



IV CONGRESSO BRASILEIRO DE
PARASITOLOGIA HUMANA
ON-LINE — CONBRAPAH 2024

ANÁLISE FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES CELULARES NOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS NO MIOCÁRDIO E MÚSCULO ESQUELÉTICO PROVENIENTES DE CEPAS *TRYPANOSOMA CRUZI* RESISTENTE E SUSCETÍVEL AO BENZONIDAZOL

ISA RITA BRITO DE MORAIS; ASTRIA DIAS FERRÃO GONZALES; LETÍCIA FONSECA CAVALCANTI CORREIA; JACKSON EMANUEL DE OLIVEIRA SANTOS; MARCOS LÁZARO DA SILVA GUERREIRO

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar a influência do Benzonidazol sobre as populações celulares presentes nos infiltrados inflamatórios do coração e músculo esquelético em camundongos infectados com as cepas Colombiana resistente e Y suscetível. Para o estudo, foi inoculado via intraperitoneal 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas de sangue citratado em 120 camundongos suíços, não isogênicos, pesando 12 a 15 g, mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram subdivididos em grupos experimentais tratados e não tratados, e mantidos dentro das exigências do Comitê de Ética de Uso de Animais. O tratamento com Benzonidazol foi administrado por entubação esofágica, na dose de 100mg/Kg/dia, durante 90 dias. A análise fenotípica das populações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, foram realizadas através da citometria de fluxo, no coração e músculo esquelético em todos os grupos tratados e não tratados infectados pelas cepas Y e Colombiana. O estudo histopatológico do miocárdio e do músculo cardíaco foi realizado em seções de 5µm, corados em Hematoxilina e Eosina (H&E), em todos os grupos experimentais. Os resultados indicaram pela avaliação fenotípica, diferenças nos infiltrados inflamatório nas duas cepas, Y e Colombiana, relacionadas as populações celulares de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. A cepa Y apresentou um aumento de células TCD4⁺ ativadas no músculo do grupo tratado e não tratado, ao passo que a cepa Colombiana apresentou um aumento de células T CD4⁺ e TCD8⁺ ativadas tanto no músculo esquelético como no coração dos animais tratados. As lesões histopatológicas observadas na infecção pela cepa Colombiana, são mais severas, que as da cepa Y, o que pode estar relacionado a influência do tratamento com Benzonidazol, sobre a resposta imunológica e seu efeito sinérgico nas células TCD8⁺ e TCD4⁺. Concluímos que o tratamento com Benzonidazol tem uma ação sinérgica com a resposta imunológica em camundongos infectados e tratados, potencializando uma maior frequência das células efectoras nos infiltrados inflamatórios.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Miocardite; Miosite; Resposta imunológica; Benzonidazol.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas apresenta-se com uma doença polimórfica complexa e multifatorial. Muitos aspectos associados à patogenia da doença estão associados a mecanismos imunoregulatórios com uma participação especial de células dendríticas, linfócitos CD4⁺ e

CD8⁺ (ANDRADE *et al.*, 2000; ANDRADE, 1999; GUERREIRO *et al.*, 2015; PORTELLA e ANDRADE, 2009; MARTIN *et al.*, 2010).

Diversos estudos clínicos e experimentais chamam a atenção para o papel sinérgico entre o tratamento com Benzonidazol (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamida) e o sistema imunológico (OLIVIEIRI *et al.*, 2006; OLIVIERI *et al.*, 2002; VIOTTI *et al.*, 2011). OLIVIERI *et al.* (2006), estudando o papel do tratamento com o Benzonidazol sobre a resposta imune de camundongos infectados com uma cepa susceptível e, a diminuição nas taxas de apoptose em linfócitos duplo positivo CD4⁺/CD8⁺ no timo, verificaram menores índices de apoptose dessas células, nos camundongos infectados e tratados em relação aos camundongos infectados não tratados, correlacionando embora que parcialmente, a preservação da homeostasia do timo ao tratamento com Benzonidazol.

Entre os fatores que podem estar envolvidos no maior ou menor grau de resistência ao tratamento, está a resposta imunológica determinada no animal experimental por diferentes cepas, tendo sido evidenciado uma melhor capacidade modulatória nas cepas mais resistentes (MICHAILEWSKY *et al.*, 2001). ROMANHA *et al.* (2002), investigando a resposta quimioterápica em camundongos infectados com a cepa Y (suscetível ao Benzonidazol) em camundongos não geneticamente modificados (selvagens) e em camundongos knockout (KO) para o IFN- α e, o papel deste durante a infecção demonstraram correlações importante entre os níveis IFN- α durante o tratamento com Benzonidazol refletido nos índices de cura entre os animais selvagens. SANOJA *et al.* (2013), estudando a participação de linfócitos TCD4⁺, e seu papel nos infiltrados inflamatórios no coração de camundongos de duas linhagens diferentes, demonstraram uma correlação entre aumento de TNF- α no soro e o aumento dos infiltrados inflamatórios nesses camundongos infectados em relação aos não infectados. Esses estudos demonstram serem essas citocinas (IFN- γ e TNF- α) importantes no recrutamento de populações inflamatórias e na geração de lesões. GUERREIRO *et al.*, (2015), estudando a resposta imunológica em camundongos infectados pela cepa Colombiana resistente e de seus clones, sobre as lesões no miocárdio e no músculo esquelético, demonstraram extensos infiltrados inflamatórios difusos e focais compostos predominantemente de mononucleares.

DOS SANTOS *et al.* (2008) estudando a resistência de populações de *T. cruzi* ao Benzonidazol, demonstraram que essas populações quando mantidas permanentemente através de passagens sucessivas *in vivo* ou *in vitro*, podem desencadear mecanismos de estabilidade/instabilidade fenotípicas tais como resistência a droga, bem como, aumento e diminuição da virulência e das lesões histopatológicas.

Estes estudos sugerem um importante papel da resposta imunológica em relação à suscetibilidade ou resistência dos hospedeiros frente aos quimioterápicos. Deste modo é importante se investigar se a resistência/susceptibilidade das cepas estaria relacionada com ação do Benzonidazol sobre a resposta imunológica desenvolvida pelo camundongo assim como, as populações celulares nas lesões histopatológicas induzidas pelas cepas de *T. cruzi* de diferentes susceptibilidades.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as cepas Y e Colombiana com diferentes índices de susceptibilidade ao Benzonidazol. Essas cepas foram mantidas através de passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura acelular e criopreservação. Para o estudo, foi inoculado via intraperitoneal 5×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas de sangue citratado em 120 camundongos suíços webster, não isogênicos, pesando 12 a 15 g, mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram subdivididos em grupos experimentais tratados e não tratados, e mantidos dentro das exigências básicas do Comitê de Ética de Uso de Animais. O tratamento com Benzonidazol ([2-nitro-N-(fenilmetil)-

1 H-imidazol-1-acetamida]: Rochagan[®], [Roche]) foi administrado por entubação esofágica, na dose de 100mg/Kg/dia, durante 90 dias.

O estudo histopatológico do miocárdio e do músculo esquelético, foi realizado após eutanásia com Ketamina e Xilazina (80mg/Kg de peso), através de secções de 5µm, corados em Hematoxilina e Eosina (H&E), em todos os grupos experimentais infectados pelas cepas Y e Colombiana, tanto nos animais tratados como nos não tratados.

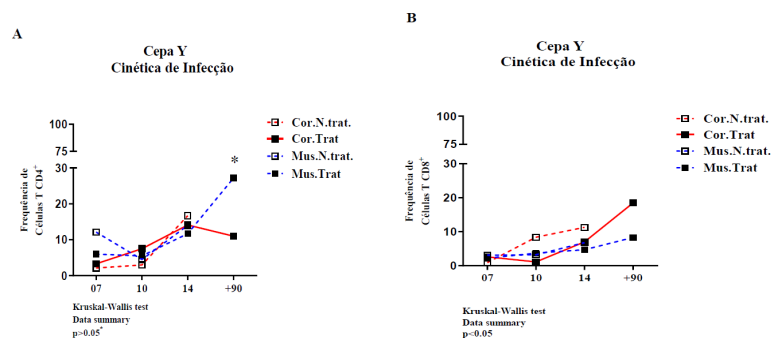
A análise fenotípica das populações de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, foram realizados através da citometria de fluxo. O coração e músculo esquelético, dos animais eutanasiados, foram macerados isoladamente em PBS gelado e depois centrifugados a 6°C, a 350 G, por 15 minutos. Após isso, as células do coração e do músculo foram pré-tratadas com collagenase tipo V (Sigma) na concentração de 2 mg/ml de meio RPMI incompleto a 37°C, durante uma hora. Em seguida, os tecidos foram macerado novamente e centrifugado a 6°C, 350 G, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado, completando com 6 mL de Percoll 80% e depois 6 mL de Percoll 40%, com cuidado para não misturar as duas soluções. O tubo contendo a mistura de Percoll e tecido foi centrifugado a 20°C, 420 G, por 30 minutos, com o objetivo de isolar as células mononucleares do infiltrado inflamatório. As células isoladas foram contadas em Câmara de Neubauer (10 µL das células em líquido de Turk, para coloração dos mononucleares e lise das hemácias) e dois milhões de células foram separadas e colocadas em cada poço. Posteriormente, as placas foram incubadas e os poços completados com 25 µL da mistura de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, e incubados por 20 minutos. Após a marcação, as células sofreram as aquisições programadas para 200.000 células. Para análise dos dados obtidos com a leitura no FACS Fortessa, foi utilizado o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR-EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação quantitativa das populações de linfócitos T CD4⁺/ CD8⁺ em camundongos infectados com a Cepa Y, no Músculo Cardíaco e Esquelético tratados e não tratados com Benz.

A comparação entre os grupos tratados e não tratados com Benz, nos permite observar maior frequência de células T CD4⁺ nos infiltrados inflamatórios da musculatura esquelética nos animais tratados e infectados com a cepa Y, em comparação as células T CD8⁺, que teve a maior frequência observada no músculo cardíaco (**Figura 1: A-B**).

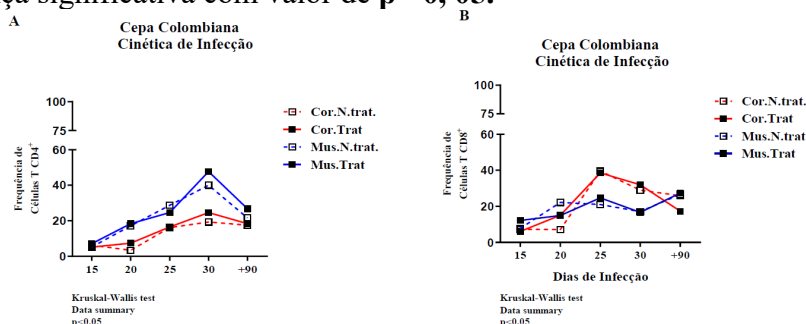
Figura 1, A-B: Análise fenotípica da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ dos infiltrados inflamatórios no Músculo Cardíaco e Esquelético de camundongos infectados com a Cepa Y. Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, aplicada entre os grupos revelou diferença significativa com valor de $p > 0,05$, nas populações de células T CD4⁺ nos animais não tratados e infectados; a análise das células T CD8⁺, não revelou significância estatística.



Análise quantitativa das populações de linfócitos T CD4⁺/ CD8⁺ em camundongos infectados com a Cerebra Colombiana, no Músculo Cardíaco e Esquelético tratados e não tratados com Benz.

A análise comparativa entre os grupos tratados e não tratados com Benz, nos permite observar maior frequência de células T CD4⁺ nos infiltrados inflamatórios da musculatura esquelética nos animais e infectados com a cepa Colombiana e tratados no 30^o de infecção. Em comparação as células T CD8⁺, foi observada declínio no músculo cardíaco a partir do 30^o de tratamento e elevação na musculatura esquelética (**Figura 2: A-B**).

Figura 2, A-B: Análise fenotípica da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ dos infiltrados inflamatórios no Músculo Cardíaco e Esquelético de camundongos infectados com a Cerebra Colombiana. Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, aplicada entre os grupos não revelou diferença significativa com valor de **p < 0, 05**.



A literatura não é concordante sobre a principal célula (CD4⁺ ou CD8⁺) responsável pela resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*. Assim, pode-se afirmar que mesmo havendo diferenças na predominância fenotípica de células T CD8⁺ ou células T CD4⁺, é necessária a presença dessas duas populações durante a infecção pelo *T. cruzi*, para que haja uma resposta imune efetora, pois, é sabido que as células T, independentemente da população desempenham importantes funções relacionadas resistência/susceptibilidade à infecção (ALBAREDA *et al.*, 2006; PADILLA *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 2012). Esses dados, ratificam nossos achados, quando demonstramos haver uma variação das populações de CD4⁺ e CD8⁺ associados aos tecidos e as cepas.

Avaliação histopatológica dos infiltrados inflamatórios no miocárdio e no musculo esquelético em camundongos infectados com a Cerebra Y e Colombiana tratados e não tratados com Benz.

Os animais infectados com a cepa Y e tratados com Benz, em todos os casos analisados apresentaram no miocárdio lesões inflamatórias discretas com infiltrados inflamatórios difusos compostos de mononucleares. Os animais não tratados, apresentaram lesões mais intensas e com infiltrados inflamatórios difusos e focais, e presença de ninhos com formas amastigotas. As análises na musculatura esquelética, tanto nos animais tratados como nos não tratados, revelaram presença miosite moderada a intensa (**Figura 3: A, B, C e D**). A avaliação histopatológica no miocárdio e no músculo esquelético nos animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não tratados, revelou intensa miocardite e miosite, compostas de inflamatórios intensos difusos e focais, extensas áreas de necrose hialina e lesões de arteriolite. Também foram evidenciados parasitas nos cortes analisados, tanto no miocárdio como no músculo esquelético (**Figura 4: A, B, C e D**).

Figura 3: Secções de miocárdio e músculo esquelético de camundongos coradas pela H & E. Observar miocardite difusa (A- tratados, B- não tratados) e presença ninho parasitário (círculo); miosite intensa difusa e focal (seta) (C- tratados; D – não tratados).

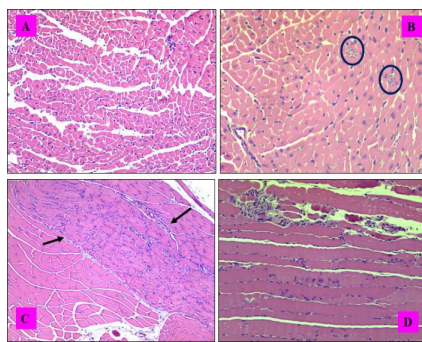
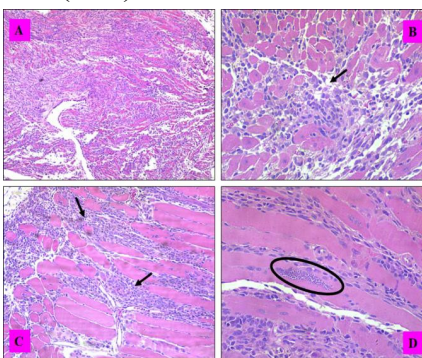


Figura 4 : Secções de miocárdio e músculo esquelético de camundongos coradas pela H & E. Observar intensa miocardite difusa e focal (seta) e presença de necrose (A, B); presença miosite intensa difusa e focal (seta), áreas extensas de necrose e ninho grande ninho



A miocardite e a miosite chagásica, observada na infecção pelo *T. cruzi*, e as lesões necrótico-inflamatórias focais e difusas de células cardíacas não-parasitadas e da musculatura esquelética, sugere a participação de mecanismos citotóxicos provenientes das citocinas liberadas pelas células do sistema imune são os geradores das lesões na fase aguda e tardia associados a imunopatogenia dessas lesões chagásicas. Estudos avaliando o perfil das lesões inflamatórias e das populações celulares no miocárdio e músculo esquelético, através da imunohistoquímica evidenciaram ampla destruição de fibras cardíacas com presença ou ausência de parasitismo, áreas necrótico-fibrosas, apoptose de miocélulas em associação com a presença de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, sendo essas células essenciais na imunoproteção e também na geração das lesões (ALVAREZ *et al.*, 2008; ANDRADE, 2000; GUERREIRO *et al.*, 2015; THÉ *et al.*, 2013). Esses estudos corroboram com nossos achados quando analisamos

as lesões no miocárdio e no músculo esquelético.

4 CONCLUSÃO

Os animais infectados com a cepa Y susceptível e Colombiana resistente, e tratados com Benzonidazol, apresentaram maior expansão das células T CD4⁺ e TCD8⁺ em relação aos animais infectados e não tratados. Concluimos que o tratamento com Benzonidazol tem uma ação sinérgica com a resposta imunológica em camundongos infectados e tratados, potencializando uma maior frequência das células efectoras nos infiltrados inflamatórios.

REFERÊNCIAS

ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.

ALVAREZ, M.G. et al. Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8 T cells in chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 2: 288-297, 2008.

ANDRADE, S.G. et al. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 624-626, 1992.

ANDRADE, S.G. et al. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, p. 64-70, 2000.

ANDRADE, S.G. et al. Reinfections with different strain of *Trypanosoma cruzi*, as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

ANDRADE, S.G. et al. Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 1, p. 21-26, 2008.

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

ANIS, R.J.; MARIN-NETO, J.A. Cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 10, n. 4, p. 6-22, 2000.

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

DE CASTRO, A.M. et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Res.**, v. 99, n. 4, p. 379-383, 2006.

DOS SANTOS, M.S. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. **Exp. Parasitol.**, v. 211, p. 8-14, 2009.

GUERREIRO, M.L.S. et al. Immunological response to re-infections with clones of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* with different degrees of virulence: influence on pathological features during chronic infection in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 110, n.4, p. 500-506, 2015.

MARTIN D. L. et al. Generation of *Trypanosoma cruzi* specific CD8⁺ T- cell immunity is unaffected by the absence of type I interferon signaling. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3154-3159, 2010.

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

MOREIRA, R.L. Et al. Benznidazole treatment has a beneficial effect on cells infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** v. 45, n. 6, p , 2023.

PADILLA, A.M.; BUSTAMANTE, J.M.; TARLETON, R. L. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 385-390, 2010.

PÉREZ, A. R. *et al.* Extrathymic CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v 1262, p. 27-36, 2012.

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

OLIVIERI, B. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Exp Parasitol.**, v., 114, n. 3, p. 228-234, 2006.

OLIVIERI, B.P. et al. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3790-3796, 2002.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis.**, v, 186, n. 6, p. 823-828, 2002.

SATHLER-AVELAR, R. VITELLI-AVELAR,DM. TEIXEIRA-CARVALHO, A. MARTINS-FILHO, A.O. 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.

SANOJA C. et al. Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4⁺ T Cell Subsets in the Heart during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One.**, v 8(6), p. 65820, 2013.

THÉ, S.T. et al. Effect of treatment with cyclophosphamide in low doses upon the onset of delayed type hypersensitivity in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: involvement of heart interstitial dendritic cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 108, n.6, p. 691-698, 2013.

VIOTTI, R. et al. Impact of A etiological Treatment on Conventional and Multiplex Serology in Chronic Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5, n. 9, p. 1314, 2011.