não repercutiu em

diferenças no que diz respeito à produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ , que mostrou-se semelhante em todos os grupos analisados.

DISCUSSÃO

Na análise dos níveis de parasitemia, o distinto perfil no curso da infecção, proporcionado pelo tratamento com o EtOH, poderia ser justificado por maior suscetibilidade à infecção. Houve aumento do número de parasitos circulantes nos grupos a partir do quinto dia pós-infecção. No grupo que ingeriu etanol, o nível de parasitemia foi que no grupo controle até o sétimo dia, quando se equipararam. Os dados sugerem que os efeitos no organismo da administração por 15 dias de EtOH a 10% sejam facilitadores do sucesso da infecção pelo parasito.

O tempo de 15 dias de ingestão de EtOH a 10% é considerado ingesta crônica (KNAPP *et al.*, 2016) e, assim, demonstra um impacto na evolução da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos. O estudo de Gomes e Pereira (1989) apresentou o efeito da intoxicação por etanol administrado por 5 meses na evolução da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, comprovando que os animais apresentaram altos níveis de parasitemia. Nosso estudo complementa essas informações, demonstrando, de forma muito interessante, que a administração de EtOH por 15 dias tem o mesmo impacto em relação à parasitemia.

A resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa e representa importante fator na determinação do destino da infecção. Entretanto,

essa resposta que controla a parasitemia persistente, também pode contribuir para o dano inflamatório que causa a morbidade da doença de Chagas (SATHLER-AVELAR R *et al.*, 2009). A reação inflamatória leva à destruição de tecidos musculares e neurônios e com reação tardia de hipersensibilidade, dilatação da microcirculação e fibrose, induzindo cardiomiopatia crônica dilatada, arritmias, megaesôfago e megacólon (DIAS, J.C.P., 2000).

Observou-se aumento de parasitemia concomitante a um alto grau de parasitismo tecidual, e diminuição de citocinas pro-inflamatórias, demonstrando que ambas as subpopulações CD4+ e CD8+ parecem ser relevantes no controle da infecção. As respostas mediadas por linfócitos T CD4+ e CD8+ e pelos anticorpos produzidos por células B, são essenciais para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro (HIYAMA *et al.*, 2001). Dessa forma, o sistema imunológico é determinante na resistência antiparasitária durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, R.L., 1995). Isso pode ser verificado quando se analisa a infecção pelo *T. cruzi* em animais que têm depletados seus linfócitos T CD4+ (LOPES *et al.*, 1995) ou de CD8+ (TARLETON, R. L., 2015a).

Nosso estudo demonstrou que alterações imunes induzidas após administração crônica de álcool se mantêm na presença da infecção pelo *T. cruzi*, no que diz respeito ao perfil de citocinas produzidas por linfócitos e APCs. Linfócitos T CD4+ e CD8+ de animais pré-tratados com EtOH apresentaram as alterações mais impactantes no contexto da infecção.

Já foi amplamente demonstrado que a produção local de IL-12 e IFN- γ , por mecanismos inatos de defesa, facilitam a indução de células T CD4+ com o fenótipo secretório de células Th1. Essa deve ser a razão pela qual uma onda de ativação de células Th1 ocorre primeiro na infecção chagásica, predominando no início da fase aguda (ZHANG; TARLETON, 1996). Um dos aspectos do controle relaciona-se com a ativação de macrófagos infectados por linfócitos Th1, produtores de IFN- γ , que contribuem com a destruição intracelular de parasitos (MARIANO *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que a ingestão aguda de álcool em alta dose 50% (v/v) proporcionou um estado de atopia em animais C57Bl/6, devido a um aumento de IL-4 (por linfócitos B) e IgE circulante (ANDRADE *et al.*, 2006). No entanto, interessantemente, neste trabalho observamos que a ingestão crônica de baixa dose (10% v/v) de álcool também resultou em aumento de IL-4 na mesma linhagem de camundongos, mas a célula que provavelmente contribuiu para isso foi o linfócito T CD4+, em um perfil secretório Th2.

Nossos resultados condizem com os dados de infecção aguda, por observarmos aumento da produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+ nos animais infectados, sem elevação significativa de IL-10. No entanto, curiosamente, os animais infectados que foram pré tratados com EtOH apresentam além de elevação de IFN- γ , aumento de IL-4, o que poderia comprometer o controle do parasito mediado por IFN- γ na fase aguda, como demonstrado na curva de parasitemia (Figura 2).

Nos animais pré tratados com etanol deste estudo, após a infecção com *T. cruzi*, observou-se que a produção de IL-4 por linfócitos T CD4+ se manteve elevada, mesmo havendo também elevação na produção de IFN- γ . É possível que uma reação inflamatória mista (Th2/Th1) no início da infecção possa favorecer o parasito, contribuindo com a evolução da doença.

A participação de linfócitos T CD8+ na resposta imune deve estar relacionada com a capacidade do parasito infectar células que expressam MHC classe I, ou seja, qualquer tipo celular do organismo, inclusive APC. A atividade imunológica anti-*T. cruzi* está relacionada com citotoxicidade ativada pela apresentação de antígenos proteicos de *T. cruzi* à linfócitos T CD8+, por macrófagos, pela via do MHC I (MARTIN, D.; TARLETON, 2004; MARTIN, D. L. *et al.*, 2006). No entanto, estudos como este têm sido prejudicados pela inexplicável dificuldade de se demonstrar e isolar células T CD8+ citotóxicas específicas para antígenos do parasito (MARTIN, D.; TARLETON, 2004). Entretanto, acredita-se que o principal mecanismo de proteção por células T CD8+, na fase aguda, seja relacionado com a produção de IFN- γ ou de oxido nítrico (NO), com consequente eliminação do parasitismo (ALVARADO ARNEZ *et al.*, 2011; MARTIN, D. L. *et al.*, 2006). Nossos resultados em relação a linfócitos T CD8+ não nos permitiram chegar a uma conclusão sobre a participação dessas células no estudo. Mas, de qualquer maneira, observamos redução na produção de IL-4 por essa população, além de tendência de aumento da citocina moduladora IL-10, evidenciando que há uma provável hierarquia na produção de citocinas nos animais tratados com EtOH e infectados.

Os mecanismos imunológicos desencadeados logo após a infecção por *T. cruzi* parecem ser essenciais para controlar a duplicação precoce de parasitos. Sabe-se que as células NK contribuem com a produção inicial de IFN- γ , desempenhando um papel importante no controle do parasito (ANTUNEZ; CARDONI, 2004; BATALLA *et al.*, 2013). Neste estudo, animais tratados com EtOH apresentaram redução de IFN- γ , induzido por células NK. Mais uma vez, nossos resultados demonstraram que a infecção por *T. cruzi*, no contexto do álcool, pode comprometer o controle celular do parasitismo mediado pelo sistema imune.

Nossos resultados sugerem que a infecção com *T. cruzi* parece favorecer o aumento da produção de IL-10 por células NK, mas, por sua vez, o tratamento com EtOH não estimula o aumento da produção de IL-10, pelo contrário. Um estudo sugere que a produção de IL-10 por células NK, induzida pela infecção com *T. cruzi*, provavelmente poderia levar a uma resistência do hospedeiro (PERONA-WRIGHT *et al.*, 2009). Na verdade, um papel regulador das células NK durante a infecção por *T. cruzi* foi proposto por Cardillo e colaboradores, demonstrando que essas células controlam a hiperatividade das células T de camundongos infectados. O papel principal das células NK, logo após a infecção por *T. cruzi*, seria contribuir para a indução de mecanismos tripanosomicidas, principalmente através da produção inicial de IFN- γ , ajudando na estimulação de macrófagos e matando diretamente parasitos extracelulares (CARDILLO *et al.*, 2004).

Nossos resultados não demonstraram diferenças na produção de TNF- α por macrófagos e monócitos, como também na frequência de células B que

expressam CD19+, nem na produção das citocinas analisadas entre os grupos do estudo.

Apesar de muitas pesquisas e de grandes progressos alcançados no estudo da doença de Chagas, as alterações imunológicas ocorridas dificultam o tratamento e apresentam problemas à saúde (BESTETTI, 2016). Interferência nos mecanismos imunes em processos infecciosos mostrou-se mais evidente à partir dos estudos com pacientes etilistas (SMITH; PALMER, 1976), admitindo que a ingestão crônica de etanol leva a redução da resistência imune à infecção bacteriana no homem (SMITH; PALMER, 1976).

O alcoolismo também vem sendo associado a uma ruptura no balanço e função de citocinas (ACHUR; FREEMAN; VRANA, 2010; CREWS *et al.*, 2006). Concentrações aumentadas de TNF- α e IL-6, bem como uma diminuição nos níveis de IL-2, IFN- γ e IL-10 têm sido frequentemente associadas a pacientes alcoólatras com cirrose (ROMEO *et al.*, 2007). Em contraste, após um consumo moderado de cerveja durante 30 dias, foi mostrado um aumento na produção de IL-2, IL-4 e IL-10 e IFN- γ em humanos. Os resultados contrastantes reforçam a hipótese de que os níveis de álcool consumido podem influenciar o tipo de resposta do sistema imune (ACHUR *et al.*, 2010).

Camundongos naturalmente resistentes e sensíveis à infecção por tripanossomatídeos, respectivamente, C57BL/6 e BALB/c, fazem parte do repertório murino dos modelos experimentais, fornecendo informações importantes no estudo da influência imunológica do hospedeiro na resposta à

infecção. Nosso estudo, utilizando animais C57Bl/6, corrobora com Bryan e colaboradores (2010), que demonstraram que a infecção por *T. cruzi* nesses animais resulta em uma infecção de fase aguda de duração variável, caracterizada por alta parasitemia, grande disseminação do parasito e imunossupressão (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010).

A capacidade do hospedeiro para controlar a infecção por *T. cruzi* é substancial, mas parcialmente efetiva; no entanto, a ação do EtOH permeia ainda mais a depleção do sistema imune, assim a dificuldade em eliminar completamente a infecção por *T. cruzi*. Os dados deste estudo sugerem que esta falha na obtenção de cura parasitológica é resultado de uma resposta imune reprimida ou desregulada, e reflete o sucesso de *T. cruzi* em evadir as respostas imunes do hospedeiro.

CONCLUSÃO

Há aumento do número de parasitos circulantes nos grupos a partir do quinto dia pós-infecção. No grupo que ingeriu etanol, o nível de parasitemia se manteve maior que o seu controle, até se equipararem no sétimo dia. Isso reflete maior suscetibilidade à infecção. Os linfócitos T CD4+ contribuem para elevação de citocinas IL-4. O principal mecanismo de proteção por células T CD8+, na fase aguda, está relacionado com a produção de IFN- γ . A ingestão de etanol não eleva o aumento da produção de IL-10 por células NK.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz- MG e à Universidade Estadual de Montes Claros.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 155, n. 8, p. 3955-63, Oct 15 1995.

ACHUR, R. N.; FREEMAN, W. M.; VRANA, K. E. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar 2010.

ALVARADO ARNEZ, L. E. et al. Sequence variation in the IL4 gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 1, p. 279-82, 282 e1-3, Jan 2011.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005.

ANDRADE, M. C. et al. Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 3, p. 226-37, Sep 2009.

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, Mar-Apr 2004.

BACAL, F. et al. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. **Clin Transplant**, v. 24, n. 2, p. E29-34, Mar-Apr 2010.

BASTOS, K. R. et al. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. **J Interferon Cytokine Res**, v. 27, n. 5, p. 399-410, May 2007.

BATALLA, E. I. et al. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. **J Innate Immun**, v. 5, n. 5, p. 494-504, 2013.

BESTETTI, R. B. Chagas Heart Failure in Patients from Latin America. **Card Fail Rev**, v. 2, n. 2, p. 90-94, Nov 2016.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 67-74, Mar-Apr 2008.

BOYADJIEVA, N. I. et al. Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 11, p. 1719-27, Nov 2002.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e733, Jul 06 2010.

CARDILLO, F. et al. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 8, p. BR259-67, Aug 2004.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-95, Dec 2007.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015.

CHAGAS, C. Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. etiologic agent of a new human morbid entity **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 1, n. 159-218, 1909.

CHESSLER, A. D. et al. *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 2288-96, Feb 15 2009.

CHESSLER, A. D. C. et al. Type I Interferons Increase Host Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 2112-9, May 2011.

COELHO, P. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 5, p. 837-44, May 2002.

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J Infect Dis**, v. 199, n. 3, p. 451-4, Feb 01 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, n. 4, p. 720-30, Apr 2006.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007.

DE BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clin Immunol**, v. 111, n. 1, p. 137-45, Apr 2004.

DE ROUX, A. et al. Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. **Chest**, v. 129, n. 5, p. 1219-25, May 2006.

DENG, J. et al. Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. **Int Immunol**, v. 14, n. 5, p. 513-23, May 2002.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. P47phox^{-/-} mice are compromised in expansion and activation of CD8⁺ T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 12, p. e1004516, Dec 2014.

DIAS, J. C. P. **Epidemiologia**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 48

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde** v. 25, n. spe, 2016.

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, Feb 2011.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 208-18, Jul 2009.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 581-7, Dec 2005.

FERLAZZO, G. et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. **J Exp Med**, v. 195, n. 3, p. 343-51, Feb 04 2002.

FERNANDEZ, E. R. et al. Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104951, 2014.

FUJIMOTO, M.; SATO, S. B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. **J Dermatol Sci**, v. 46, n. 1, p. 1-9, Apr 2007.

GARCIA, C. C. et al. The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. **Discov Med**, v. 10, n. 55, p. 479-88, Dec 2010.

GARSIDE, P.; BREWER, J. In vivo imaging of infection immunology--4I's! **Semin Immunopathol**, v. 32, n. 3, p. 289-96, Sep 2010.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003.

GOMES, N. D. G.; PEREIRA, F. E. [Effects of chronic ethanol intoxication on the evolution of experimental trypanosomiasis cruzi in mice]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 4, p. 191-7, Oct-Dec 1989.

HARRIS, D. P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, p. 475-82, Dec 2000.

HATCHER, F. M. et al. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **J Immunol**, v. 127, n. 3, p. 1126-30, Sep 1981.

HIGUCHI MDE, L. et al. Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v. 2, n. 2, p. 101-6, Apr-Jun 1993.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to Trypanosoma cruzi infection. **Parasitol Res**, v. 87, n. 4, p. 269-74, Apr 2001.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A. Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med** v. 357, n. 1018-1027, 2007.

IRIKOV, O. A.; KOVALENKO, F. P. [Experimental model of activated *Lambliia* (*Giardia*) *muris* infection in albino mice]. **Med Parazitol (Mosk)**, n. 3, p. 7-11, Jul-Sep 2007.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 11, p. 749-61, Nov 2012.

KIERSZENBAUM, F. On evasion of Trypanosoma cruzi from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. **Immunology**, v. 44, n. 3, p. 641-8, Nov 1981.

KNAPP, D. J. et al. Stress and Withdrawal from Chronic Ethanol Induce Selective Changes in Neuroimmune mRNAs in Differing Brain Sites. **Brain Sci**, v. 6, n. 3, Jul 27 2016.

KROLEWIECKI, A. J. et al. Effect of chronic ethanol consumption on protective T-helper 1 and T-helper 2 immune responses against the parasites *Leishmania major* and *Strongyloides stercoralis* in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 4, p. 571-8, Apr 2001.

LIDLAW, B. J. et al. Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. **Nat Immunol**, v. 16, n. 8, p. 871-9, Aug 2015.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**, v. 8, p. 607, 2017.

LINDELL, D. M. et al. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3129, Sep 03 2008.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol Today**, v. 12, n. 3, p. A58-61, Mar 1991.

LOPES, M. F. et al. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v. 154, n. 2, p. 744-52, Jan 15 1995.

LUNA-GOMES, T. et al. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90582, 2014.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MACHADO, F. S. et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 191, n. 4, p. 627-36, Feb 15 2005.

MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect**, v. 10, n. 14-15, p. 1558-66, Nov-Dec 2008.

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

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

MARTIN, D. L. et al. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 8, p. e77, Aug 2006.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1133-44, Nov 2004.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009.

MORANDI, B. et al. Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39170, 2012.

NELSON, S.; KOLLS, J. K. Alcohol, host defence and society. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 205-9, Mar 2002.

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, Aug 2009.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1239-46, Nov 2009.

PASCUTTI, M. F. et al. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. **Scand J Immunol**, v. 58, n. 2, p. 173-9, Aug 2003.

PEREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LOPEZ-VELEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, n. 3, p. 263-74, Jun 2012.

PERONA-WRIGHT, G. et al. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 6, p. 503-12, Dec 17 2009.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2633-41, Jun 2008.

RACHID, M. A. et al. Blockade of endothelin ET(A)/ET(B) receptors favors a role for endothelin during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2113-9, Jul 2006.

ROFFE, E. et al. A DNA vaccine encoding CCL4/MIP-1beta enhances myocarditis in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2745-55, Oct 2006.

ROMEO, J. et al. Changes in the immune system after moderate beer consumption. **Ann Nutr Metab**, v. 51, n. 4, p. 359-66, 2007.

ROTTENBERG, M. E. et al. 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, Dec 1993.

SAALMULLER, A. New understanding of immunological mechanisms. **Vet Microbiol**, v. 117, n. 1, p. 32-8, Oct 05 2006.

SATHLER-AVELAR R et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104(suppl I), p. 246-251, 2009.

SEELIG, L. L., JR.; STEVEN, W. M.; STEWART, G. L. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to *Trichinella spiralis* in female rats. **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 4, p. 520-8, Jul-Aug 1999.

SILVA, J. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. . **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1 1992.

SMITH, F. E.; PALMER, D. L. Alcoholism, infection and altered host defenses: a review of clinical and experimental observations. **J Chronic Dis**, v. 29, n. 1, p. 35-49, Jan 1976.

SOROKIN, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 10, p. 712-23, Oct 2010.

SOUZA, P. E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep 2004.

SOUZA, P. E. A. et al. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac chaga's disease,. **Infect. Immun.**, v. 4, n. 1886-1894, 2007.

SPALLANZANI, R. G. et al. Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN-gamma Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors. **J Immunol**, v. 195, n. 5, p. 2141-8, Sep 01 2015.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 6, p. 830-41, Nov-Dec 1999.

TALVANI, A. et al. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with Trypanosoma cruzi GPI-mucins. **Parasitol Res**, v. 104, n. 5, p. 1141-8, Apr 2009.

TALVANI, A. et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 189, n. 2, p. 214-20, Jan 15 2004.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Chapter 8 - Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. In: WEISS, L. M. e TANOWITZ, H. B. (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v.76, 2011. p.171-194. ISBN 0065-308X.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 6, p. 524-39, May-Jun 2009.

TARLETON, R. L. The role of T cells in Trypanosoma cruzi infection. . **Parasitology Today**, v. 1, p. 7-9, 1995.

TARLETON, R. L. CD8(+) T Cells in Trypanosoma cruzi Infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015a.

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015b.

TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar 26 1992.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002.

VARDHANI, V. V.; DEVI, L. P. Effects of alcohol on natural resistance to *Ancylostoma caninum* in mice. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**, v. 35, n. 4, p. 367-73, 1991.

VOLTA, B. J. et al. Serum Cytokines as Biomarkers of Early *Trypanosoma cruzi* infection by Congenital Exposure. **J Immunol**, v. 196, n. 11, p. 4596-602, Jun 01 2016.

WHO. World Health Organization (WHO). Chagas Disease. Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso: 23 de abril de 2018.

XU, G. et al. CD8⁺ T cells provide immune protection against murine disseminated endotheliotropic *Orientia tsutsugamushi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. e0005763, Jul 2017.

YAMAUCHI, L. M. et al. The binding of CCL2 to the surface of *Trypanosoma cruzi* induces chemo-attraction and morphogenesis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 1, p. 111-8, Jan 2007.

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

TÍTULOS DAS FIGURAS / LEGENDAS

Figura 1: Detecção de citocinas intracitoplasmáticas em APCs e linfócitos T pela Citometria de Fluxo.

Figura 2: Evolução da parasitemia em animais infectados por tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanossoma cruzi*.

Evolução da parasitemia em animais infectados com tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi* em função do tempo, a partir do dia da infecção (tempo zero). Camundongos da linhagem C57/BL6 pré-tratados com água e infectados com *T. cruzi* representam o grupo controle (Control *T. cruzi*), e animais pré-tratados com EtOH e infectados com *T. cruzi*, representam o grupo experimental (EtOH 15d *T. cruzi*) (B). Nas curvas identifica-se: PPP: Período Pré-Patente, PP: Período Patente, PMP: Pico Máximo de Parasitemia. (*): Diferenças estatisticamente significativas entre os animais de grupos distintos ($p < 0,05$).

Figura 3: Análise produção de citocinas por linfócitos T CD4+ do baço, após pré-tratamento oral com EtOH e infecção com *Trypanossoma cruzi* em camundongos C57Bl/6.

Animais receberam durante 15 dias consecutivos, diariamente, uma administração intragástrica com 0,2 mL de EtOH 10% (v/v). Vinte e quatro horas após a última administração, os animais receberam, via intraperitoneal, 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. 15 dias após a infecção, os animais foram necropsiados e realizada a análise da produção de IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- γ , (C) por células Natural Killer esplênicas após estimulação *in vitro*. O gráfico representa o índice

de estimulação, obtido dividindo-se os valores da cultura estimulada com os valores da cultura controle em cada grupo. Os dados foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão (EP) do percentual de células duplo-positivas obtidas no gate de linfócitos, em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste ANOVA . *p<0.05.

Figura 4: Análise produção de citocinas por linfócitos T CD8+ do baço, após pré-tratamento oral com EtOH e infecção com *Trypanossoma cruzi* em camundongos C57Bl/6. Animais receberam durante 15 dias consecutivos, diariamente, uma administração intragástrica com 0,2 mL de EtOH 10% (v/v). Vinte e quatro horas após a última administração, os animais receberam, via intraperitoneal, 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. 15 dias após a infecção, os animais foram necropsiados e realizada a análise da produção de IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- γ , (C) por células Natural Killer esplênicos após estimulação *in vitro*. O gráfico representa o índice de estimulação, obtido dividindo-se os valores da cultura estimulada com os valores da cultura controle em cada grupo. Os dados foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão (EP) do percentual de células duplo-positivas obtidas no gate de linfócitos, em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste ANOVA . *p<0.05.

Figura 5: Análise produção de citocinas por células Natural Killer do baço, após pré-tratamento oral com EtOH e infecção com *Trypanossoma cruzi* em camundongos C57Bl/6.

Animais receberam durante 15 dias consecutivos, diariamente, uma administração intragástrica com 0,2 mL de EtOH 10% (v/v). Vinte e quatro horas após a última

administração, os animais receberam, via intraperitoneal, 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. 15 dias após a infecção, os animais foram necropsiados e realizada a análise da produção de IL-4 (A), IL-10 (B) e IFN- γ , (C) por células Natural Killer esplênicas após estimulação *in vitro*. O gráfico representa o índice de estimulação, obtido dividindo-se os valores da cultura estimulada com os valores da cultura controle em cada grupo. Os dados foram tabulados e os resultados expressos graficamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão (EP) do percentual de células duplo-positivas obtidas no gate de linfócitos, em cada grupo (n=5). Foi realizada a análise estatística através do teste ANOVA. * $p < 0.05$.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1

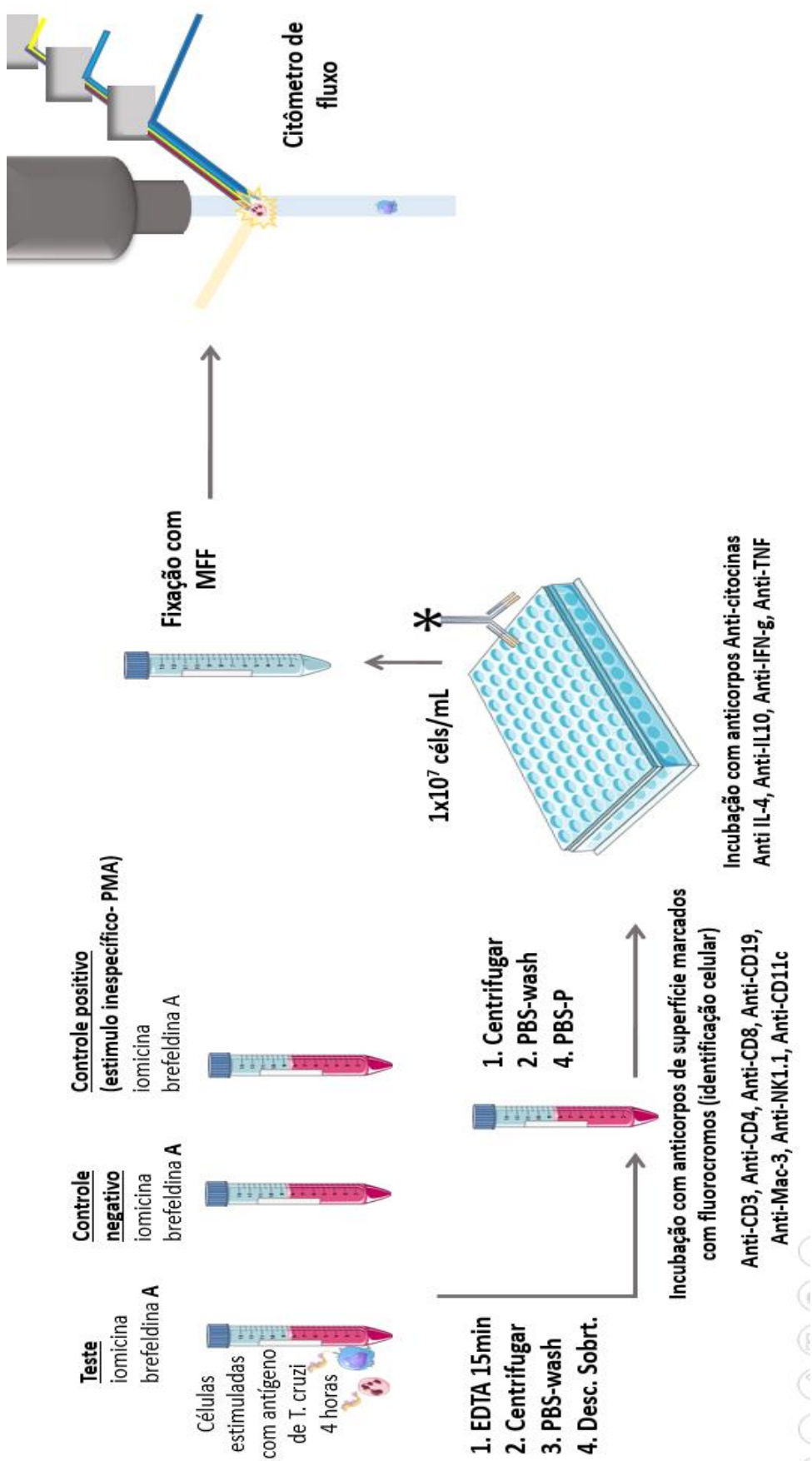


Figura 2

Determinação da Parasitemia

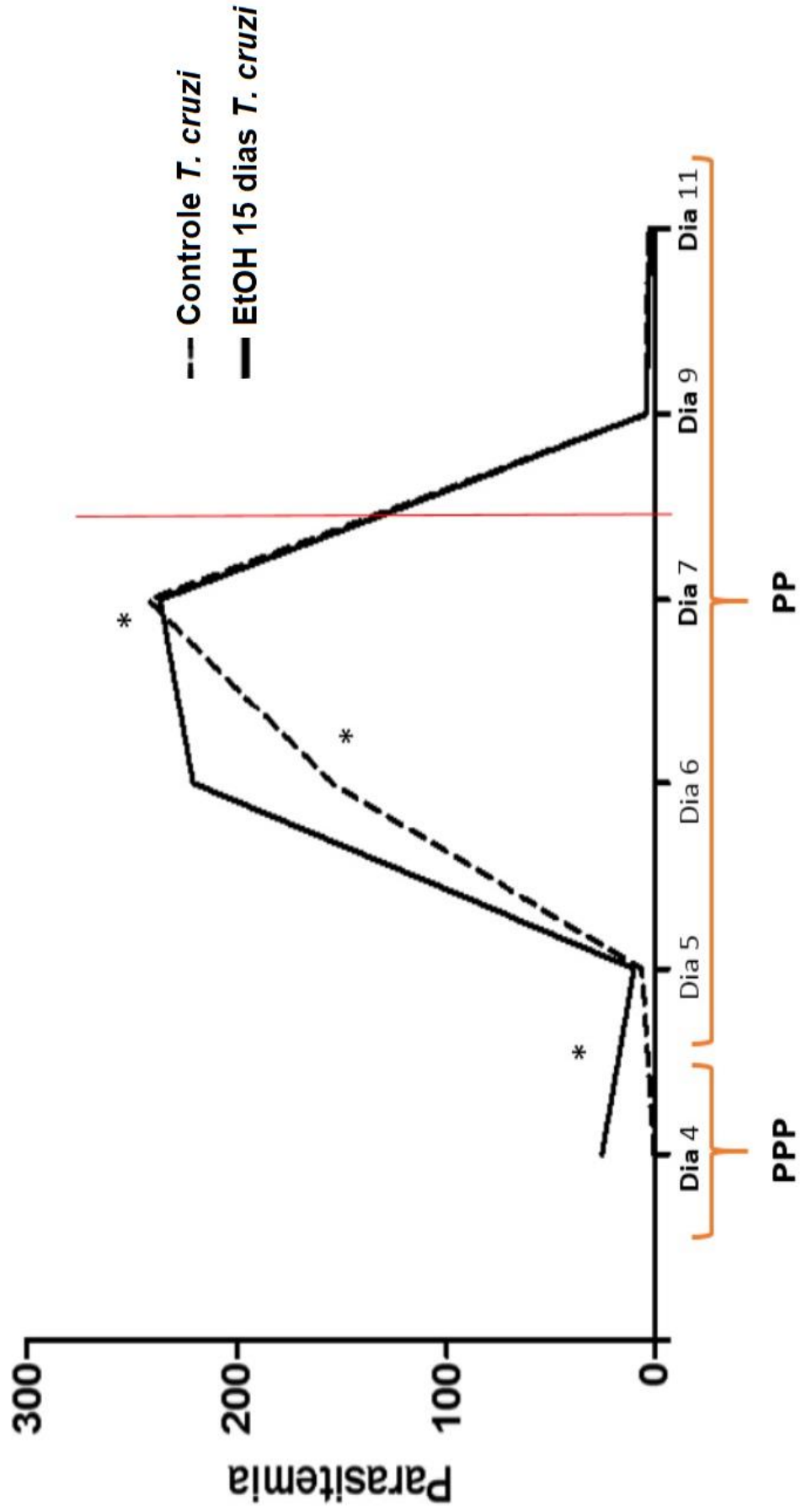


Figura 3

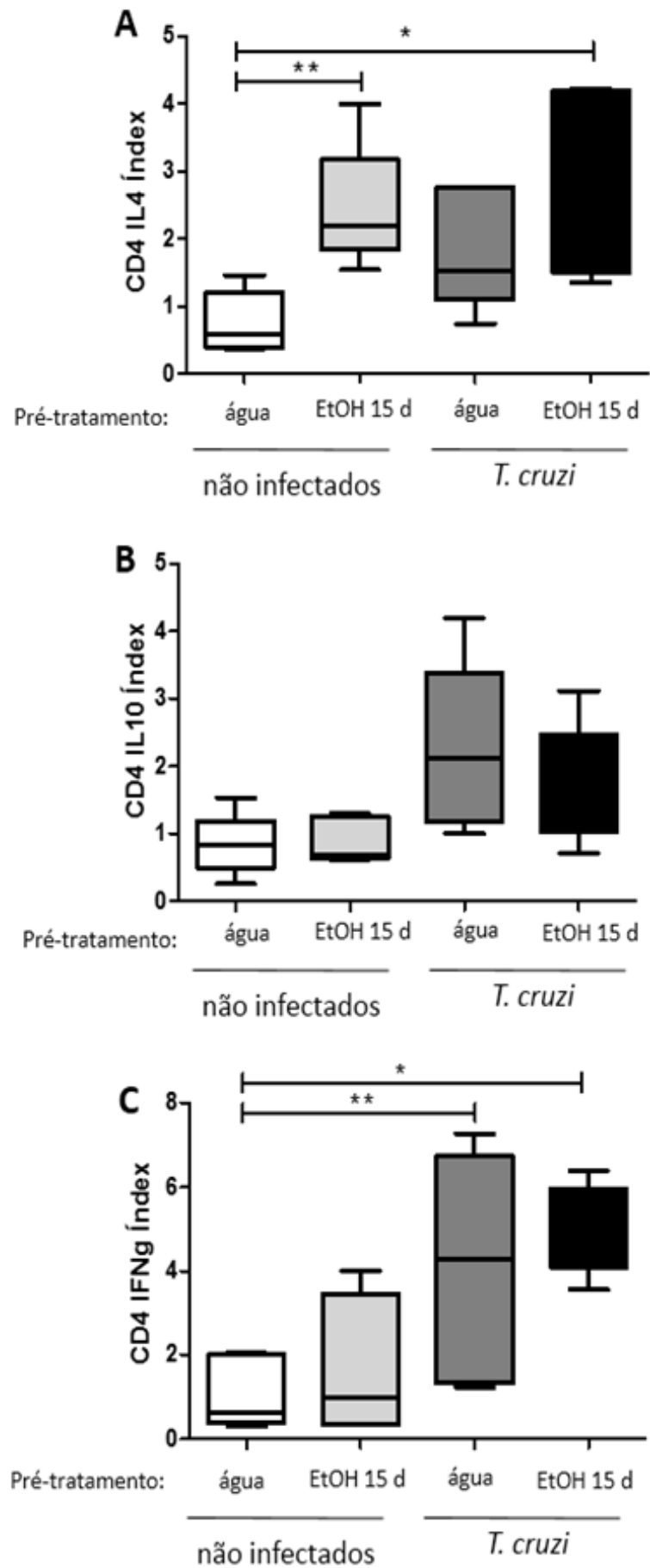


Figura 4

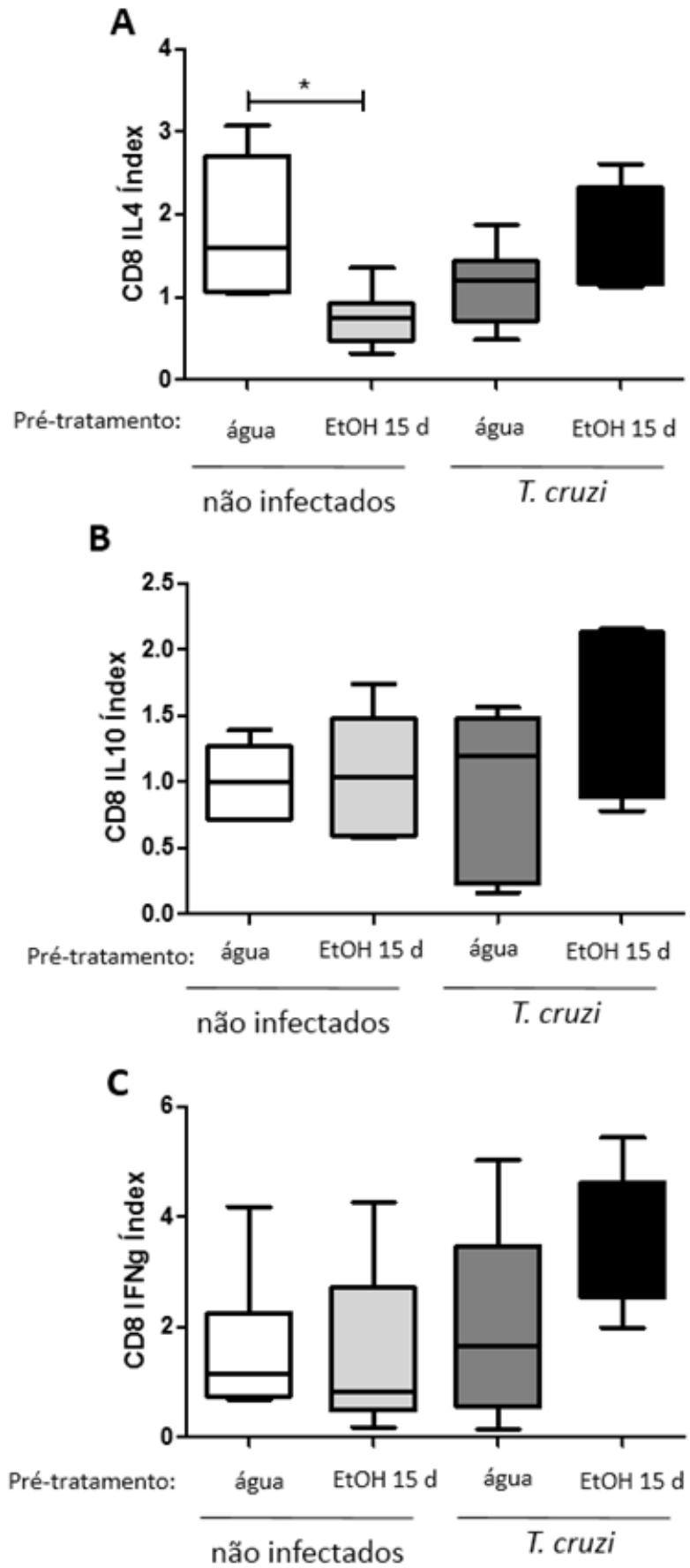
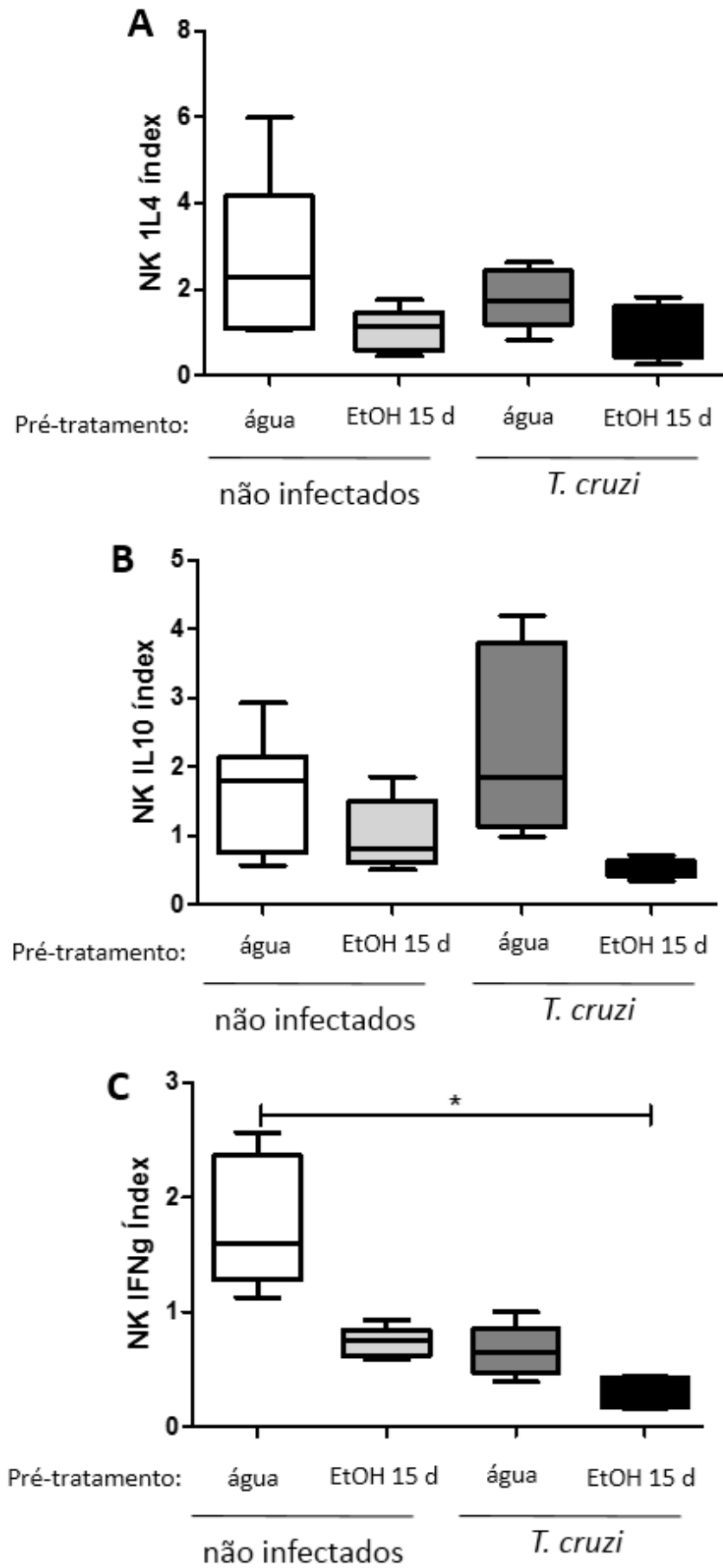


Figura 5



5 Conclusão

Há aumento do número de parasitos circulantes nos grupos a partir do quinto dia pós-infecção. No grupo que ingeriu etanol, o nível de parasitemia se manteve maior que o seu controle, até se equipararem no sétimo dia. Isso reflete maior suscetibilidade à infecção. Os linfócitos T CD4+ contribuem para elevação de citocinas IL-4. O principal mecanismo de proteção por células T CD8+, na fase aguda, está relacionado com a produção de IFN- γ . A ingestão de etanol não eleva o aumento da produção de IL-10 por células NK.

6 Referência Bibliográfica

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 155, n. 8, p. 3955-63, Oct 15 1995.

ACHUR, R. N.; FREEMAN, W. M.; VRANA, K. E. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar 2010.

ALVARADO ARNEZ, L. E. et al. Sequence variation in the IL4 gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 1, p. 279-82, 282 e1-3, Jan 2011.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005.

ANDRADE, M. C. et al. Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 3, p. 226-37, Sep 2009.

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, Mar-Apr 2004.

BACAL, F. et al. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. **Clin Transplant**, v. 24, n. 2, p. E29-34, Mar-Apr 2010.

BASTOS, K. R. et al. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. **J Interferon Cytokine Res**, v. 27, n. 5, p. 399-410, May 2007.

BATALLA, E. I. et al. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. **J Innate Immun**, v. 5, n. 5, p. 494-504, 2013.

BESTETTI, R. B. Chagas Heart Failure in Patients from Latin America. **Card Fail Rev**, v. 2, n. 2, p. 90-94, Nov 2016.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 67-74, Mar-Apr 2008.

BOYADJIEVA, N. I. et al. Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, n. 11, p. 1719-27, Nov 2002.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e733, Jul 06 2010.

CARDILLO, F. et al. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 8, p. BR259-67, Aug 2004.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-95, Dec 2007.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015.

CHAGAS, C. Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and evolutionary cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. etiologic agent of a new human morbid entity **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 1, n. 159-218, 1909.

CHESSLER, A. D. et al. *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 2288-96, Feb 15 2009.

CHESSLER, A. D. C. et al. Type I Interferons Increase Host Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infect Immun**, v. 79, n. 5, p. 2112-9, May 2011.

COELHO, P. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 71, n. 5, p. 837-44, May 2002.

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J Infect Dis**, v. 199, n. 3, p. 451-4, Feb 01 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, Jul-Aug 2010.

CREWS, F. T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 30, n. 4, p. 720-30, Apr 2006.

DA SILVEIRA, A. B. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**, v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007.

DE BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clin Immunol**, v. 111, n. 1, p. 137-45, Apr 2004.

DE ROUX, A. et al. Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. **Chest**, v. 129, n. 5, p. 1219-25, May 2006.

DENG, J. et al. Critical role of CD81 in cognate T-B cell interactions leading to Th2 responses. **Int Immunol**, v. 14, n. 5, p. 513-23, May 2002.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. P47phox^{-/-} mice are compromised in expansion and activation of CD8⁺ T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 12, p. e1004516, Dec 2014.

DIAS, J. C. P. **Epidemiologia**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 48

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde** v. 25, n. spe, 2016.

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, Feb 2011.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 208-18, Jul 2009.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 581-7, Dec 2005.

FERLAZZO, G. et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. **J Exp Med**, v. 195, n. 3, p. 343-51, Feb 04 2002.

FERNANDEZ, E. R. et al. Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104951, 2014.

FUJIMOTO, M.; SATO, S. B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. **J Dermatol Sci**, v. 46, n. 1, p. 1-9, Apr 2007.

GARCIA, C. C. et al. The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. **Discov Med**, v. 10, n. 55, p. 479-88, Dec 2010.

GARSIDE, P.; BREWER, J. In vivo imaging of infection immunology--4I's! **Semin Immunopathol**, v. 32, n. 3, p. 289-96, Sep 2010.

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003.

GOMES, N. D. G.; PEREIRA, F. E. [Effects of chronic ethanol intoxication on the evolution of experimental trypanosomiasis cruzi in mice]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 4, p. 191-7, Oct-Dec 1989.

HARRIS, D. P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, p. 475-82, Dec 2000.

HATCHER, F. M. et al. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **J Immunol**, v. 127, n. 3, p. 1126-30, Sep 1981.

HIGUCHI MDE, L. et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v. 2, n. 2, p. 101-6, Apr-Jun 1993.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Res**, v. 87, n. 4, p. 269-74, Apr 2001.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A. Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med** v. 357, n. 1018-1027, 2007.

IRIKOV, O. A.; KOVALENKO, F. P. [Experimental model of activated *Lambliia* (*Giardia*) *muris* infection in albino mice]. **Med Parazitol (Mosk)**, n. 3, p. 7-11, Jul-Sep 2007.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 11, p. 749-61, Nov 2012.

KIERSZENBAUM, F. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. **Immunology**, v. 44, n. 3, p. 641-8, Nov 1981.

KNAPP, D. J. et al. Stress and Withdrawal from Chronic Ethanol Induce Selective Changes in Neuroimmune mRNAs in Differing Brain Sites. **Brain Sci**, v. 6, n. 3, Jul 27 2016.

KROLEWIECKI, A. J. et al. Effect of chronic ethanol consumption on protective T-helper 1 and T-helper 2 immune responses against the parasites *Leishmania major* and *Strongyloides stercoralis* in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 4, p. 571-8, Apr 2001.

LIDLAW, B. J. et al. Production of IL-10 by CD4(+) regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8(+) T cells. **Nat Immunol**, v. 16, n. 8, p. 871-9, Aug 2015.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**, v. 8, p. 607, 2017.

LINDELL, D. M. et al. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3129, Sep 03 2008.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol Today**, v. 12, n. 3, p. A58-61, Mar 1991.

LOPES, M. F. et al. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v. 154, n. 2, p. 744-52, Jan 15 1995.

LUNA-GOMES, T. et al. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90582, 2014.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MACHADO, F. S. et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 191, n. 4, p. 627-36, Feb 15 2005.

MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect**, v. 10, n. 14-15, p. 1558-66, Nov-Dec 2008.

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

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

MARTIN, D. L. et al. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 8, p. e77, Aug 2006.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1133-44, Nov 2004.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009.

MORANDI, B. et al. Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39170, 2012.

NELSON, S.; KOLLS, J. K. Alcohol, host defence and society. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 205-9, Mar 2002.

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, Aug 2009.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Leukoc Biol**, v. 86, n. 5, p. 1239-46, Nov 2009.

PASCUTTI, M. F. et al. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. **Scand J Immunol**, v. 58, n. 2, p. 173-9, Aug 2003.

PEREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LOPEZ-VELEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, n. 3, p. 263-74, Jun 2012.

PERONA-WRIGHT, G. et al. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 6, p. 503-12, Dec 17 2009.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2633-41, Jun 2008.

RACHID, M. A. et al. Blockade of endothelin ET(A)/ET(B) receptors favors a role for endothelin during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 8, n. 8, p. 2113-9, Jul 2006.

ROFFE, E. et al. A DNA vaccine encoding CCL4/MIP-1beta enhances myocarditis in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 8, n. 12-13, p. 2745-55, Oct 2006.

ROMEO, J. et al. Changes in the immune system after moderate beer consumption. **Ann Nutr Metab**, v. 51, n. 4, p. 359-66, 2007.

ROTTENBERG, M. E. et al. 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, Dec 1993.

SAALMULLER, A. New understanding of immunological mechanisms. **Vet Microbiol**, v. 117, n. 1, p. 32-8, Oct 05 2006.

SATHLER-AVELAR R et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104(suppl I), p. 246-251, 2009.

SEELIG, L. L., JR.; STEVEN, W. M.; STEWART, G. L. Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to *Trichinella spiralis* in female rats. **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 4, p. 520-8, Jul-Aug 1999.

SILVA, J. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. . **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1 1992.

SMITH, F. E.; PALMER, D. L. Alcoholism, infection and altered host defenses: a review of clinical and experimental observations. **J Chronic Dis**, v. 29, n. 1, p. 35-49, Jan 1976.

SOROKIN, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 10, p. 712-23, Oct 2010.

SOUZA, P. E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep 2004.

SOUZA, P. E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac chaga's disease,. **Infect. Immun.**, v. 4, n. 1886-1894, 2007.

SPALLANZANI, R. G. et al. Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN-gamma Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors. **J Immunol**, v. 195, n. 5, p. 2141-8, Sep 01 2015.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol**, v. 34, n. 6, p. 830-41, Nov-Dec 1999.

TALVANI, A. et al. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. **Parasitol Res**, v. 104, n. 5, p. 1141-8, Apr 2009.

TALVANI, A. et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 189, n. 2, p. 214-20, Jan 15 2004.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Chapter 8 - Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. In: WEISS, L. M. e TANOWITZ, H. B. (Ed.). **Advances in Parasitology**: Academic Press, v.76, 2011. p.171-194. ISBN 0065-308X.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 6, p. 524-39, May-Jun 2009.

TARLETON, R. L. The role of T cells in Trypanosoma cruzi infection. . **Parasitology Today**, v. 1, p. 7-9, 1995.

TARLETON, R. L. CD8(+) T Cells in Trypanosoma cruzi Infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015a.

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015b.

TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar 26 1992.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002.

VARDHANI, V. V.; DEVI, L. P. Effects of alcohol on natural resistance to Ancylostoma caninum in mice. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**, v. 35, n. 4, p. 367-73, 1991.

VOLTA, B. J. et al. Serum Cytokines as Biomarkers of Early Trypanosoma cruzi infection by Congenital Exposure. **J Immunol**, v. 196, n. 11, p. 4596-602, Jun 01 2016.

WHO. World Health Organization (WHO). Chagas Disease. Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso: 23 de abril de 2018.

XU, G. et al. CD8+ T cells provide immune protection against murine disseminated endotheliotropic Orientia tsutsugamushi infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. e0005763, Jul 2017.

YAMAUCHI, L. M. et al. The binding of CCL2 to the surface of Trypanosoma cruzi induces chemo-attraction and morphogenesis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 1, p. 111-8, Jan 2007.

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