

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Morfologia**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E LINFÓCITOS T  
CD4<sup>+</sup> NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Bruna Fernandes Pinto

Belo Horizonte  
Novembro/2016

Bruna Fernandes Pinto

**ASSOCIAÇÃO ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E LINFÓCITOS T  
CD4<sup>+</sup> NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis  
Silva Gomes Estanislau

Co-orientador: Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira

Belo Horizonte  
Novembro/2016

## **COLABORADORES**

### **Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Morfologia**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Walderez Ornelas Dutra

Tereza Cristina Minto Fontes Cal

Débora Almeida Rocha

### **Centro de Pesquisas René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – MG**

Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira

Dr<sup>a</sup>. Andréia Teixeira de Carvalho

Dr<sup>a</sup>. Silvana Maria Eloi-Santos

Me. Nayara Ingrid de Medeiros

## **RECURSOS FÍSICOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LABIC, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – LICM, do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG.

## **RECURSOS FINANCEIROS**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Bolsa de mestrado)  
Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-04129-10, PPM-00501-13).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (403592/2008-9, 474796/2012-4, PQ 308219/2012-0, 404151/2012-4).

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - PAPES (407692/2012-6).

*Aos meus pais que sempre me incentivaram para a realização dos meus ideais, a minha vó Clóres, a minha eterna saudade e ao meu amor Franklin por todo companheirismo nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e pela presença constante em minha vida. A Ti Senhor, toda a minha gratidão por ser meu Pai nos momentos de alegria, por ser o caminho nos momentos de incertezas e por ser o refúgio nos momentos necessários. Agradeço a Ti pela coragem e pela fé que me impulsionou a lutar pelos meus ideais.

Aos meus pais Eliana e Heraldo por todo incentivo, pela educação dada para que eu pudesse tomar as mais sábias decisões, pelo amor incondicional que me impulsionou a nunca desanimar e pelo abraço carinhoso e sincero que sempre me confortou nos momentos de maiores angústias e desesperos.

As minhas irmãs Bárbara e Ana Carolina por todo carinho, incentivo e apoio durante essa etapa tão importante da minha vida. Com vocês passei momentos de dúvidas, mas também momentos de grandes alegrias e realizações. Muito obrigada! Vocês foram muito importantes para a minha formação.

A minha vó Horandina pelo apoio e a minha querida vó Clóres, que mesmo não estando mais presente entre nós, sempre estará em meu coração. Como gostaria que estivesse aqui nesse momento tão mágico e dentre as palavras não encontrarei aquelas que traduzem a sua ausência. Eternas saudades!

Ao meu grande amor Franklin, meu refúgio e meu companheiro, por estar sempre em todos os momentos dessa grande etapa em minha vida. Obrigada por me fazer rir nas horas tristes. Obrigada pelos momentos em que perdi a cabeça e você veio com palavras amenas e doces para me acalmar. Pelos abraços apertados e por estar sempre me apoiando em todos os desafios que proponho enfrentar. Obrigado por você existir em minha vida!

Ao meu querido irmãozinho Hudson que partiu e deixou imensas saudades. Nesse tempo juntos pude conviver com uma das pessoas mais justas, corretas e de um coração enorme. E após esses quase dois anos de partida, meu coração se enche de saudades. O tempo passa, mas você se faz presente em meus sonhos e pensamentos. Agradeço a Deus pelo privilégio de um dia ter feito parte da minha vida.

A minha orientadora Juliana por ter me dado à oportunidade de trabalhar no laboratório e que me ofereceu essa experiência maravilhosa e única para a minha formação. Foram momentos de dificuldades que passamos juntas. Em um primeiro momento encontramos o receio do desconhecido, mas depois com a convivência, o seu jeitinho alegre e espontâneo de ser e as reuniões esclarecedoras nos aproximou bastante. Muito obrigada por ser o regente nesse grande sonho. Que o doutorado traga inúmeras conquistas para nós!

Ao meu co-orientador Dr. Rodrigo por toda orientação e a Dra. Walderez pelas contribuições e por me permitir usufruir do seu laboratório para a realização desse trabalho de extrema importância em minha vida.

As doutoras Silvana Maria Eloi, Luciana Andrade, Patrícia Massara e Andréia Teixeira pelas ricas contribuições no decorrer deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

As minhas companheiras de trabalho e grandes amigas Tereza e Débora que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada. Obrigada pela compreensão e paciência comigo nos momentos de tristeza e cansaço. Obrigada Dê pelas sábias palavras e ensinamentos que levarei por toda vida. Obrigada Tê por sempre me defender e ser justa em tudo que faz. A vocês, minhas meninas, o meu eterno carinho e amizade.

A minha “filhote” Nay, agradeço por dividir seus conhecimentos sobre Chagas comigo. Desde o início conseguimos superar os obstáculos e crescer a cada dia que passamos juntas. Muito obrigada por estar presente nesse momento de grande realização para mim. Você foi essencial para a concretização desse trabalho. Espero dividir futuras conquistas com você.

A minha querida aluna de iniciação científica Clarinha pela oportunidade de passar meus conhecimentos sobre Chagas. Obrigada por todas as nossas tardes juntas trabalhando nas culturas e rezando para que elas vingassem. Obrigada pelos desabafos que tive com você e por me deixar participar um pouquinho da sua formação. Conte sempre comigo!

Ao Rafael pelas brincadeiras e bom senso de humor que me faziam rir. Obrigada!

Ao meu sogro Fred e minha sogra Tuni por sempre me incentivarem e pelos os sábios conselhos.

A todos doutores, mestres e professores da UFMG e do CPqRR pela dedicação e sábios ensinamentos que contribuíram para a formação do profissional que me tornei.

Ao Douglinhas e ao Ary pela imensa ajuda na seleção do mestrado. A vocês minha eterna gratidão!

A todos os meus amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares da UFMG e do Laboratório de Imunologia Celular do CPqRR por toda ajuda desde o primeiro momento, pelo tempo que passamos juntos e pelo compartilhamento de experiências.

Aos meus amigos Katiene, Lívia, Luciana, Mayara e familiares por todo apoio.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para essa mais nova conquista. À vocês um muito obrigada!

*“Toda ciência vem da dor. A dor busca sempre a causa das coisas, enquanto que o bem-estar inclina-se a estar quieto e a não voltar o olhar para trás.”*

*Stefan Zweig*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Aspectos éticos .....	31
4.2 Caracterização da população de estudo .....	31
4.2.1 Critérios de inclusão .....	32
4.2.2 Critérios de exclusão .....	32
4.3 Preparação dos antígenos derivados da forma tripomastigota (TRIPO) do <i>T. cruzi</i> .....	33
4.4 Análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo .....	34
4.5 Aquisição e estratégia de análise dos dados .....	35
4.5.1 Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações monócitos .....	35
4.5.2 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos e suas subpopulações <i>Th1, Th2, Treg e Th17</i> .....	37
4.6 Análise Estatística .....	39
5 RESULTADOS .....	41
5.1. Avaliação do perfil fenotípico e funcional das subpopulações de monócitos.....	43
5.1.1 Avaliação das subpopulações de monócitos .....	43

5.1.2 Avaliação da expressão das moléculas de reconhecimento TLR-2, TLR-4, TLR-9 e co-estimulação CD80 e CD86 nas subpopulações de monócitos .....	44
5.1.3 Avaliação da expressão das citocinas IL-12 e IL-10 nas subpopulações de monócitos.....	49
5.2. Avaliação do perfil fenotípico e funcional das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> ...	51
5.2.1 Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	51
5.2.2 Avaliação da expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10 nas subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	53
5.2.3 Avaliação das moléculas de ativação CD25, CD28 e CTLA-4 em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> totais .....	54
5.3. Associação das subpopulações de monócitos CD80 <sup>+</sup> e CD86 <sup>+</sup> no direcionamento das subpopulação de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg.....	55
5.4. Correlação das subpopulações de monócitos e linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg através da expressão de citocinas.....	58
6 DISCUSSÃO .....	63
7 CONCLUSÃO.....	73
8 ANEXOS .....	75
9 REFERÊNCIAS .....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Associação dos mediadores liberados pelos monócitos/macrófagos no direcionamento dos diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 ou Treg).....	28
<b>Figura 2.</b> Análise do perfil fenotípico dos monócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo.....	36
<b>Figura 3.</b> Análise do perfil fenotípico-funcional das subpopulações de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	37
<b>Figura 4.</b> Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo.....	38
<b>Figura 5.</b> Análise do perfil fenotípico das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> por citometria de fluxo.....	39
<b>Figura 6.</b> Análise da frequência das subpopulações de monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	44
<b>Figura 7.</b> Análise da expressão de TLR-2 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).....	45
<b>Figura 8.</b> Análise da expressão de TLR-4 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).....	46
<b>Figura 9.</b> Análise da expressão de TLR-9 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).....	47
<b>Figura 10.</b> Análise da expressão da molécula co-estimuladora CD80 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).....	48

<b>Figura 11.</b> Análise da expressão da molécula co-estimuladora CD86 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).....	49
<b>Figura 12.</b> 12. Análise da expressão de IL-12 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não clássicos (C).....	50
<b>Figura 13.</b> Análise da expressão de IL-10 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não clássicos (C).....	51
<b>Figura 14.</b> Análise da frequência das subpopulações de linfócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	52
<b>Figura 15.</b> Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> Th1, Th2, Th17 e Treg que expressam as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10, respectivamente, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	54
<b>Figura 16.</b> Frequência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> totais que expressam moléculas de ativação CD25, CD28 e CTLA-4 nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	55
<b>Figura 17.</b> Regressão linear das subpopulações de monócitos CD80 <sup>+</sup> e os linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg.....	56
<b>Figura 18.</b> Figura 19. Regressão linear das subpopulações de monócitos CD86 <sup>+</sup> e os linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg.....	57
<b>Figura 19.</b> Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th1 <sup>+</sup> e Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12 <sup>+</sup> , IL-10 <sup>+</sup> e IL-8 <sup>+</sup> .....	59
<b>Figura 20.</b> Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th2 e Th2 IL-4 <sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12 <sup>+</sup> , IL-10 <sup>+</sup> e IL-8 <sup>+</sup> .....	60

<b>Figura 21.</b> Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th17 e Th17 IL-17 <sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12 <sup>+</sup> , IL-10 <sup>+</sup> e IL-8 <sup>+</sup> .....	61
<b>Figura 22.</b> Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Treg e Treg IL-10 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12 <sup>+</sup> , IL-10 <sup>+</sup> e IL-8 <sup>+</sup> .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Aloficocianina
- BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)
- CARD – Forma clínica cardíaca
- CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica
- CD – *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciação)
- CDG – Forma clínica cardiodigestiva
- CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou
- DIG – Forma clínica digestiva
- ECG – Eletrocardiograma
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FL – Fluorescência
- FOXP3 – *Forkhead box P3*
- FSC – *Forward Scatter* (Tamanho celular)
- GATA-3 – *GATA-binding protein-3*
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- HAS – Hipertensão arterial sistêmica
- HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno de leucócito humano)
- IFN- $\gamma$  – Interferon gamma
- IgE – Imunoglobulina E
- IL – Interleucina
- IND – Forma clínica indeterminada
- iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* (Síntese de óxido nítrico induzida)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MFF – *Macs Facs Fix* (Solução fixadora)
- MHC-II – Complexo de histocompatibilidade de classe II
- IMF – Intensidade média de fluorescência
- NI – Não infectados
- NK – Células Natural Killer
- NO – Óxido nítrico

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados à patógenos)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salínico)

PBS-P – PBS-W a 0,5% de saponina

PBS-W – PBS a 0,5% de albumina sérica bovina

PE – Ficoeritrina

PE-Cy7 – Ficoeritrina cianina 7

PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein* (Proteína piridina de clorofila)

ROR- $\gamma$ t – *retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t*

RPMI – *Rosweel Park Memorial Institute*

SSC – *Side Scatter* (Granulosidade)

T-bet – *T-box expressed in T cells*

TCR – *T-cell receptor* (Receptor de células T)

TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta* (Fator transformante do crescimento beta)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor tipo Toll)

TNF- $\alpha$  – *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

Tripo – Antígenos solúveis da forma Tripomastigota

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

BV421 – *Brilliant violet 421*

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

## RESUMO

Embora a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, tenha sido descoberta em 1909, continua sendo um sério problema de saúde pública em muitos países. Estima-se que existem atualmente 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, principalmente em 21 países da América Latina, onde a doença é endêmica. O aumento da morbidade em regiões não endêmicas tem recebido grande atenção atualmente, principalmente devido à migração de indivíduos infectados, tornando a doença de Chagas, um sério problema epidemiológico, econômico e social em âmbito global. A doença de Chagas é caracterizada por duas fases distintas durante o seu percurso: a fase aguda de curta duração observa-se alto parasitismo e parasitemia, e a fase crônica, na qual cerca de 60% dos indivíduos acometidos podem não desenvolver sintomas clínicos específicos da doença, classificados como a forma clínica indeterminada (IND). Entretanto, 30% dos indivíduos desenvolvem alterações cardíacas resultante de danos progressivos do miocárdio levando a cardiopatia chagásica, classificados com a forma clínica cardíaca (CARD). O estudo da imunidade inata e adaptativa é de grande importância para o entendimento dessa doença. A interação entre monócitos e linfócitos, pode ser um ponto importante que ajude a esclarecer a complexidade que envolve as manifestações clínicas da doença de Chagas na fase crônica. Embora muitos trabalhos tenham contribuído para o esclarecimento da fisiopatologia da doença de Chagas, os mecanismos que expliquem a evolução para a forma cardíaca da doença e a distinção das manifestações clínicas ainda não foram totalmente estabelecidos. Considerando a importância da resposta imune inata e sua associação com a imunidade adaptativa no controle e/ou desenvolvimento da patogênese chagásica, o presente trabalho visou avaliar a associação entre as subpopulações de monócitos: clássicos ( $CD14^+CD16^-$ ), intermediários ( $CD14^+CD16^+$ ) e não-clássicos ( $CD14^-CD16^+$ ) e as diferentes subpopulações de linfócitos T  $CD4^+$  (Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Diante disso, os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão da molécula co-estimuladora CD80 em monócitos clássicos no grupo CARD e de CD86 em monócitos não-clássicos no grupo IND. Através da análise de regressão linear foi observado uma associação significativa entre os monócitos não-clássicos  $CD86^+$  e linfócitos Treg em indivíduos NI, IND e CARD. Observou-se um aumento significativo da frequência de linfócitos Treg  $IL-10^+IL-17^+$  no grupo IND quando comparado ao grupo CARD após estímulo com *T. cruzi*. Esses resultados sugerem que os monócitos  $CD86^+$  direcionam preferencialmente uma resposta Treg independente do grupo avaliado, apresentando em maior abundância em pacientes IND, favorecendo a formação de um ambiente mais regulado e limitando o desenvolvimento da doença nesses pacientes. Em contrapartida, pacientes CARD além de direcionarem uma resposta mediada por linfócitos do tipo Th1, apresentam ativação das células Treg através da interação alternativa com CD80 de monócitos, sugerindo essa interação ser ineficiente em regular a resposta imune, contribuindo para a formação de uma resposta inflamatória incontida como é observado nesses pacientes.

## ABSTRACT

Although Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, was discovered in 1909, it remains a serious public health problem in many countries. It is estimated that currently there are 8 million people infected in the world, mainly in 21 countries in Latin America where the disease is endemic. Increased morbidity in non-endemic regions has received great attention today, mainly due to the migration of infected individuals, becoming Chagas disease a serious epidemiological, economic and social problem at a global level. Chagas disease is characterized by two distinct phases during its course: the acute phase with short duration shows high parasitism and parasitemia, and the chronic phase, in which about 60% of the affected individuals may not develop specific clinical symptoms of the disease and are clinically classified as with the indeterminate clinical form (IND). However, 30% of these individuals develop cardiac alterations resulting from progressive myocardial damage that may lead to chagasic cardiomyopathy, classified as with the cardiac clinical form (CARD). The study of innate and adaptive immunity is of great importance for the understanding of this disease. The interaction between monocytes and lymphocytes may be an important point to help to clarify the complexity that surrounds the clinical manifestations of the chronic phase of Chagas disease. Although many studies have contributed to the understanding of the pathophysiology of Chagas disease, the mechanisms that explain the evolution to the cardiac form of the disease and the distinction of the clinical manifestations have not yet been fully established. The present work aimed to evaluate the association between the monocyte subsets: classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediates (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) and the different CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subsets (Th1, Th2, Th17, Treg), after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens, in peripheral blood cells of individuals in the different clinical forms of Chagas disease. Our results showed a significant increase in the expression of the co-stimulatory molecule CD80 in classic monocytes in the CARD group and CD86 in non-classical monocytes in the IND group. Using linear regression analysis a significant association between non-classical CD86<sup>+</sup> monocytes and Treg lymphocytes was observed in non-infected (NI), IND and CARD groups. A significant increase in the frequency of Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> lymphocytes in the IND group was observed when compared to the CARD group after stimulation with *T. cruzi* was observed. These results suggest that CD86<sup>+</sup> monocytes preferentially target a Treg response independent of the evaluated group, presenting in greater abundance in IND patients, favoring the formation of a more regulated environment and limiting the development of the disease in these patients. In contrast, CARD patients besides directing a response mediated by Th1 lymphocytes, present Treg cell activation through the alternative interaction with CD80 of the monocytes, suggesting that this interaction is inefficient in regulating the immune response, contributing to the maintenance of the persistent inflammatory process as observed in these patients.

## **1 INTRODUÇÃO**

---

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma entre as 17 doenças negligenciadas, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (WHO, 2016). O aumento da morbidade em regiões não endêmicas tem recebido grande atenção atualmente, principalmente devido à migração de indivíduos infectados e também pela ressurgência da transmissão em países endêmicos (Andrade *et al.*, 2014).

Durante a fase crônica da patologia, a maioria dos pacientes não desenvolvem sintomas clínicos específicos da doença, podendo continuar assintomáticos durante toda a vida (Gomes *et al.*, 2003). Entretanto, aproximadamente 30% dos indivíduos desenvolvem a cardiopatia chagásica crônica, uma cardiopatia dilatada inflamatória que é a manifestação clínica de maior relevância em consequência da infecção pelo *T. cruzi*, podendo ser fatal para os indivíduos acometidos (Prata, 1990; Ribeiro & Rocha, 1998; Ribeiro Frade *et al.*, 2013; Álvares *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014).

Mesmo após 107 anos da primeira descrição do *T. cruzi*, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença ainda são pouco compreendidos, podendo envolver os seguintes fatores: cepa, virulência, carga parasitária, via de infecção e a resposta imune do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2002; Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015; Morrot *et al.*, 2016). A resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* representa um importante fator na determinação do prognóstico da infecção através da mobilização de múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida.

O direcionamento da resposta imune, especialmente a associação entre a resposta imune inata/adaptativa, constitui um mecanismo importante para controle da parasitemia durante a fase aguda da doença. Contudo, na fase crônica, o desenvolvimento de alterações importantes pode estar relacionado com a intensidade da resposta imune e assim, o direcionamento da resposta adaptativa pode influenciar fortemente as lesões e a morbidade cardio-digestiva. Nesse contexto, a interação entre a resposta imune inata/adaptativa representada por monócitos e linfócitos, pode ser um ponto importante que ajude a esclarecer a complexidade que envolve as manifestações clínicas da doença de Chagas na fase crônica.

Embora muitos trabalhos tenham contribuído para o esclarecimento da fisiopatologia da doença de Chagas, os mecanismos que expliquem a evolução cardíaca da doença e a distinção das manifestações clínicas ainda não foram totalmente estabelecidos. Considerando a importância da resposta imune inata e sua associação com a imunidade adaptativa no controle e/ou desenvolvimento da patogênese chagásica, o presente trabalho traz um maior

entendimento sobre a imunopatologia da doença contribuindo para o entendimento do estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre as subpopulações de monócitos e as diferentes subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as subpopulações de monócitos em pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*, por citometria de fluxo, utilizando os seguintes marcadores: CD14 e CD16;
- Avaliar a expressão de moléculas de reconhecimento antigênico e ativação e a expressão das citocinas intracitoplasmáticas IL-12 e IL-10 nas subpopulações de monócitos em pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Caracterizar as subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg, em pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*, por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, e IL-10 nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente, em pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar a expressão de moléculas de ativação em linfócitos totais em pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Verificar uma possível associação das subpopulações de monócitos com as de linfócitos através de análises de regressão e correlação.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

---

A descoberta da doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, foi considerada uma das maiores e bem sucedidas conquistas em toda a história da medicina tropical (Coura & Borges-Pereira, 2010; Dias *et al.*, 2016). Carlos Chagas descobriu o agente etiológico, sendo um protozoário flagelado pertencente à espécie *Trypanosoma cruzi*, os hospedeiros intermediários e definitivos, a transmissão vetorial e os principais sinais clínicos desencadeados pela infecção (Chagas, 1909). Entretanto, mesmo 107 anos após sua descoberta, a doença de Chagas continua sendo um sério problema de saúde pública e econômico em muitos países da América Latina (WHO, 2016).

A doença de Chagas é considerada uma entre as 17 doenças negligenciadas e estima-se que atualmente existem 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, principalmente nos 21 países da América Latina, onde a doença é endêmica, com aproximadamente 12.000 óbitos por ano e mais de 65 milhões de indivíduos em risco de infecção (WHO, 2016).

Alguns países da América do Sul, como Brasil, Uruguai e Chile, em iniciativa conjunta, conseguiram combater a transmissão vetorial e sanguínea da doença, principalmente através do uso de inseticidas e triagem de bolsas de sangue (Rocha *et al.*, 2007; Silveira & Dias, 2011; Sangenis *et al.*, 2015). Entretanto, apesar desses esforços e devido ao crescimento da migração de indivíduos infectados de áreas endêmicas para regiões não endêmicas, como América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, a doença tornou-se um sério problema epidemiológico, econômico e social em âmbito global (Schmunis & Yadon, 2010; Coura & Borges-Pereira, 2010; Coura *et al.*, 2014, Dias, 2016; WHO 2016).

A principal forma de transmissão da doença é através de insetos pertencentes à família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (Deane *et al.*, 1984; Cardoso *et al.*, 2016). A transmissão da doença para o homem inicia-se quando insetos vetores hematófagos, durante ou após o repasto sanguíneo, transmitem a forma infectante do *T. cruzi* presentes em suas fezes e/ou urina. No interior do corpo do hospedeiro vertebrado, a forma tripomastigota metacíclica invade diferentes tipos celulares, como células do tecido muscular, epitelial, nervoso, fibroblastos e as células do sistema mononuclear fagocitário (Ferreira *et al.*, 2012), aonde se transformam nas formas amastigotas e iniciam-se intensa divisão binária simples. Posteriormente, essas formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas, ocorrendo o rompimento da célula e liberação dessas formas evolutivas na corrente sanguínea. Assim, o protozoário pode invadir novas células ou pode ser transferido para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Nos triatomíneos, os tripomastigotas sanguíneos se encaminham para o estômago onde se transformam em epimastigotas ou esferomastigotas. As

epimastigotas se dirigem para o intestino médio do vetor, onde se multiplicam por fissão binária simples e se deslocam para a porção final do intestino onde se modificam em tripomastigotas metacíclicos, forma infectante para o hospedeiro vertebrado, sendo assim liberadas junto às fezes e/ou urina do inseto vetor. As formas esferomastigotas podem-se modificar, ainda, em epimastigota longas, que não possuem capacidade de se multiplicar não causando infecção, ou epimastigotas curtas que possuem a capacidade de multiplicação e infecção (Neves, 2010; Stahl *et al.*, 2014).

Além da transmissão vetorial, o parasito pode ser transmitido ao homem por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais, congênita e através da ingestão de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas (Prata, 1990; Brener & Gazzinelli., 1997; Andrade *et al.*, 2014). Essas formas de transmissão são responsáveis pela introdução e manutenção da doença de Chagas em regiões não-endêmicas, como nos países europeus, Japão, Austrália e América do Norte, assim como contribuem para a persistência da doença em países endêmicos da América Latina (Teixeira *et al.*, 2011; Domingues *et al.*, 2015). A infecção oral atualmente representa a rota de transmissão de maior prevalência no Brasil (Andrade *et al.*, 2014; Dario *et al.*, 2016). O Ministério da Saúde contabilizou 1.570 casos de doença de Chagas aguda no território nacional entre o período de 2000 e 2013 e aproximadamente 70% dos casos referia-se a transmissão oral (Ministério da Saúde, 2016).

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases distintas durante o seu percurso: a fase aguda, estágio inicial da doença, inicia-se de 6 a 10 dias após a infecção. Nessa fase, a maioria dos pacientes acometidos apresentam sintomas clínicos inespecíficos da doença (Prata, 1990; Frade *et al.*, 2013) como febre, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Ribeiro *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2014; Steverding, 2014; Malik *et al.*, 2015). Entretanto, em pacientes infectados pelo *T. cruzi* através da transmissão vetorial, é possível observar sinais clássicos da doença como o chagoma de inoculação, sendo definido por um edema no local da infecção pelo triatomíneo, ou sinal de Romana, caracterizado por um edema bpalbebral unilateral na conjuntiva ocular (Neves, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012; Steverding, 2014). Essa fase também é caracterizada por um aumento da parasitemia devido à intensa multiplicação do parasito no interior das células do hospedeiro (Ribeiro & Rocha, 1998; De Araújo *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013). Nessa fase, a doença pode ser detectada através de exame parasitológico realizado pelo isolamento em cultura ou da visualização microscópica do parasito em sangue periférico dos pacientes.

Após a fase aguda, ocorre diminuição da parasitemia em decorrência da resposta imune do hospedeiro e a infecção evolui para a fase crônica, com diferentes manifestações

clínicas (Ayo *et al.*, 2013; Steverding, 2014). Cerca de 60% dos indivíduos infectados apresentam a forma clínica indeterminada (IND), caracterizada pela positividade nos testes sorológicos e ausência de manifestações clínicas (Mathews, 1973; Ribeiro & Rocha, 1998; Macêdo, 1999; Ribeiro *et al.*, 2012; Ayo *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2014). Os pacientes com a forma clínica IND podem não desenvolver manifestações clínicas graves e permanecerem assintomáticos durante toda a vida (Gomes *et al.*, 2003). Entretanto, ao longo do tempo, indivíduos assintomáticos podem desenvolver alterações e evoluírem para uma forma clínica sintomática (Malik *et al.*, 2015).

Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca (CARD), resultante de danos progressivos do miocárdio levando a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (Prata, 1990; Ribeiro & Rocha, 1998; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009; Ayo *et al.*, 2013; Frade *et al.*, 2013; Abel *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2015). A CCC é caracterizada por uma miocardite com a formação de um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, levando à formação de um remodelamento tecidual e fibrose no tecido cardíaco, cardiomegalia e insuficiência cardíaca congestiva, que pode causar morte súbita do paciente (Ribeiro & Rocha, 1998; Andrade, 2000; Guedes *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2015). A falência cardíaca causada pela CCC possui o pior prognóstico e apresenta menos de 50% da taxa de sobrevivência quando comparadas às cardiopatias de diferentes etiologias (Frade *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2014), sendo considerada a mais fibrosante dentre as miocardites conhecidas (Bogliolo, 1976), com mais de 10.000 mortes por ano (Dutra *et al.*, 2015).

A forma clínica digestiva da doença de Chagas (DIG) atinge aproximadamente 10% dos indivíduos infectados (Ayo *et al.*, 2013). Suas manifestações clínicas são expressas como disfagia na presença de esofagopatia e constipação intestinal na presença de doença do cólon (Meneghelli, 1999). Essa forma sintomática da doença de Chagas é caracterizada por distúrbios gastrointestinais através da denervação parassimpática de gânglios intramurais que pode se agravar levando ao surgimento do megacólon e megaesôfago (Stanaway & Roth, 2015; WHO, 2016). No Brasil, a região centro-oeste possui alta frequência de indivíduos que apresentam a forma clínica DIG da doença (Rezende, 1984). A forma clínica cardiodigestiva (CDG), também conhecida como mista, é caracterizada pelas manifestações clínicas compatíveis com as formas CARD e DIG simultaneamente (Barreto, 1979; Rezende & Moreira, 2004; Ayo *et al.*, 2013) sendo raramente encontrada (Vago *et al.*, 2000).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas são ainda pouco compreendidos, portanto a análise de particularidades na patogênese das diferentes formas clínicas sugere que múltiplos fatores possam estar envolvidos no seu estabelecimento. Dentre esses fatores estão a variabilidade de cepa do *T. cruzi*, a presença de fatores de virulência, a carga parasitária inoculada, a via de infecção e a resposta imune do hospedeiro (Andrade *et al.*, 2002; Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015; Morrot *et al.*, 2016).

O estudo da resposta imune é crucial para determinar a evolução da doença (Savino *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2016) mobilizando múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida. Inicialmente, a rápida eliminação do parasito é a função primária da resposta imune inata. As células Natural Killer (NK) reconhecem moléculas presentes na superfície celular do protozoário, sendo as mais abundantes as moléculas tipo mucinas ligadas por âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa interação desencadeia a ativação das células NK que iniciam a secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), sendo críticos para ativação dos fagócitos (Andrade *et al.*, 2014).

Os monócitos/macrófagos são células do sistema imune inato que na presença do parasito reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) através de receptores específicos do tipo Toll (TLR), principalmente TLR-2 (Almeida & Gazzinelli, 2001; Junqueira *et al.*, 2010; Gravina *et al.*, 2013) e TLR4, o que desencadeia a fagocitose do *T. cruzi* e a internalização do microrganismo no fagolisossomo (Andrade *et al.*, 2014). O receptor TLR-9, presente na membrana dos endossomos também possuem um papel importante durante a infecção pelo *T. cruzi* (Akira & Takeda, 2004; Bartholomeu *et al.*, 2008). Durante a fagocitose os tripomastigotas desencadeiam a ativação do NADPH-oxidase associada à membrana do macrófago/monócito, resultando na produção contínua do ânion superóxido  $O_2^-$ . Esse ânion pode ser convertido em peróxido de hidrogênio, assim como outras espécies reativas de oxigênio podem ser geradas como consequência de reações citotóxicas imuno mediadas, resultando em dano mitocondrial e oxidação do DNA, proteínas e lipídios, levando à morte do parasito (Cardoso *et al.*, 2016). A presença de citocinas pro-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas pelas células NK e linfócitos podem estimular macrófagos/monócitos infectados a produzirem alta concentração de óxido nítrico (NO) através da atividade enzimática da óxido nítrico sintetase (iNOS) pela oxidação de L-arginina em L-citrulina e NO, sendo crucial para potencializar a capacidade de lise do protozoário (Álvarez *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2016).

Os monócitos formam uma população celular heterogênea apresentando distintas subpopulações (Thaler *et al.*, 2016). Monócitos provenientes de humanos podem ser

caracterizados de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD14 (Cros *et al.*, 2010; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2016), um co-receptor de TLR-4 que medeia eventos de transdução de sinal induzidos por LPS e CD16 (Cros *et al.*, 2010; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2016), um receptor com afinidade pela porção Fc de anticorpos, em três diferentes subpopulações: monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monócitos não-clássicos (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>++</sup>) e monócitos intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (Wildgruber *et al.*, 2016; Gaur *et al.*, 2016; Thaler *et al.*, 2016; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2016; Maga *et al.*, 2016). Os monócitos clássicos possuem alta capacidade de fagocitose (Thaler *et al.*, 2016) possuindo um caráter pró-inflamatório, diferente dos monócitos não-clássicos, que apresentam um perfil resolutivo da inflamação, a partir da produção de citocinas anti-inflamatórias. Todavia, o papel dessas subpopulações ainda não é compreendido na doença de Chagas, assim como a associação dessas subpopulações de monócitos no direcionamento da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos.

A atuação dos monócitos/macrófagos na ativação dos linfócitos e a produção de citocinas também é um dos mecanismos pelo qual o sistema imune inato influencia o desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa (Andrade *et al.*, 2014). Os macrófagos reconhecem e processam o *T. cruzi* para apresentarem fragmentos de peptídeos através do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) para o linfócito T CD4<sup>+</sup> via receptor de células T (TCR). Essa apresentação ativa a expressão de moléculas co-estimuladoras nos monócitos, como B7-1 (CD80) / B7-2 (CD86) e CD40 a interagirem com os receptores CD28 e CD40L, respectivamente, presente na superfície celular dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Essa interação, assim como a associação de outras moléculas co-estimuladoras e a liberação de citocinas desencadeia a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e pode estar relacionada com o direcionamento das suas diferentes subpopulações, resultando em células efetoras dos tipos Th1, Th2, Th17 ou Treg que diferem em suas funções, padrão de citocinas secretadas e expressão específica de fatores de transcrição (Teixeira *et al.*, 2011).

Os ligantes CD28 e CTLA-4 (CD152) presentes nos linfócitos são cruciais para determinar a ativação e a regulação dessas células. CD28 direciona a ativação dos linfócitos quando ligado a molécula co-estimuladora CD80/86 de monócitos, enquanto a CTLA-4 ligado as mesmas moléculas direciona a inibição da resposta celular linfocitária (Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994).

A subpopulação de linfócitos T *helper* Th1 possui um papel crucial na resposta imune adaptativa contra a infecção pelo *T. cruzi* por sua capacidade de recrutar e ativar outras células do sistema imune como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos

T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B. Essas células medeiam a resposta imune celular através da produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sendo cruciais para direcionar uma ação efetora mais eficiente pelos macrófagos (Teixeira *et al.*, 2011).

Os linfócitos Th2 estão envolvidos em reações imune humoral contra infecções parasitárias, principalmente por helmintos, direcionando a produção de anticorpos IgE por eosinófilos e mastócitos (Teixeira *et al.*, 2011). Essa subpopulação de linfócitos secreta, preferencialmente, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e fator transformante do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), auxiliando no controle das respostas inflamatórias (Bonney *et al.*, 2015).

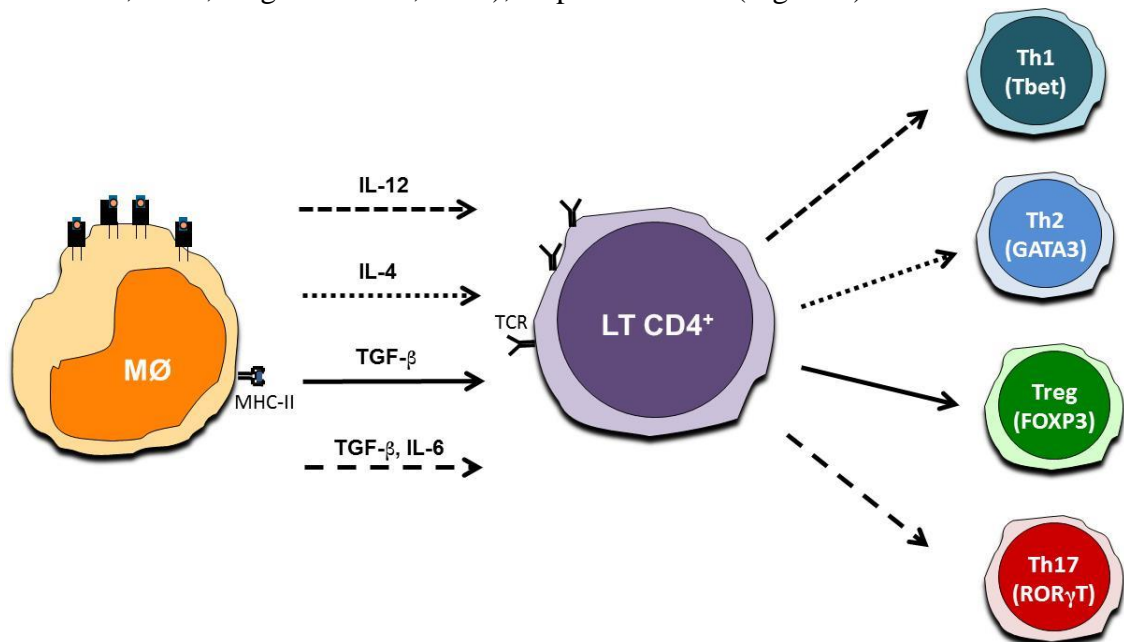
As células Th17 têm sido amplamente estudadas em diferentes patologias, como nas doenças autoimune (Teixeira *et al.*, 2011), incluindo artrite reumatóide e esclerose múltipla (Rakebrandt *et al.*, 2016), podendo estar associada com funções anti ou pró-inflamatória (Bonney *et al.*, 2015) através da liberação de citocinas, incluindo IL-17 e IL-22 (Teixeira *et al.*, 2011). Ainda não é consensual a função da IL-17 na fase crônica da doença de Chagas. Contudo, alguns autores afirmam que ela pode ter uma função importante para controlar o desenvolvimento da cardiopatia Chagásica por sua capacidade de regular as funções pro-inflamatórias dos linfócitos Th1 (Guedes *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013; Bonney *et al.*, 2015).

As células T reguladoras (Treg) são uma população celular de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> que possuem capacidade de controlar a resposta imune (Baecher-Allan *et al.*, 2002; de Araújo *et al.*, 2011; Mengel *et al.*, 2016) através do contato celular e/ou produção de citocinas (Sojka *et al.*, 2008). De Araújo e colaboradores (2012) observaram que a presença de células Treg em pacientes com a forma IND pode ser o diferencial para o melhor prognóstico clínico desses pacientes em relação aos pacientes com cardiopatia chagásica.

Muitos estudos demonstram que os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas possuem diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Estes estudos sugerem que pacientes com cardiopatia chagásica produzem de forma exacerbada citocinas pro-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que leva a formação de uma resposta do tipo Th1 com pouca produção de citocinas anti-inflamatórias, levando à perda da regulação da resposta imune e contribuindo para a manutenção da patologia (Gomes *et al.*, 2003; Cunha Neto *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012; Frade *et al.*, 2013; Basso, 2013; Chaves *et al.*, 2016). Por outro lado, pacientes com a forma clínica IND apesar de terem uma resposta inflamatória Th1 importante para controlar a replicação do parasito, produzem

predominantemente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-17, possuindo um equilíbrio entre a produção de citocinas inflamatórias e moduladoras que controlam os danos teciduais e desencadeando assim, uma resposta mediada por linfócitos T mais modulada (Gomes *et al.*, 2003; de Araújo *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2012; Magalhães *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015; Dutra *et al.*, 2015; Chaves *et al.*, 2016). Assim, a ativação do sistema imune é importante no controle da replicação do parasito e na redução da carga parasitária na fase aguda. Porém, pode contribuir para o desenvolvimento de lesões teciduais e no aparecimento das diferentes manifestações clínicas observadas nos pacientes durante a fase crônica (Gomes *et al.*, 2005; Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

Mediadores inflamatórios produzidos pelos monócitos podem ser importantes na modulação da resposta imune na doença de Chagas, e podem determinar o prognóstico da infecção. Dentre esses mediadores, destacam-se a IL-12 que direciona uma resposta Th1 (Brener & Gazzinelli, 1997), IL-4 que desencadeia uma resposta Th2, TGF- $\beta$  que direciona uma resposta Treg e a produção de IL-6 desencadeia uma resposta Th17 (Afzali *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2011). A produção dessas citocinas é essencial para que ocorra a expressão dos fatores de transcrição que caracterizam as diferentes subpopulações de linfócitos T helper Th1, Th2, Th17 e Treg: “T-box expressed in T cells” (T-bet), “GATA-binding protein-3” (GATA-3), “retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t” (ROR $\gamma$ -T) e “forkhead box P3” (FOXP3) (Afzali *et al.*, 2007, Nogueira *et al.*, 2014), respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Associação dos mediadores liberados pelos monócitos/macrófagos no direcionamento dos diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 ou Treg). Os diferentes tracejados das linhas estão diretamente relacionados com o desenvolvimento das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Souza e colaboradores (2004) demonstraram que monócitos derivados de pacientes com a forma IND apresentam características moduladoras, com baixa expressão de HLA-DR e alta expressão de IL-10. Por outro lado, monócitos de pacientes CARD parecem comprometidos com a intensa resposta inflamatória devido à alta expressão de TNF- $\alpha$ . Outros trabalhos observaram que os linfócitos dos pacientes assintomáticos apresentavam maior expressão de CLTA-4, sugerindo a formação de um ambiente modulado quando comparado com os pacientes CARD (Souza *et al.*, 2007). Gomes e colaboradores (2005) demonstraram que pacientes com cardiopatia chagásica possuíam altos níveis de IFN- $\gamma$  em relação a pacientes IND e NI, com baixa expressão de IL-10, o que poderia estar envolvido no desenvolvimento da forma cardíaca grave. Este estudo também demonstrou que a secreção de IFN- $\gamma$  em pacientes CARD é realizada por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, enquanto a produção de IL-10 em pacientes assintomáticos é realizada por monócitos. Esses dados sugerem que essa população de fagócitos pode estar envolvida na regulação da resposta imune na doença de Chagas através da secreção de IL-10 que pode atuar regulando a expressão de IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Pacientes com doença de Chagas mostraram alta resposta proliferativa contra o *T. cruzi* quando comparados com pacientes NI e após a depleção de células aderentes, sendo em sua maioria macrófagos, a resposta proliferativa contra o protozoário era aumentada nos indivíduos NI, IND e CARD, sugerindo um efeito supressivo exercido pelos monócitos (Gomes *et al.* 2013). Após a depleção de monócitos, foi observado uma diminuição significativa nos níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$ , assim como uma redução nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 de pacientes IND e CARD, demonstrando ser os monócitos importante fonte de IL-10. Dessa forma, os mediadores produzidos pelos monócitos podem ser importantes para diferenciar a resposta imune entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, podendo assim influenciar na evolução das diferentes formas clínicas da patologia.

Atualmente, muito se conhece sobre a atuação dos monócitos e dos linfócitos nas diferentes formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas. Contudo, a associação entre a resposta imune inata e a geração da resposta adaptativa induzida pelo *T. cruzi* tem sido pouco explorada. Apesar do grande número de estudos relacionados à resposta imune celular mediada por linfócitos (Sathler-Avelar *et al.*, 2009; Kayama & Takeda, 2010; Junqueira *et al.*, 2010; Aoki *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012), pouco se sabe a respeito do perfil dos mediadores e das células da resposta imune inata no direcionamento da resposta imune adaptativa durante a fase crônica doença de Chagas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### 4.1 Aspectos éticos

O presente estudo atende aos aspectos fundamentais da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Nº 15/2011) (Anexo A).

#### 4.2 Caracterização da população de estudo

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram recrutados no Ambulatório de doenças infecto parasitárias do CPqRR, sob a coordenação da Dra. Silvana Maria Eloi Santos. Foram realizados em todos os pacientes exame clínico completo conforme rotina do serviço, além de exames complementares, dependendo das características e indicações de cada caso, incluindo radiografia torácica, eletrocardiograma convencional, esôfagograma com pesquisa de retenção (técnica de Neuheuser) e enema opaco de enchimento, sem preparo (sendo os dois últimos solicitados apenas para definição da forma indeterminada ou esclarecimento de constipação intestinal).

O cuidado clínico foi oferecido independentemente da aceitação ou não em participar do estudo. Os pacientes que preencherem os critérios de inclusão foram divididos nos seguintes grupos:

**Grupo de indivíduos não infectados (NI):** Constituído por indivíduos que apresentarem um mínimo de dois resultados sorológicos negativos para a doença de Chagas, além de ausência de indícios clínicos da doença e ausência de alterações cardíacas.

**Grupo de pacientes que apresentam a forma clínica indeterminada (IND):** Constituído por pacientes que apresentam positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ ou sinais da moléstia; eletrocardiograma (ECG) convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

**Grupo de pacientes que apresentam a forma clínica cardíaca (CARD):** Constituído por pacientes que apresentam positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas, ECG com alterações avançadas, extra-sístoles ventriculares frequentes, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e uma silhueta cardíaca aumentada.

Os indivíduos não infectados foram selecionados pelos pesquisadores, pertencendo ao convívio pessoal dos mesmos, cuja procedência demográfica era conhecida, considerando os critérios de exclusão mencionados a seguir.

#### *4.2.1 Critérios de inclusão*

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, os pacientes chagásicos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- Diagnóstico sorológico para a doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA, hemaglutinação e reação de imunofluorescência indireta);
- Idade compreendida entre 30 e 75 anos;
- Níveis de tensão arterial dentro de faixa na normalidade (sistólica <130 mmHg e diastólica <90 mmHg).
- Presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo;
- Ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas;
- Ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória;
- Conclusão dos exames propostos;
- Consentimento voluntário de participação na pesquisa.

#### *4.2.2 Critérios de exclusão*

Foram excluídos deste estudo todos os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima e os que apresentaram:

- Impossibilidade ou ausência de disponibilidade para a realização dos exames propostos;
- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade ou pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a: 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou; 2) quarta bulha ao exame físico, ou 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax;

- Evidências clínicas ou laboratoriais de hipotireoidismo ou hipertireoidismo não induzido por medicamento;
- Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose;
- Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
- Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420g de etanol (média diária acima de 60g de etanol);
- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- Outras cardiopatias;
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que possa interferir nos resultados dos métodos propostos.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menor que 10g/dL;
- Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;
- Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

#### **4.3 Preparação dos antígenos derivados da forma tripomastigota (TRIPO) do *T. cruzi***

As formas tripomastigotas foram obtidas de cultura de células LLC mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitos da cepa CL Brener foram lavados 3 vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completando-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvehjem, 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subsequentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50.000g durante 60 minutos a 4°C com PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0.45µm e mantido em pequenas alíquotas de 1mL a -70°C até o uso. A contenção de antígenos proteicos foi dosada através do equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e a concentração final utilizada foi de 20µg/mL.

#### **4.4 Análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo**

Amostras de sangue periférico dos pacientes que participaram do estudo foram coletadas em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. Foi adicionado em tubos de polipropileno de 14mL (Falcon, E.U.A) alíquotas de 1mL de sangue periférico dos indivíduos e foi incubado apenas na presença de meio RPMI (Gibco), recebendo a denominação de cultura sem estímulo (controle) ou na presença de antígenos solúveis tripomastigotas do *T. cruzi*, com uma concentração final de 20µg/mL, recebendo a denominação de cultura com estímulo (Tripo). Os tubos foram posteriormente incubados por 18 horas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific - EUA). Previamente, foram adicionadas aos tubos 20µL de Brefeldina A (Sigma, EUA) na concentração de 1mg/mL e em seguida as culturas incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições já citadas. A Brefeldina é essencial para a retenção das moléculas no interior celular, uma vez que essa substância interfere no transporte intracelular quando rompe o aparelho de Golgi. Posteriormente foi adicionado aos tubos de cultura 200µL de EDTA (Sigma, EUA) na concentração final de 2mM. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de umidade a 37°C. O EDTA bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Após o período de incubação, foram adicionadas aos tubos 3mL de PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e as amostras foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 2,5mL. Posteriormente foram adicionados 200µL deste sangue em tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, EUA) devidamente identificados e com anticorpos de superfície correspondentes e foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Pós o período de incubação, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise (50.000USP/L de heparina, 2,85g/L de citrato de sódio, 30mL/L de dietilenoglicol e 54mL/L de formaldeído) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Foi adicionado 1mL de de PBS-W para a interrupção da lise e os tubos foram centrifugados a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi vertido, as células foram lavadas novamente com 2mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. Posteriormente, após verter os tubos, foram acrescentados 2,5mL de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) seguido por uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Para a detecção dos marcadores intracelulares foi adicionado após a incubação anticorpo anti-citocinas e anti-fatores de transcrição aos respectivos tubos por 1 hora na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. No final, foram adicionados 200µL de solução fixadora (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - reagentes SIGMA, E.U.A). As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACS LDRFortessa - BD, E.U.A). Foram analisados 60.000 eventos dentro da população de linfócitos pelos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). As moléculas de superfície analisadas, assim como os marcadores intracelulares estão descritos na tabela do Anexo B. Os anticorpos foram conjugados com FITC, PE, PERCP (ou PE-Cy5 ou PERCP-Cy5.5), APC, APCCy7, PE-Cy7, BV421.

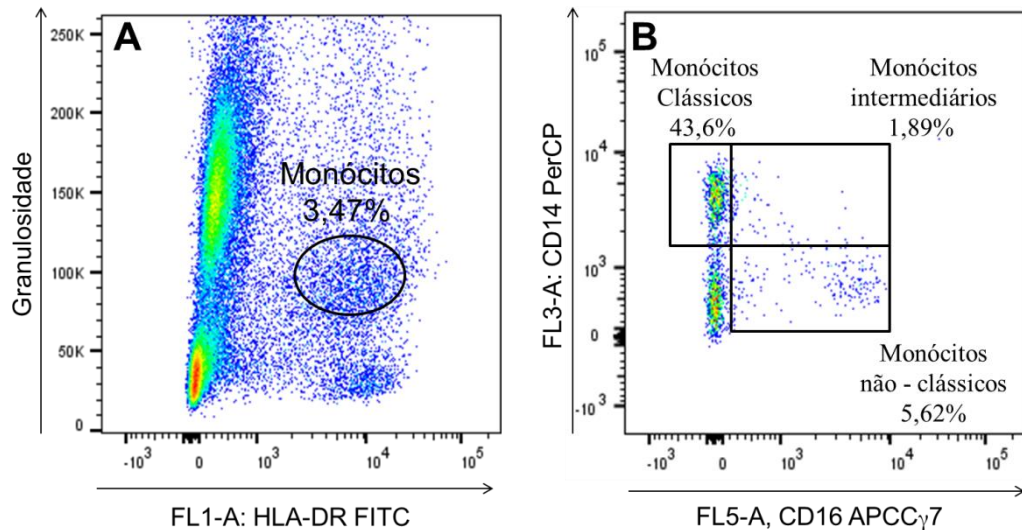
#### **4.5 Aquisição e estratégia de análise dos dados**

O citômetro de fluxo (FACS LDRFortessa - BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com quatro lasers – azul, vermelho, violeta e ultravioleta (UV) que permite detecção de 10 parâmetros simultaneamente: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4), fluorescência do tipo 5 (FL5), fluorescência do tipo 6 (FL6), fluorescência do tipo 7 (FL7) e fluorescência do tipo 8 (FL8), sendo que a última fluorescência não foi utilizada no presente estudo. FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7 correspondem aos sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP, APC, APCCy7, PE-Cy7 e BV421, simultaneamente. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foram feitas através do software *FlowJo*. Foram coletados 60.000 eventos dentro da população de linfócitos.

##### *4.5.1 Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações monócitos*

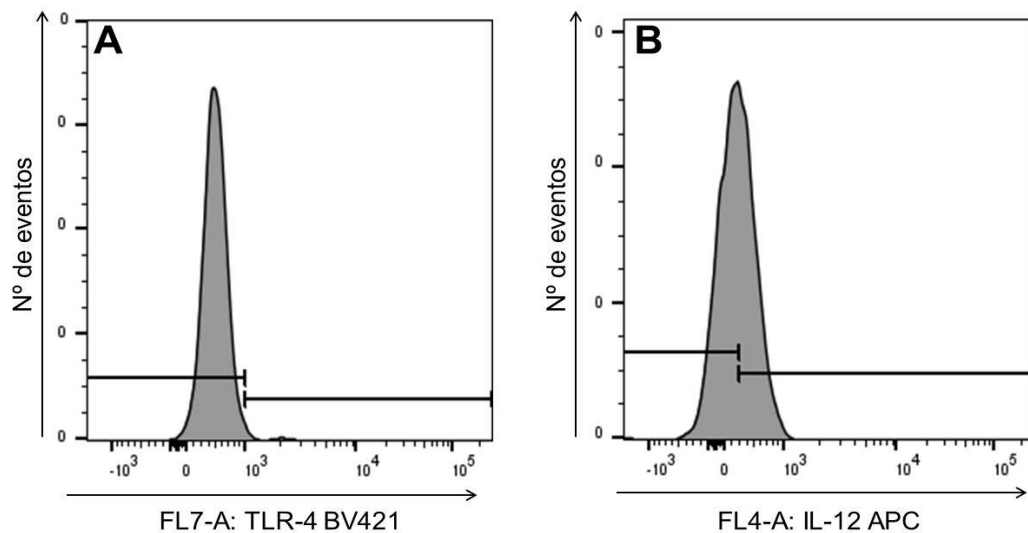
Para caracterizar o perfil fenotípico dos monócitos do sangue periférico e suas subpopulações, inicialmente foi criado um gráfico de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) versus densidade de fluorescência-1 (FL1-A, HLA-DR FITC), sendo selecionado por uma janela – “gate” a população de monócitos total (Figura 2A). Após a seleção da população de interesse, foi criado um novo gráfico de densidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14

PerCP) *versus* densidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD16 APCC $\gamma$ 7), ocorrendo a delimitação das três subpopulações de monócitos: monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), monócitos intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) (Figura 2B).



**Figura 2. Análise do perfil fenotípico dos monócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo.** (A) Representa o perfil da população de monócitos totais, selecionados no gate “Monócitos” em gráfico de granulosidade (SSC) versus densidade de fluorescência-1 (FL1-A, HLA-DR FITC). (B) representa perfil das subpopulações de monócitos: monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), monócitos intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>), em gráfico de densidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14 PerCP) *versus* densidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD16 APCC $\gamma$ 7).

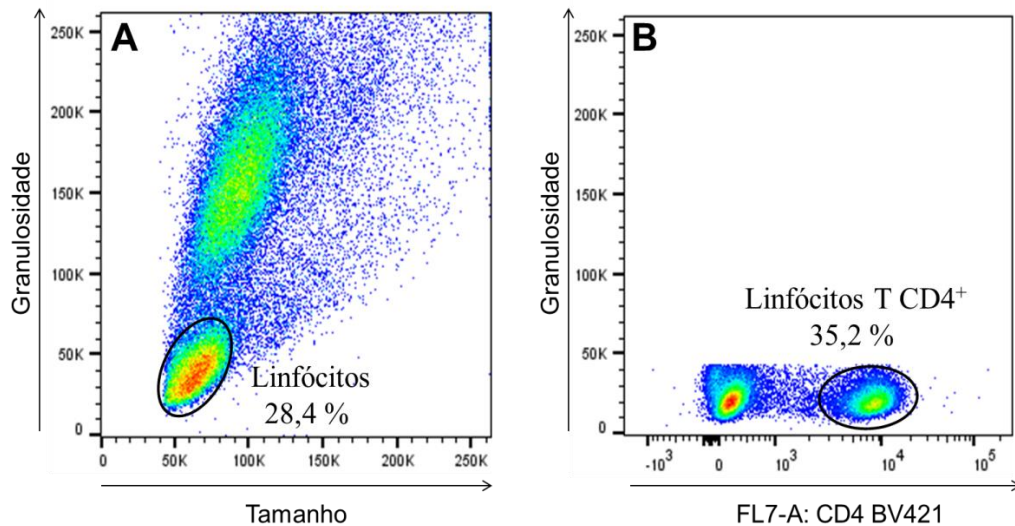
A próxima estratégia correspondeu à avaliação do perfil fenotípico-funcional das subpopulações de monócitos. Moléculas expressas constitutivamente (TLR-2, TLR-4, TLR-9, CD80 e CD86) nessas subpopulações celulares foram analisadas quanto à intensidade média de fluorescência (IMF) em gráfico de histograma (Figura 3A). A mesma estratégia de análise foi realizada para as moléculas expressas por essas células (IL-10 e IL-12) (Figura 3B).



**Figura 3. Análise do perfil fenotípico-funcional das subpopulações de monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.** (A) Representa o perfil de análise da expressão de TLR-4 pelas subpopulações de monócitos do sangue periférico, por intensidade média de fluorescência (IMF). (B) representa o perfil de análise da expressão de IL-12 pelas subpopulações de monócitos do sangue periférico, pela frequência de células que expressam.

#### 4.5.2 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos e suas subpopulações *Th1*, *Th2*, *Treg* e *Th17*

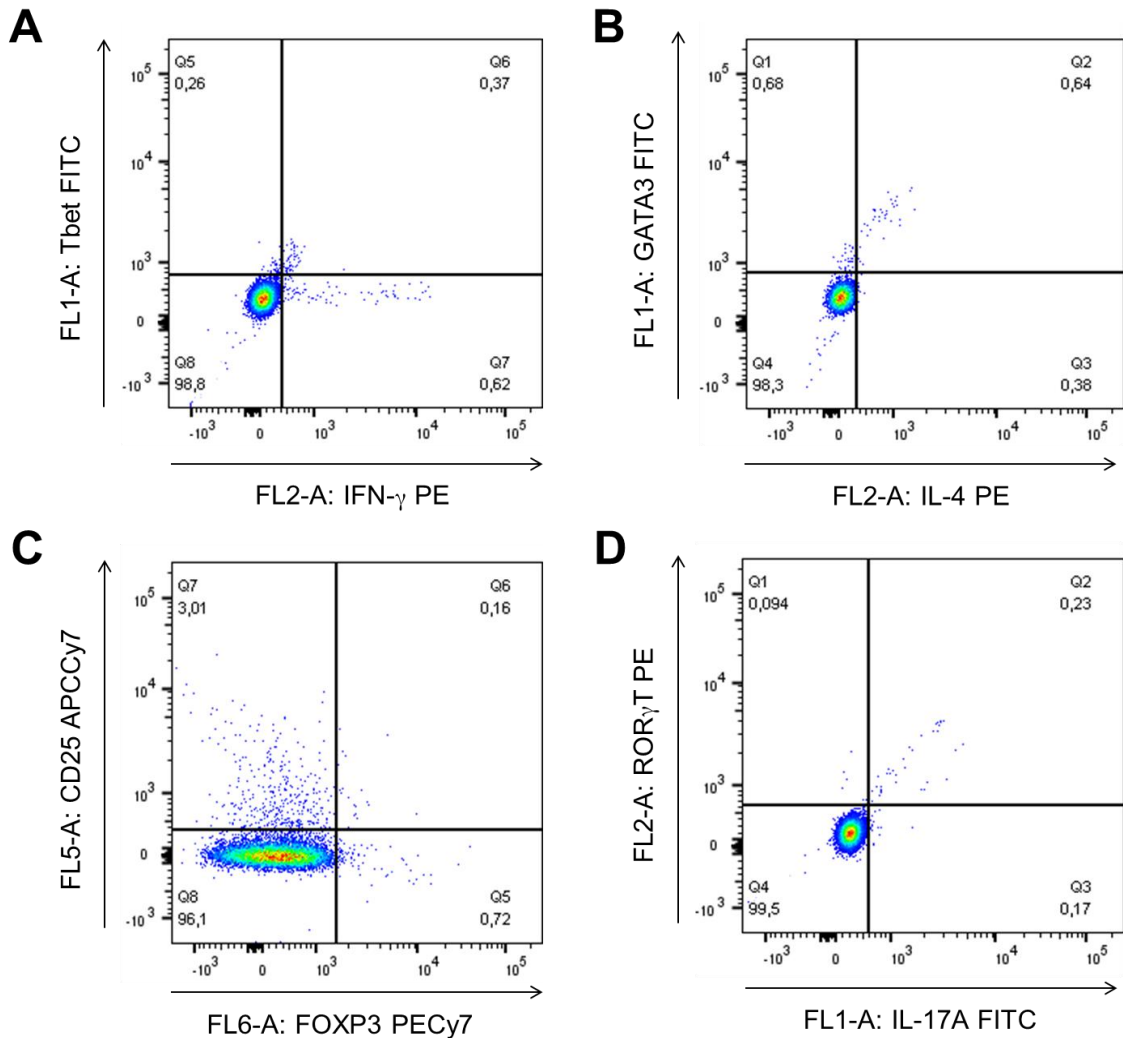
A caracterização dos linfócitos totais foi obtida através do gráfico de tamanho celular (forward scatter - FSC) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC) e com a criação de um “gate” na população de linfócitos (Figura 4A). Posteriormente, foi criado um novo gráfico de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) versus densidade de fluorescência-7 (FL7-A, CD4 BV421) na qual foi criado um “gate” na população de linfócitos auxiliares (linfócitos T CD4<sup>+</sup>) (Figura 4B).



**Figura 4. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo.** (A) Representa o perfil da população de linfócitos totais, selecionados no gate “Linfócitos” em gráfico de granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Representa o perfil da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> através do gráfico de granulosidade (SSC) *versus* densidade de fluorescência-7 (FL7-A, CD4 BV421)

A próxima estratégia foi utilizada para a identificação das subpopulações de linfócitos de interesse: após selecionar o “gate” na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi criado um gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1-A, Tbet FITC) *versus* densidade de fluorescência-2 (FL2-A, IFN- $\gamma$  PE) que caracteriza a subpopulação Th1 (Figura 5A), um gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1-A, GATA3 FITC) *versus* densidade de fluorescência-2 (FL2-A, IL-4 PE) que caracteriza a subpopulação Th2 (Figura 5B), um gráfico de densidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APCCy7) *versus* densidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PECy7) que caracteriza a subpopulação Treg (Figura 5C) e um gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2-A, ROR $\gamma$ T PE) *versus* densidade de fluorescência-1 (FL1-A, IL-17A FITC) que caracteriza a subpopulação Th17 (Figura 5D). Nos linfócitos TCD4<sup>+</sup> reguladores também foi avaliado a expressão das citocinas IL-10 e IL-17.

Foram avaliados nos linfócitos totais a frequência de CD25, CD28 e CD152 pela frequência de células produtoras em gráfico de histograma.



**Figura 5. Análise do perfil fenotípico das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por citometria de fluxo.** (A) Representa a subpopulação Th1 através do gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1-A, Tbet FITC) *versus* densidade de fluorescência-2 (FL2-A, IFN- $\gamma$  PE). (B) Representa a subpopulação Th2 pela expressão do fator de transcrição GATA3 através do gráfico de um gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1-A, GATA3 FITC) *versus* densidade de fluorescência-2 (FL2-A, IL-4 PE). (C) Representa a subpopulação Treg pela expressão do fator de transcrição FOXP3 através do gráfico de um gráfico de densidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APCCy7) *versus* densidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PECy7). (D) Representa a subpopulação Th17 pela expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ T através do gráfico de densidade de fluorescência-2 (FL2-A, ROR $\gamma$ T PE) *versus* densidade de fluorescência-1 (FL1-A, IL-17A FITC).

#### 4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica.

Para verificar diferenças estatísticas entre as culturas controles e as culturas estimuladas foi realizada análise pareada empregando o teste de Wilcoxon, seguido de Rank. Diferenças entre as formas clínicas nos grupos controle e Tripo foram determinadas com o teste de Kruskal-Wallis. O intervalo de confiança definido foi 95% e as diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

A associação entre as subpopulações de monócitos e de linfócitos foi determinada a partir da regressão linear, considerando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para a qualidade do ajuste e o teste  $F$  para medir a variância entre os pares ( $p < 0.05$ ).

A correlação entre as variáveis dependentes foi avaliada considerando o coeficiente de Spearman ( $\rho$ ). Apenas correlações fortes ( $\rho > 0.63$ ) e estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ) foram representadas.

## **5 RESULTADOS**

---

O estudo da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro induzida contra o *T. cruzi* é de grande importância para determinar a evolução da doença de Chagas (Savino *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2016). A ativação da imunidade inata e conseqüentemente da imunidade adaptativa são mecanismos intrínsecos que determinam tal evolução. Dessa forma, para compreender a associação entre as subpopulações de monócitos e as diferentes subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17, Treg), os resultados do presente estudo serão apresentados em quatro partes.

A primeira parte constitui-se da caracterização das subpopulações de monócitos (monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos) em culturas sem estímulo (controle) e em culturas na presença de antígenos solúveis tripomastigotas do *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND) e cardíaca (CARD). Foi avaliado a frequência da expressão das citocinas IL-12 e IL-10 por intensidade média de fluorescência, a expressão das moléculas de reconhecimento TLR-2, TLR-4 e TLR-9 e de co-estimulação CD80 e CD86 em cada subpopulação de monócitos.

A segunda parte do trabalho caracterizou as subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1, Th2, Th17 e Treg) através da expressão dos fatores de transcrição Tbet, GATA3, ROR $\gamma$ T e FOXP3, respectivamente, em cultura controle e Tripo, em indivíduos NI, IND e CARD. Também foi avaliada a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10, pelos linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg respectivamente, assim como a co-expressão de IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> pelas células T reguladoras. Avaliou-se também a expressão das moléculas de ativação CD25, CD28 e CTLA-4 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais em indivíduos NI, IND e CARD.

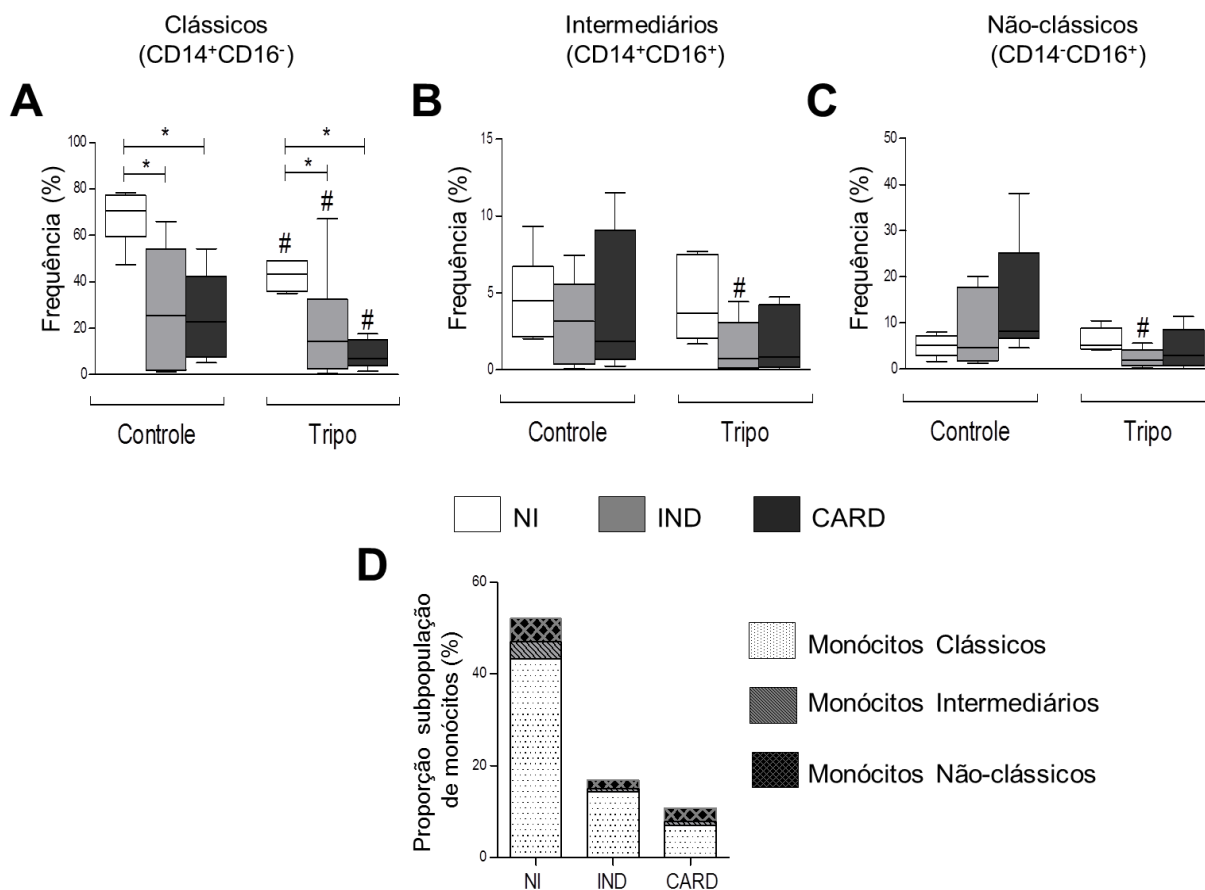
A terceira parte do trabalho possuiu como objetivo associar as subpopulação de monócitos CD80<sup>+</sup> ou CD86<sup>+</sup> com as subpopulação de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg através da análise de regressão linear em indivíduos NI, IND e CARD.

A quarta e última parte do presente estudo constitui-se na análise de correlação entre os linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg e as citocinas expressas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e a co-expressão de IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, respectivamente, com as subpopulações de monócitos IL-12<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> em indivíduos NI, IND e CARD.

## **5.1. Avaliação do perfil fenotípico e funcional das subpopulações de monócitos**

### *5.1.1 Avaliação das subpopulações de monócitos*

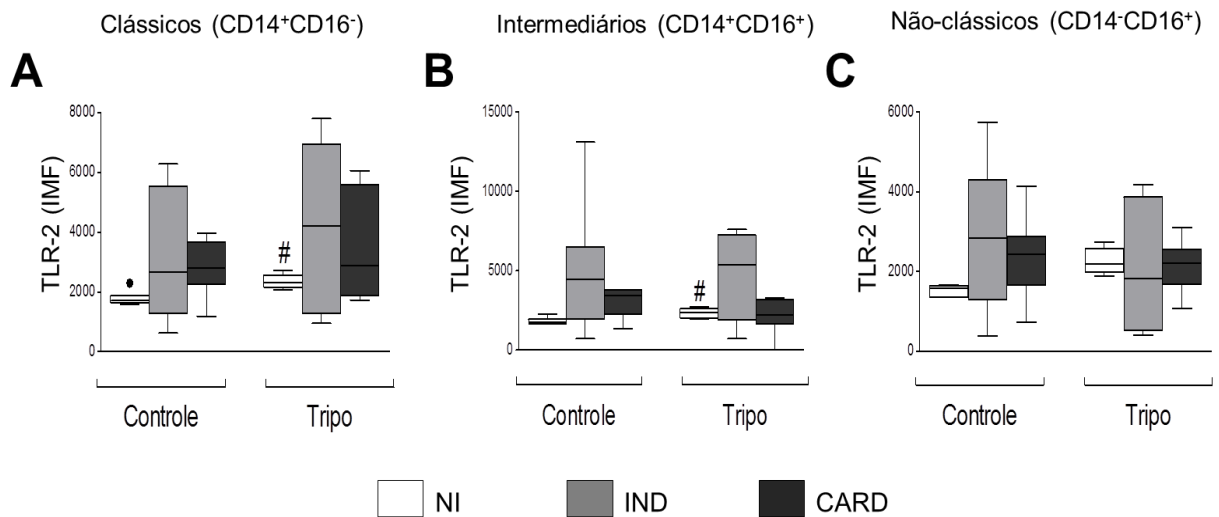
Os resultados obtidos demonstram que indivíduos não infectados possuem maior frequência de monócitos clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) quando comparados ao grupo IND e CARD em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo). Além disso, observa-se diminuição significativa na frequência dessa subpopulação após estímulo nos três grupos avaliados (Figura 6A). Observamos também a diminuição na frequência de monócitos intermediários (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) (Figura 6B) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) (Figura 6C) após estímulo em indivíduos IND. Os resultados demonstraram que todos os grupos estudados apresentam maior proporção de monócitos clássicos quando comparados com monócitos intermediários e não-clássicos (Figura 6D).



**Figura 6. Análise da frequência das subpopulações de monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Frequência de monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não clássicos (C) foi avaliada em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo), assim como a proporção de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos (D) após estímulo *in vitro* em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e Tripo.

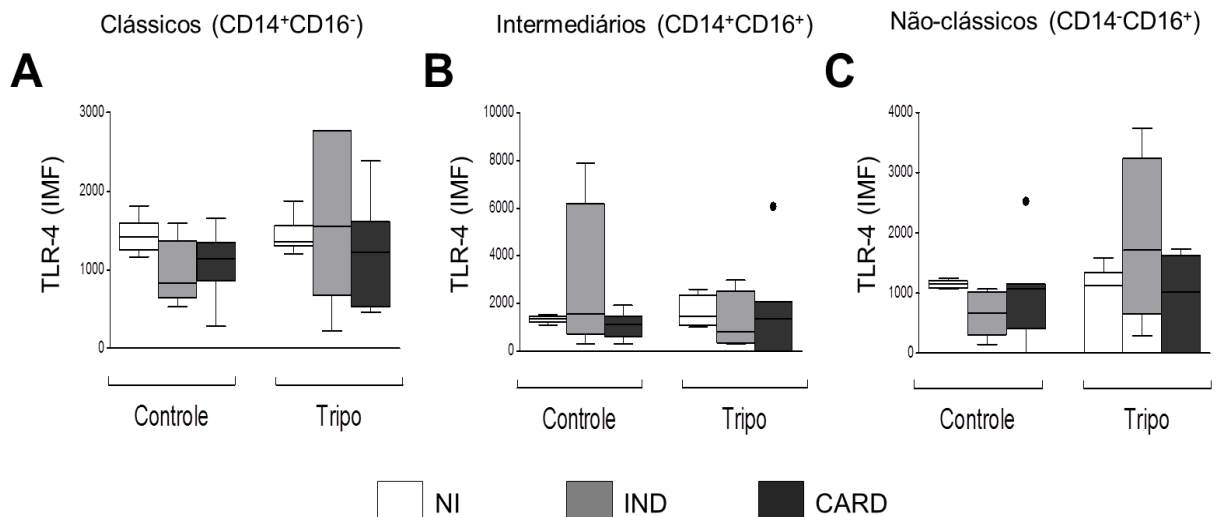
### 5.1.2 Avaliação da expressão das moléculas de reconhecimento TLR-2, TLR-4, TLR-9 e co-estimulação CD80 e CD86 nas subpopulações de monócitos

Os resultados demonstraram um aumento significativo da expressão de TLR-2 em monócitos clássicos (Figura 7A) e intermediários (Figura 7B) do grupo NI após estímulo *in vitro* com Tripo quando comparados à cultura controle. Entretanto, não observamos alterações significativas quanto à expressão de TLR-2 nos monócitos dos demais grupos avaliados.



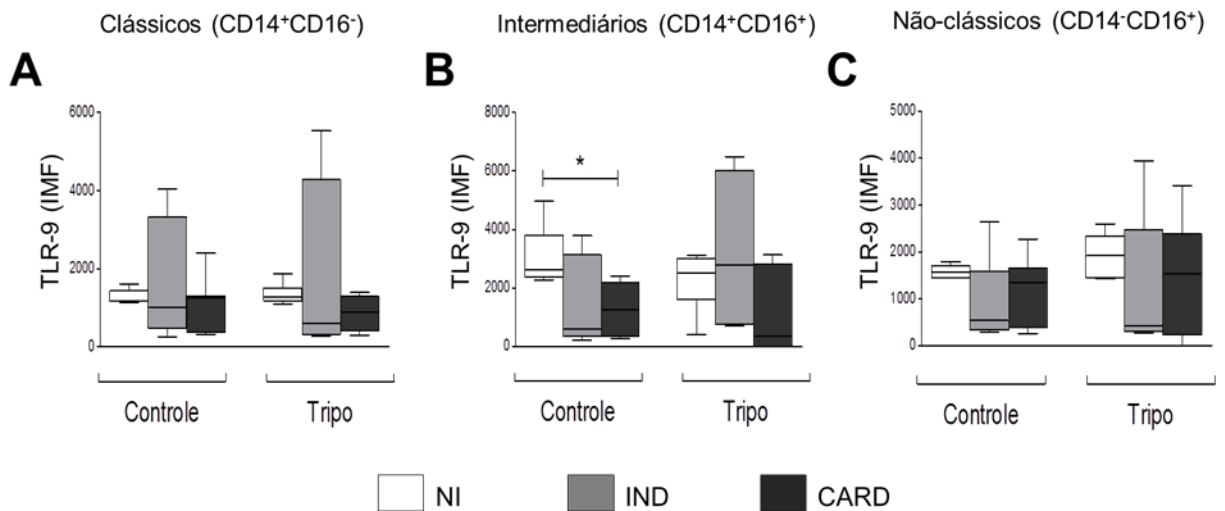
**Figura 7. Análise da expressão de TLR-2 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).** A expressão de TLR-2 foi avaliada por intensidade média de fluorescência (IMF) em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) estão representadas pelo octothorpe (#) quando comparados controle e Tripo em um mesmo grupo. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

Não foram observadas alterações significativas na expressão de TLR-4 nas diferentes subpopulações de monócitos dos grupos avaliados em cultura controle e Tripo (Figura 8).



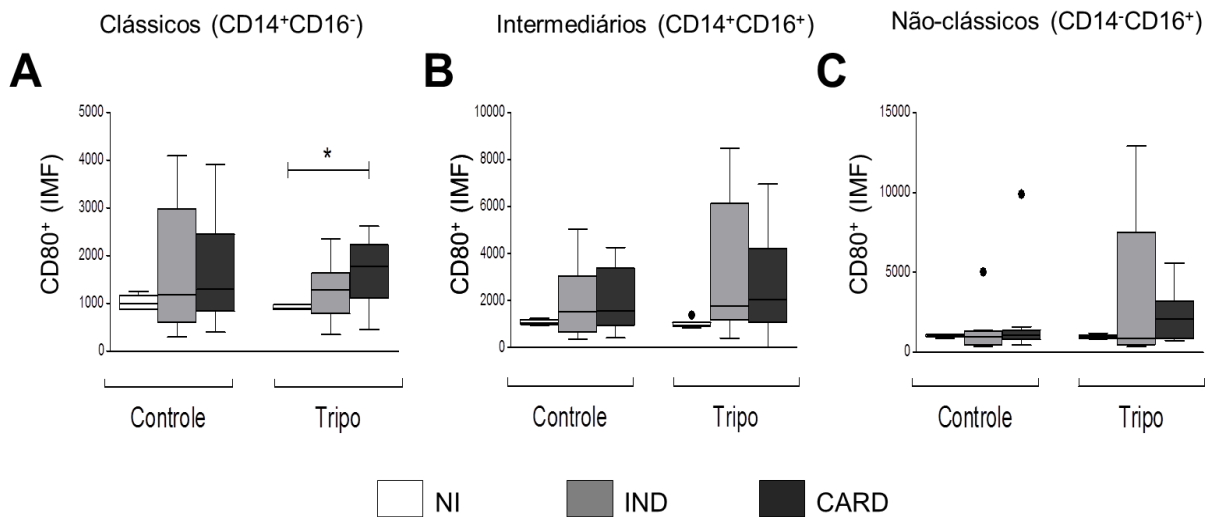
**Figura 8. Análise da expressão de TLR-4 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).** A expressão de TLR-4 foi avaliada por intensidade média de fluorescência (IMF) em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. Não foi possível observar diferença na expressão dessa molécula nos grupos avaliados. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

Em relação à expressão de TLR-9, houve apenas um aumento significativo na expressão dessa molécula em monócitos intermediários no grupo NI quando comparados ao grupo CARD em cultura controle (Figura 9B). Quando observados os monócitos clássicos (Figura 9A) e não-clássicos (Figura 9C) não foram observadas alterações significativas quanto à expressão de TLR-9 nos grupos estudados.



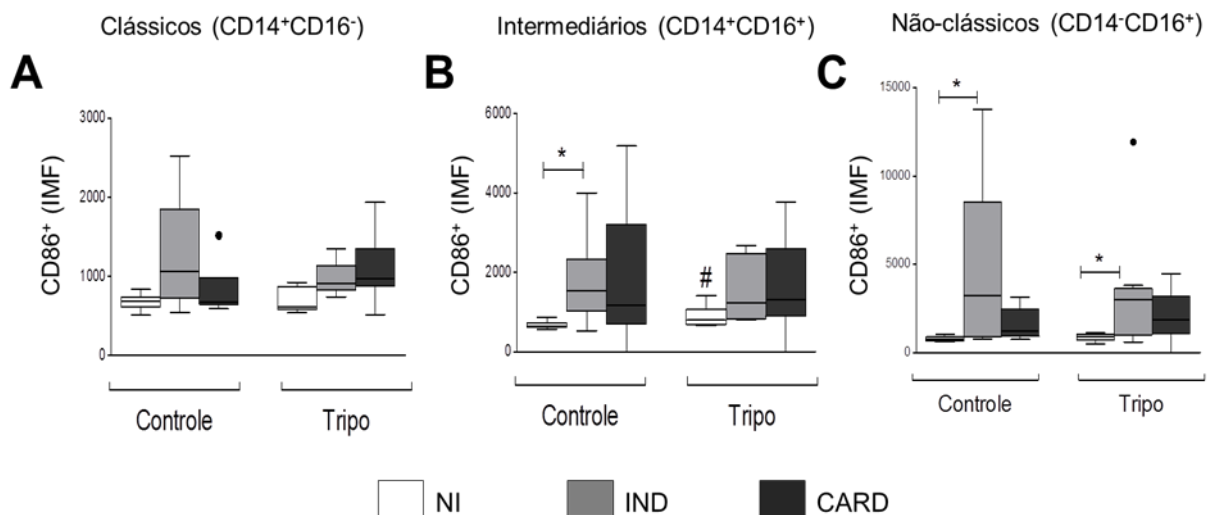
**Figura 9. Análise da expressão de TLR-9 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C).** A expressão de TLR-9 foi avaliada por intensidade média de fluorescência (IMF) em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*).

Demonstramos ainda um aumento significativo na expressão de CD80 em monócitos clássicos no grupo CARD quando comparado a NI após estímulo *in vitro* (Figura 10A). Em relação aos monócitos intermediários (Figura 10B) e não-clássicos (Figura 10C) não observamos alterações significativas quanto à expressão de CD80 nos grupos estudados.



**Figura 10.** Análise da expressão da molécula co-estimuladora CD80 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C). A expressão de CD80 foi avaliada por intensidade média de fluorescência (IMF) em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

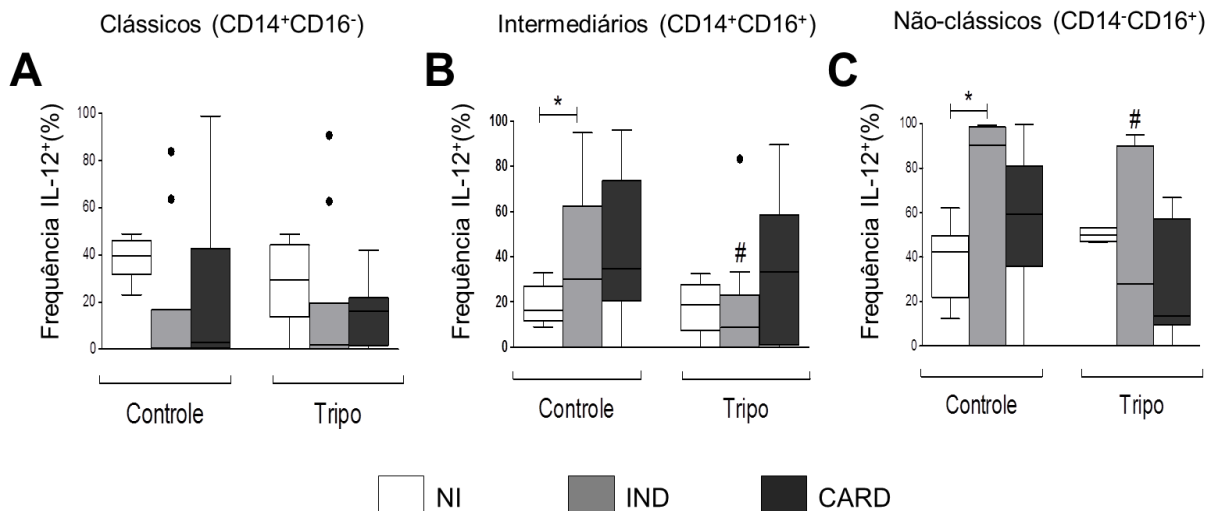
Observou-se um aumento significativo na expressão de CD86 em monócitos intermediários no grupo NI após estímulo Tripo em relação à cultura controle (Figura 11B). Nossos resultados mostram que monócitos intermediários (Figura 11B) e não-clássicos (Figura 11C) do grupo IND também aumentaram significativamente a expressão de CD86 em relação ao grupo NI nas culturas controle. Porém, apenas os monócitos não-clássicos mostraram o mesmo aumento após estímulo com Tripo (Figura 11C).



**Figura 11.** Análise da expressão da molécula co-estimuladora CD86 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C). A expressão de CD86 foi avaliada por intensidade média de fluorescência (IMF) em cultura controle e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e Tripo. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

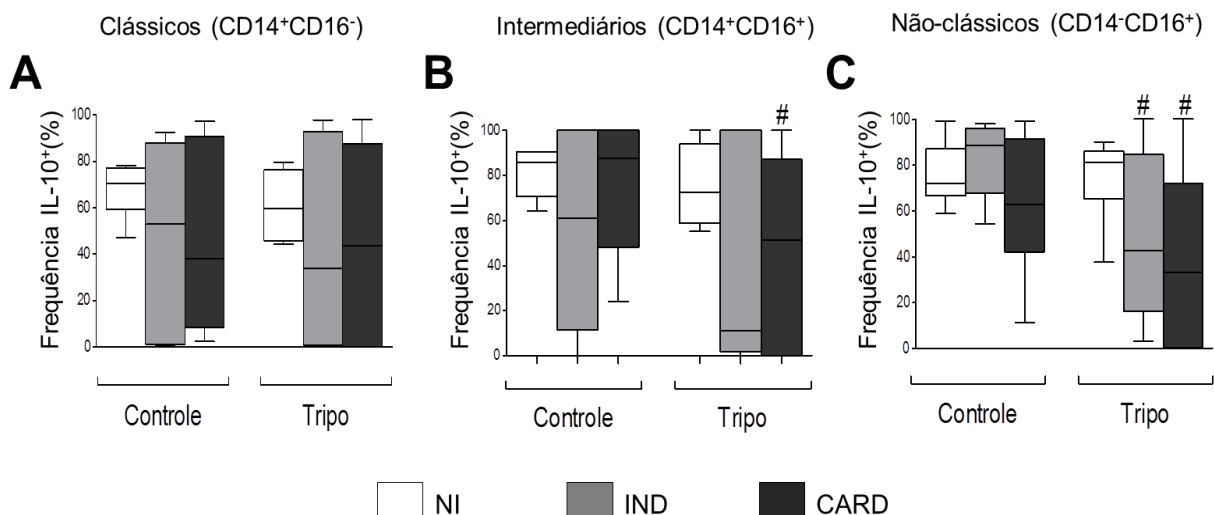
### 5.1.3 Avaliação da expressão das citocinas IL-12 e IL-10 nas subpopulações de monócitos

Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo na expressão de IL-12 em monócitos intermediários (Figura 12B) e não clássicos (Figura 12C) no grupo IND quando comparado a indivíduos NI apenas na cultura controle. Após o estímulo com Tripo, observamos uma redução significativa da expressão de IL-12 em ambas subpopulações no grupo IND (Figuras 12B e 12C). Todavia, não foram observadas diferenças significativas na expressão de IL-12 para os monócitos clássicos em nenhum dos grupos avaliados (Figura 12A).



**Figura 12. Análise da expressão de IL-12 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não clássicos (C).** Os resultados foram demonstrados através do percentual de células IL-12<sup>+</sup> em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e Tripo. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

A expressão de IL-10 demonstrou-se significativamente reduzida em monócitos intermediários do grupo CARD (Figura 13B) e não-clássicos dos grupos IND e CARD (Figura 13C) após estímulo com Tripo em relação à cultura controle.

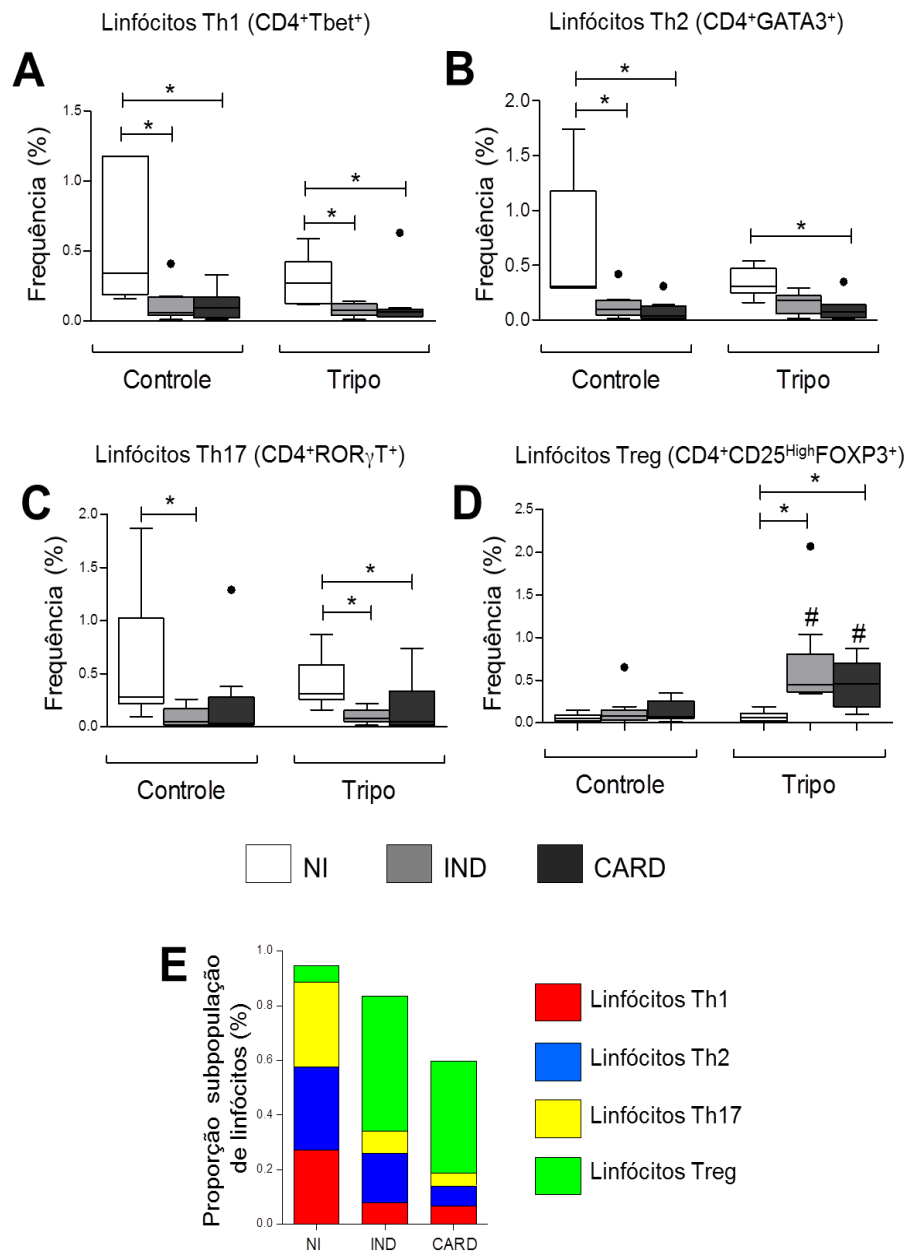


**Figura 13. Análise da expressão de IL-10 em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não clássicos (C).** Os resultados foram demonstrados através do percentual de células IL-10<sup>+</sup> em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo) em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo octothorpe (#) quando comparados controle e Tripo em um mesmo grupo.

## 5.2. Avaliação do perfil fenotípico e funcional das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

### 5.2.1 Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Nossos resultados mostram que o grupo NI tem um aumento significativo de linfócitos Th1 (Figura 14A) e Th2 (Figura 14B) quando comparados aos grupos IND e CARD em cultura controle. Após estímulo *in vitro* com Tripo o mesmo aumento foi observado, exceto em relação aos linfócitos Th2, onde o grupo NI apresenta um número maior de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apenas em relação ao CARD (Figura 14B). Observamos também uma maior frequência de linfócitos Th17 em indivíduos NI quando comparados ao grupo IND em cultura controle e quando comparados a pacientes IND e CARD em Tripo (Figura 14C). A frequência de linfócitos Treg é significativamente maior nos grupos IND e CARD quando comparado ao NI (Figura 14D). A análise dos dados demonstrou que indivíduos NI apresentam proporção semelhante entre a frequência de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e pequena proporção de células Treg. Em pacientes IND e CARD foi possível observar maior proporção de linfócitos Treg em relação aos linfócitos Th1, entretanto indivíduos IND possuem maior proporção de células Treg, Th2 e Th17 quando comparados a pacientes CARD (Figura 14E).

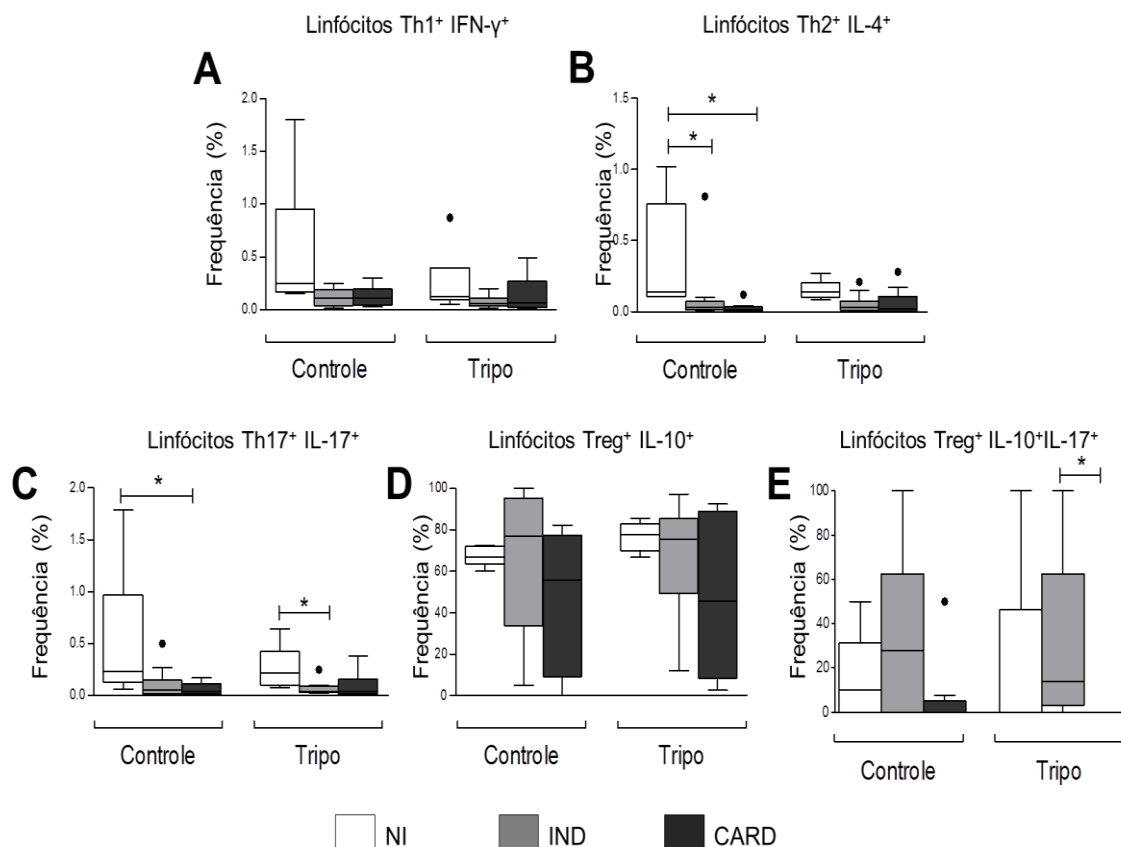


**Figura 14. Análise da frequência das subpopulações de linfócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Frequência de linfócitos Th1 (A), linfócitos Th2 (B) e linfócitos Th17 (C) e linfócitos Treg (D) foi avaliada em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* (Tripo), assim como a proporção de linfócitos Th1, Th2 Th17e Treg foi avaliada após estímulo *in vitro* em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) e em pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e Tripo. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

### 5.2.2 Avaliação da expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10 nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

A expressão de citocinas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode ser um fator importante para a diferenciação e caracterização de cada uma das subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg. Dentre essas citocinas destacam-se IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10 na diferenciação das subpopulações desses linfócitos respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que indivíduos NI possuem maior frequência de linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> quando comparado aos grupos IND e CARD em cultura controle (Figura 15B). Também foi possível observar maior frequência de linfócitos Th17 IL-17<sup>+</sup> em indivíduos NI quando comparados a pacientes CARD e IND em cultura controle e após estímulo *in vitro* com Tripo, respectivamente (Figura 15C). A frequência de linfócitos Treg que co-expressam IL-10<sup>+</sup> e IL-17<sup>+</sup> está significativamente aumentada no grupo IND quando comparados ao grupo CARD após estímulo Tripo (Figura 15E). Diferenças significativas não foram observadas em linfócitos Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Figura 15A) e em linfócitos Treg IL-10<sup>+</sup> (Figura 15D).

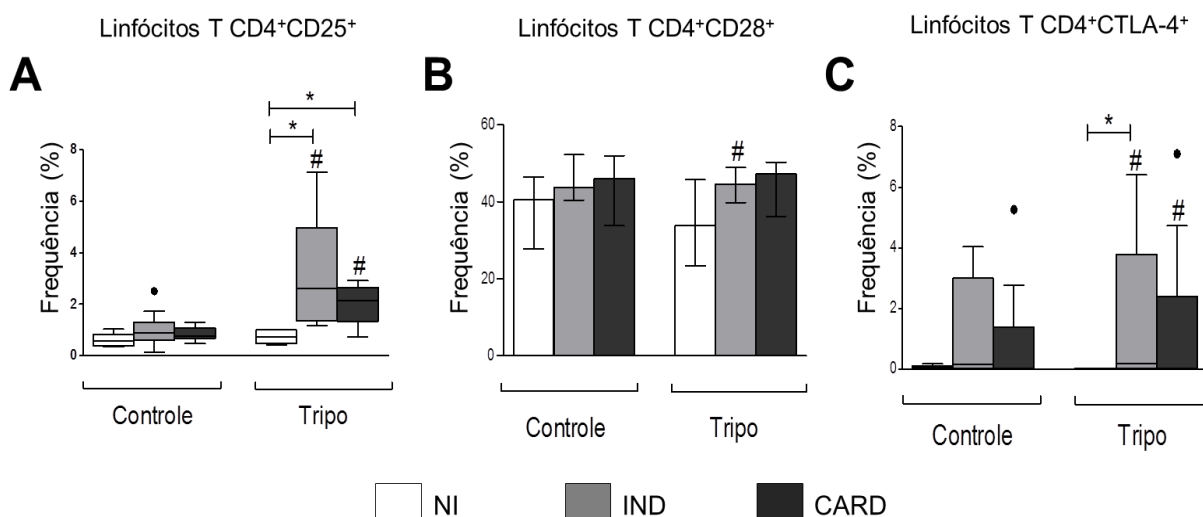


**Figura 15. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, Th2, Th17 e Treg que expressam as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10, respectivamente, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Frequência de linfócitos Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (A), linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> (B), linfócitos Th17 IL-17<sup>+</sup> (C), linfócitos Treg IL-10<sup>+</sup> (D) e linfócitos Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (E) foi avaliada após estímulo *in vitro* em indivíduos não infectados (NI, n=6) e em pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND, n=10) e cardíaca (CARD, n=9) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

### 5.2.3 Avaliação das moléculas de ativação CD25, CD28 e CTLA-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais

Em relação à expressão de CD25 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais, foi observado maior expressão nos grupos IND e CARD quando comparados a indivíduos NI na cultura controle e após estímulo com Triplo (Figura 16A). Além disso, pacientes que apresentam a forma clínica IND possuem maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> em Triplo quando comparados à cultura controle (Figura 16B). Em relação à frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, observamos que com estímulo com Triplo aumentou significativamente a frequência dessas

células em IND e CARD comparadas ao controle (Figura 16C). Nessa condição, observou-se também aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> no grupo IND quando comparados a NI (Figura 16C).



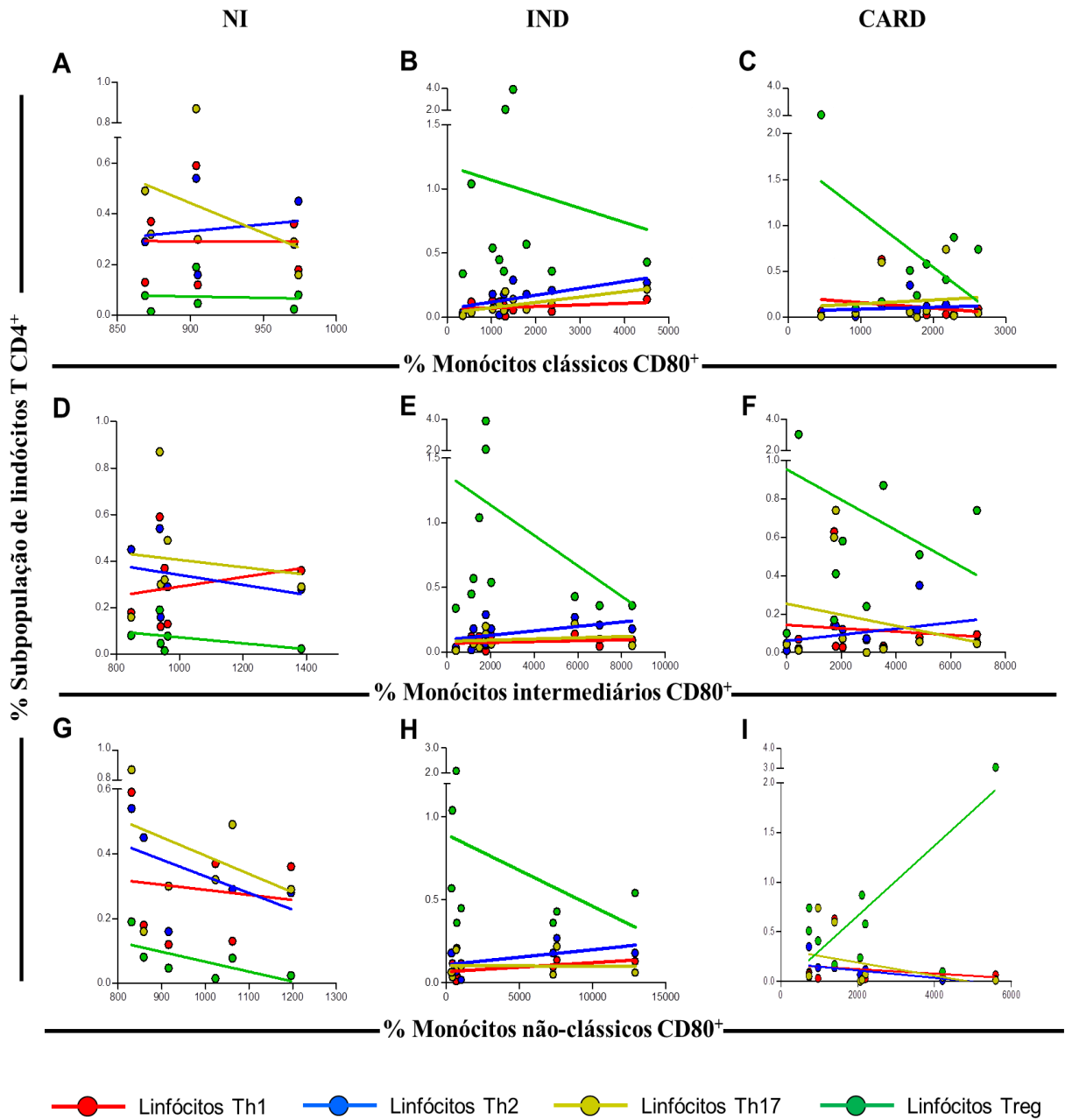
**Figura 16. Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais que expressam moléculas de ativação CD25, CD28 e CTLA-4 nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Frequência de linfócitos totais CD25<sup>+</sup> (A), linfócitos totais CD28<sup>+</sup> (B) e linfócitos totais CTLA-4<sup>+</sup> (C) foi avaliada após estímulo *in vitro* em indivíduos não infectados (NI, *n*=6) e em pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND, *n*=10) e cardíaca (CARD, *n*=9) da doença de Chagas. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças significativas (*p*<0,05) entre os grupos estão representadas por linhas e asteriscos (\*). O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e Tripo. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

### 5.3. Associação das subpopulações de monócitos CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup> no direcionamento das subpopulação de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg

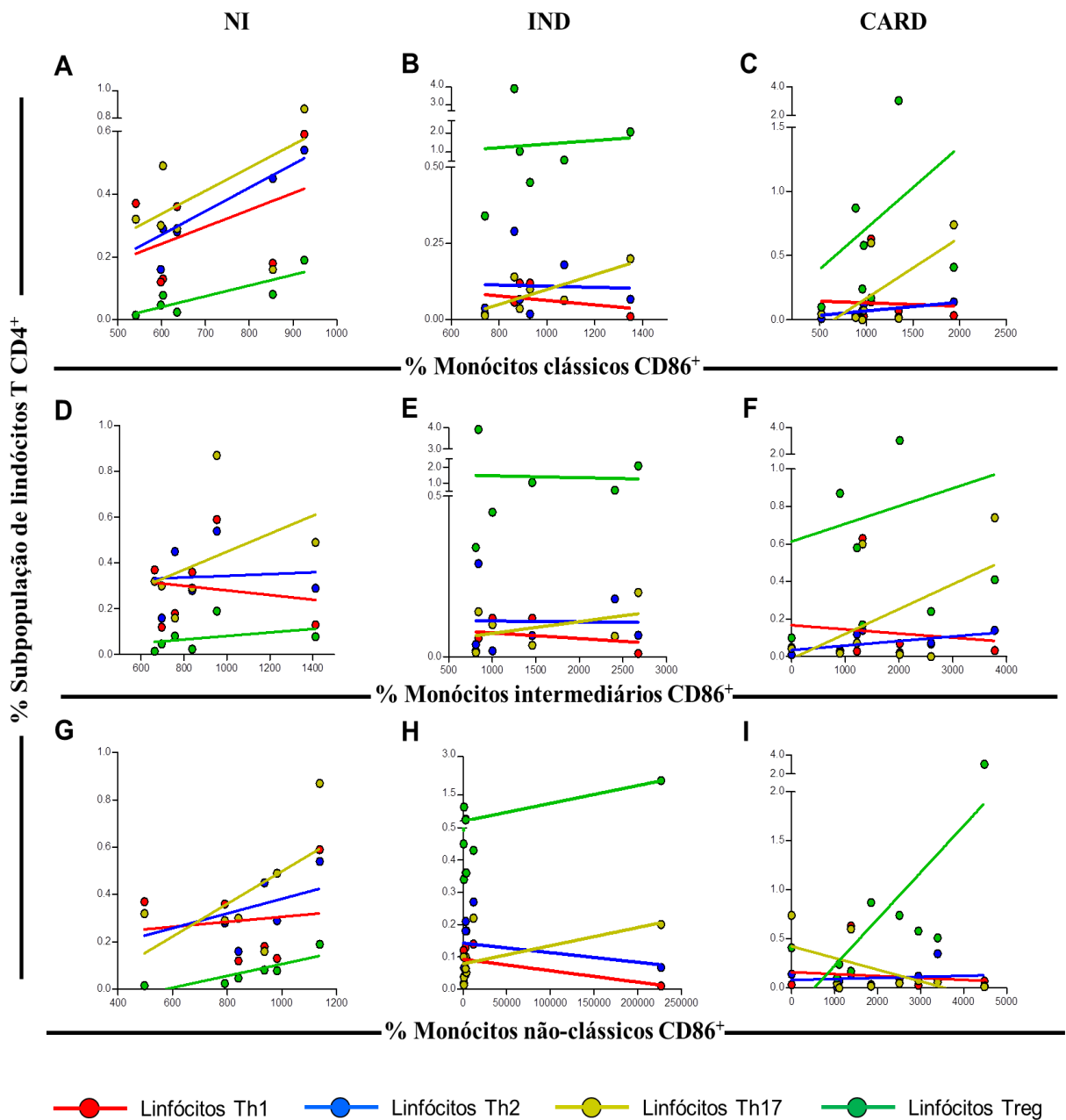
Através da análise de regressão linear foi observada uma associação significativa dos monócitos clássicos CD80<sup>+</sup> com os linfócitos Th2 ( $R^2=0,4233$ , *p*<0.05) e Th17 ( $R^2=0,5126$ , *p*<0.05) no grupo IND (Figura 17B). Observamos também associação significativa de monócitos não-clássicos CD80<sup>+</sup> com os linfócitos Treg ( $R^2=0,4238$ , *p*<0.05) no grupo CARD (Figura 17I).

Nossos resultados demonstraram uma associação significativa dos monócitos clássicos CD86<sup>+</sup> com os linfócitos Th2 ( $R^2=0,7583$ , *p*<0.05) e Treg ( $R^2=0,7124$ , *p*<0.05) no grupo NI (Figura 18A). Também observou-se associação significativa de monócitos não-clássicos

CD86<sup>+</sup> com os linfócitos Treg nos grupos NI ( $R^2=0,7257$ ,  $p<0.05$ ) IND ( $R^2=0,8450$ ,  $p<0.05$ ) e CARD ( $R^2=0,5341$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 18G-I).



**Figura 17. Regressão linear das subpopulações de monócitos CD80<sup>+</sup> e os linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg**  
 Os grupos avaliados foram não infectado (NI,  $n=6$ ), indeterminado (IND,  $n=10$ ) e cardíaco (CARD,  $n=9$ ).  
 Regressão linear entre monócitos clássicos CD80<sup>+</sup> e subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em indivíduos NI (A, D e G), IND (B, E e H) e CARD (C, F e I).

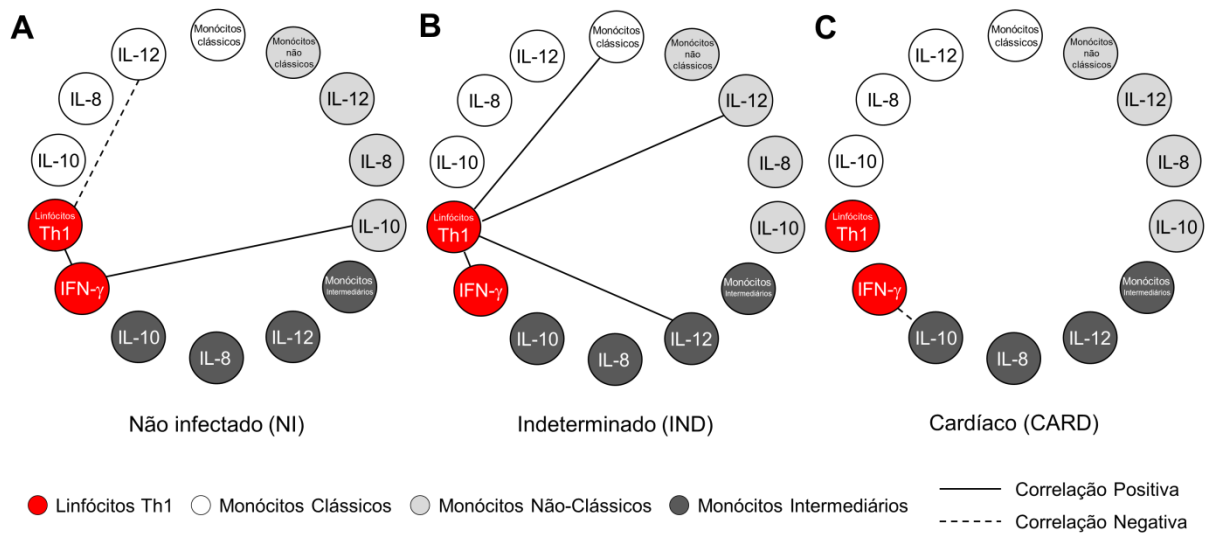


**Figura 18. Regressão linear das subpopulações de monócitos CD86<sup>+</sup> e os linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg**  
 Os grupos avaliados foram não infectado (NI,  $n=6$ ), indeterminado (IND,  $n=10$ ) e cardíaco (CARD,  $n=9$ ).  
 Regressão linear entre monócitos clássicos CD86<sup>+</sup> e subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em indivíduos NI (A, D e G), IND (B, E e H) e CARD (C, F e I).

#### **5.4. Correlação das subpopulações de monócitos e linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg através da expressão de citocinas**

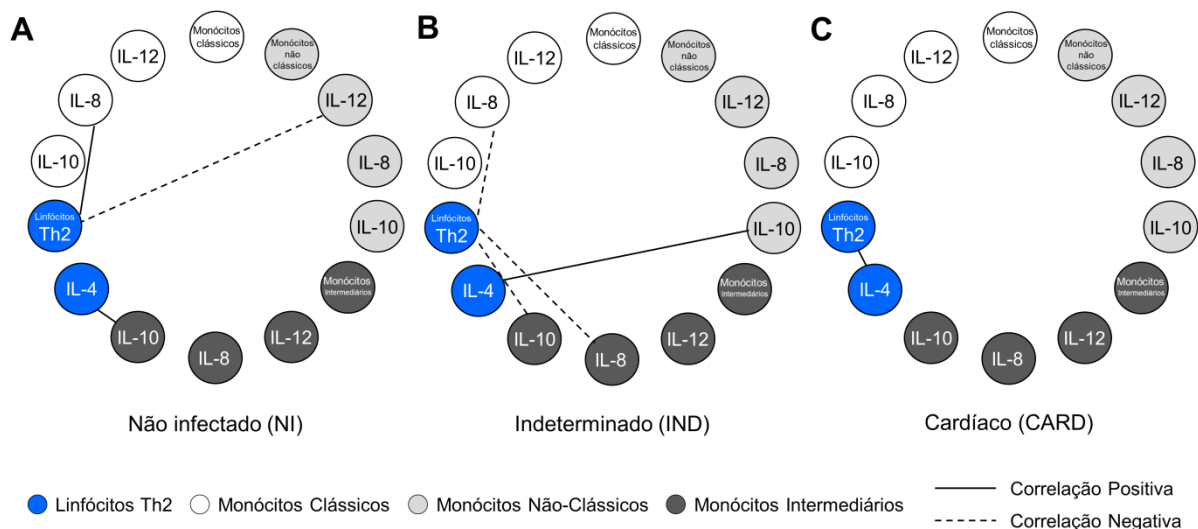
Após a análise de associação entre as subpopulações de monócitos e linfócitos, nosso próximo passo foi verificar a correlação existente entre as citocinas IL-12, IL-10 e IL-8 expressas pelas subpopulações de monócitos e a frequência de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg e a expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e a co-expressão de IL-10 IL-17 pelos linfócitos, respectivamente, em indivíduos NI, IND e CARD.

Através da análise de correlação entre as subpopulações de monócitos e os linfócitos Th1, foi observada uma correlação significativa negativa entre linfócitos Th1 e monócitos clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $\rho=-0,8857$ ,  $p<0.05$ ) e positiva entre linfócitos Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e monócitos não-clássicos IL-10<sup>+</sup> ( $r=0,8117$ ,  $p<0.05$ ) e linfócitos Th1 ( $r=0,8407$ ,  $p<0.05$ ) no grupo NI (Figura 19A). Os resultados também demonstraram correlação significativa positiva entre linfócitos Th1 e monócitos clássicos ( $r=0,6565$ ,  $p<0.05$ ), monócitos não-clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=0,6770$ ,  $p<0.05$ ), monócitos intermediários IL-12<sup>+</sup> ( $r=0,7139$ ,  $p<0.05$ ) e linfócitos Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $r=0,8024$ ,  $p<0.05$ ), respectivamente no grupo IND (Figura 19B). No grupo CARD observou-se correlação significativa negativa entre linfócitos Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e monócitos intermediários IL-10<sup>+</sup> ( $r=-0,7604$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 19C).



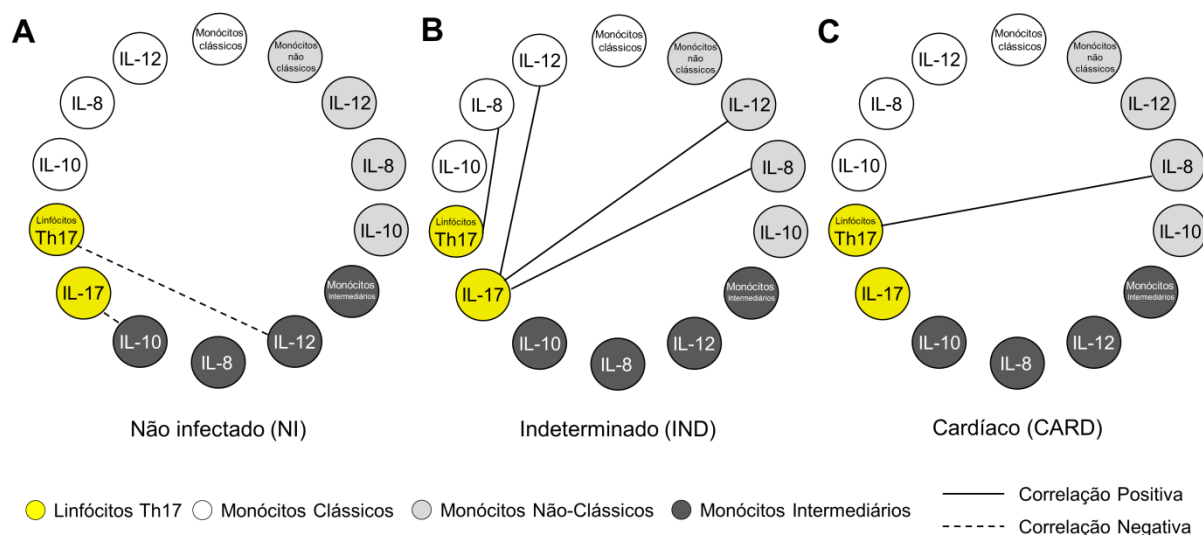
**Figura 19. Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th1<sup>+</sup> e Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup>.** Correlação entre frequência de linfócitos Th1<sup>+</sup> e Th1 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> com monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup> em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) (A), pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) (B) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) (C) da doença de Chagas. As linhas contínuas representam correlações positivas ( $r>0,63$ ) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ( $r>-0,63$ ). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p<0,05$ ).

Nossos resultados demonstraram uma correlação significativa negativa entre linfócitos Th2 e monócitos não-clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,8286$ ), e positiva com monócitos clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=0,8857$ ,  $p<0,05$ ) e correlação significativa positiva entre os linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> e monócitos intermediários IL-10<sup>+</sup> ( $r=0,8986$ ,  $p<0,05$ ) no grupo NI (Figura 20A) Observou-se também correlação negativa entre os linfócitos Th2 e os monócitos clássicos IL-10<sup>+</sup> ( $r=-0,7547$ ,  $p<0,05$ ), monócitos clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=-0,6442$ ,  $p<0,05$ ), monócitos intermediários IL-8<sup>+</sup> ( $r=-0,6542$ ,  $p<0,05$ ), e monócitos intermediários IL-10<sup>+</sup> ( $r=-0,8137$ ,  $p<0,05$ ), respectivamente e uma correlação positiva entre linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> e monócitos não-clássicos IL-10<sup>+</sup> ( $r=0,6626$ ,  $p<0,05$ ) no grupo IND (Figura 20B). No grupo CARD foi possível observar correlação positiva entre os linfócitos Th2 e linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> ( $r=0,8824$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 20C).



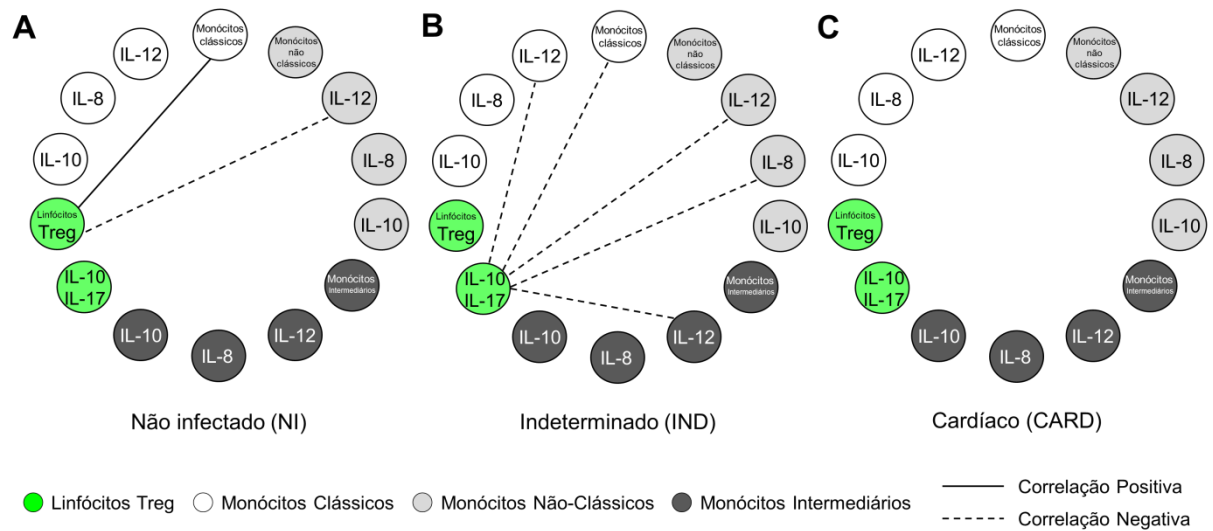
**Figura 20. Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th2 e Th2 IL-4<sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup>.** Correlação entre frequência de linfócitos Th2<sup>+</sup> e Th2 IL-4<sup>+</sup> com monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup> em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) (A), pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) (B) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) (C) da doença de Chagas. As linhas contínuas representam correlações positivas ( $r>0,63$ ) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ( $r>-0,63$ ). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p<0,05$ ).

Os resultados demonstraram uma correlação significativa negativa entre linfócitos Th17 e monócitos intermediários IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,8286$ ,  $p<0,05$ ) e entre os linfócitos Th17 IL-17<sup>+</sup> com monócitos intermediários IL-10<sup>+</sup> ( $r=-0,8286$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 21A) no grupo NI (Figura 22A). Também observou-se correlação positiva significativa entre linfócitos Th17 e os monócitos clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=0,7781$ ,  $p<0,05$ ) e entre os linfócitos Th17 IL-17<sup>+</sup> e os monócitos clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=0,7077$ ,  $p<0,05$ ), monócitos não-clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=0,6831$ ,  $p<0,05$ ) e monócitos não-clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=0,8797$ ,  $p<0,05$ ), respectivamente no grupo IND (Figura 21B). No grupo CARD foi possível observar correlação positiva e entre linfócitos Th17 e os monócitos não-clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=0,8833$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 21C).



**Figura 21. Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Th17 e Th17 IL-17<sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup>.** Correlação entre frequência de linfócitos Th17<sup>+</sup> e Th2 IL-17<sup>+</sup> com monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup> em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) (A), pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) (B) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) (C) da doença de Chagas. As linhas contínuas representam correlações positivas ( $r>0,63$ ) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ( $r>-0,63$ ). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p<0,05$ ).

Nossos resultados demonstraram correlação significativa negativa entre linfócitos Treg e monócitos não-clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,8286$ ,  $p<0,05$ ) e positiva com monócitos clássicos totais ( $r=0,8857$ ,  $p<0,05$ ) no grupo NI (Figura 22A). Foi possível também observar correlação negativa entre os linfócitos Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e os monócitos clássicos ( $r=-0,6707$ ,  $p<0,05$ ), monócitos clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,7840$ ,  $p<0,05$ ), monócitos não-clássicos IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,6729$ ,  $p<0,05$ ), monócitos não-clássicos IL-8<sup>+</sup> ( $r=-0,7276$ ,  $p<0,05$ ) e monócitos intermediários IL-12<sup>+</sup> ( $r=-0,6667$ ,  $p<0,05$ ), respectivamente, no grupo IND (Figura 22B). Contudo diferenças significativas não foram observadas entre os linfócitos Treg e os monócitos no grupo CARD (Figura 22C).



**Figura 22. Análise de correlação entre a frequência de linfócitos Treg e Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> com as subpopulações de monócitos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup>. Correlação entre frequência de linfócitos Treg e Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> com monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos IL-12<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> e IL-8<sup>+</sup> em indivíduos não infectados (NI,  $n=6$ ) (A), pacientes que apresentam as formas clínicas indeterminada (IND,  $n=10$ ) (B) e cardíaca (CARD,  $n=9$ ) (C) da doença de Chagas. As linhas contínuas representam correlações positivas ( $r>0,63$ ) e as linhas tracejadas representam correlações negativas ( $r>0,63$ ). Todas correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p<0,05$ ).**

## **6 DISCUSSÃO**

---

A heterogeneidade das manifestações clínicas na doença de Chagas crônica é, até hoje, um dos pontos a ser desvendados pela ciência. Ainda não se sabe a causa de alguns indivíduos infectados pelo *T. cruzi* desenvolvem alterações cardíacas e/ou digestivas graves, enquanto outros não manifestam sinais ou sintomas relacionados à patologia. Atualmente sabe-se que a polaridade encontrada entre as formas clínicas indeterminada e cardíaca possuem como ponto chave os mecanismos envolvidos na imunorregulação (de Araújo *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2015; Chaves *et al.*, 2016). Pacientes com a forma clínica IND apresentam a capacidade de controlar a replicação do parasito através da ativação de mecanismos inflamatórios, como linfócitos Th1 e citocinas pro-inflamatórias desde a fase aguda da infecção. Entretanto, esses pacientes também possuem a capacidade de limitar o desenvolvimento da doença através da ativação de fatores imunorregulatórios, como a produção de citocinas anti-inflamatórias, possuindo assim uma resposta imune modulada (Basso, 2013; Andrade *et al.*, 2014). Por outro lado, pacientes com a forma clínica CARD conseguem controlar a multiplicação do parasito, porém não desenvolvem mecanismos imunorregulatórios capazes de controlar a ação das células efetoras, que continuam na produção exacerbada de citocinas e outras moléculas pro-inflamatórias levando ao acometimento tecidual e favorecendo assim a formação de uma inflamação persistente (Gomes *et al.*, 2003; Cunha Neto *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Frade *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2015).

Como a doença não possui um tratamento eficaz durante a fase crônica, muitos indivíduos assintomáticos podem progredir para formas mais graves da morbidade, podendo até levar a morte do paciente (Andrade, 2000; Guedes *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2015). Dessa forma, o desafio da fisiopatologia na doença de Chagas é encontrar um biomarcador imunológico de evolução clínica durante a fase crônica da patologia que seja capaz de prever a progressão da doença em pacientes assintomáticos ou que apresentam estágio inicial de acometimento cardíaco, permitindo assim a identificação de pacientes que deverão ser acompanhados mais intensamente, evitando a evolução da doença.

Dentro desse contexto, há evidências convincentes de que os monócitos e os linfócitos através da expressão e secreção de suas moléculas estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Souza *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2013, Nogueira *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos que controlam o estabelecimento de redes entre essas células e moléculas não estão completamente compreendidos.

Dada a importância dos monócitos e linfócitos T nos processos imunorreguladores e seu potencial como alvo para o controle da patologia induzida pela inflamação, estudamos o papel dos monócitos e sua associação com as diferentes subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

(Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígenos da forma tripomastigota do *T. cruzi*, nos pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas.

Os resultados obtidos através do presente estudo mostraram menor frequência de monócitos clássicos em pacientes IND e CARD quando comparados a indivíduos NI. Essa subpopulação de monócitos apresenta alta capacidade fagocítica quando comparado aos monócitos intermediários e não-clássicos (Thaler *et al.*, 2016) e sua redução em pacientes chagásicos sugere estar relacionada à diminuição da parasitemia encontrada na fase crônica da doença.

Os receptores tipo-Toll (TLR) são cruciais no reconhecimento de estruturas conservadas em microrganismos, como os PAMPs (Takeda *et al.*, 2003). Na doença de Chagas, TLR-2 foi relacionado com a iniciação da resposta imune através do reconhecimento de moléculas de mucinas ligadas por âncora de GPI (Gravina *et al.*, 2013) e TLR-4 com o reconhecimento da âncora de glicoinositolfosfolipídio (GIPLs), presente na membrada de parasitos em diferentes formas evolutivas (Rodrigues *et al.*, 2012). Enquanto que os motivos de CpG não metilados presentes no genoma de *T. cruzi* foram identificados pelos receptores TLR-9 (Bartholomeu *et al.*, 2008; Gravina *et al.*, 2013). Os receptores TLR induzem a ativação de NF- $\kappa$ B e dessa forma, a produção de citocinas pro-inflamatórias (Rodrigues *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2003). Assim, os TLRs são de grande importância para o reconhecimento do parasito e na definição do perfil de citocinas produzidas em resposta ao microrganismo (Mendes da Silva *et al.*, 2016). Apesar da quantidade de estudos relacionados com os receptores TLRs na doença de Chagas, a maioria deles são em modelos experimentais e expressos em monócitos totais. (Oliveira *et al.*, 2004, Schmitz *et al.*, 2009; Poncini *et al.*, 2010, Gravina *et al.*, 2013).

Os nossos resultados demonstraram maior expressão de TLR-2 em monócitos clássicos e intermediários no grupo NI em cultura tripo quando comparado a controle. O aumento da expressão desse receptor sugere que esses monócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* aumentaram a capacidade de reconhecimento antigênico, contribuindo com produção de citocinas pro-inflamatórias, assim como para a ativação da imunidade adaptativa. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas de TLR-4 nas subpopulações de monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. De fato, Gomes e colaboradores (2012) observaram que monócitos de pacientes com doença de Chagas apresentavam menor expressão de receptores TLR-2 e TLR-4 na presença do *T. cruzi*, portanto a modulação das principais moléculas de superfície celular relacionadas com o reconhecimento antigênico está também associada com uma elevada produção de citocinas inflamatórias quanto reguladoras.

Assim, embora estes pacientes apresentem produção de citocinas efetoras importantes para a eliminação do parasito, eles também mostram uma resposta controlada. Dentro desse contexto, Mendes da Silva e colaboradores (2016) observaram associação de TLR-2 e TLR-4 na produção de citocinas pro-inflamatórias em pacientes CARD, enquanto pacientes assintomáticos produzem predominantemente IL-10 e TGF- $\beta$ . Assim, é possível observar que esses receptores são de extrema importância para ativação dos monócitos em pacientes chagásicos e podem contribuir para o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença.

O receptor TLR-9, assim como outros receptores que reconhecem ácido nucléicos (TLR-3 e TLR-7) estão presentes na membrana dos endossomos e possuem um papel importante durante a infecção por protozoários, incluindo o *T. cruzi* (Akira & Takeda, 2004; Bartholomeu *et al.*, 2008). Nossos dados demonstraram a menor expressão de TLR-9 em monócitos intermediários no grupo CARD quando comparado ao grupo NI. De fato, TLR-2 e TLR-9 cooperam no controle da replicação parasitária e TLR-9 tem um papel primário na indução MyD88 dependente da síntese de IL-12 / IFN- $\gamma$  durante a infecção experimental com *T. cruzi* (Bafica *et al.*, 2006). Esse resultado sugere que esses monócitos parecem estar relacionados com a regulação da resposta imune em pacientes CARD.

Além de reconhecer antígenos do *T. cruzi*, que é essencial no processo inicial de reconhecimento e apresentação de antígenos, os monócitos são cruciais no direcionamento da resposta imune específica, fornecendo sinais co-estimuladores para outras células através da produção de citocinas e expressão de moléculas capazes de gerar o segundo sinal de ativação (Gomes *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2012). Assim, as moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 são de extrema importância nesse processo e podem promover a diferenciação das diferentes subpopulações de linfócitos (Soares *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que enquanto CD86 apresenta uma expressão abundante, CD80 não se encontra presente em células apresentadoras de antígeno quiescentes (Hathcock *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que CD86 possui maior afinidade por CTLA-4 que por CD28 (Linsley *et al.*, 1994). Demonstramos um aumento significativo da expressão de CD80 em monócitos clássicos no grupo CARD quando comparado ao grupo NI após estimulação com antígeno de *T. cruzi*. Esses resultados corroboram com achados presentes na literatura que descreveram um aumento da frequência de monócitos CD80<sup>+</sup> em indivíduos NI, IND e CARD após exposição pelo *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2007). Soares e colaboradores (2016) também observaram que após estímulo com antígeno citoplasmático e antígeno flagelar de *T. cruzi*, houve um aumento da expressão de CD80 em monócitos totais em

indivíduos NI, IND e CARD quando comparado ao ensaio *ex vivo*. Diante disso, a maior expressão de CD80 pelos monócitos clássicos em pacientes CARD sugere que essa molécula co-estimulatória pode estar relacionada com a ativação de linfócitos, levando a um possível direcionamento para o perfil Th1 e contribuindo para o ambiente inflamatório observado nesses pacientes. Por outro lado, observamos maior expressão da molécula co-estimuladora CD86 em monócitos intermediários e não-clássicos no grupo IND quando comparado ao grupo NI. Durante a fase crônica da doença de Chagas, a presença de *T. cruzi* vivo modula a expressão de moléculas de ativação, co-estimuladoras e de adesão, especificamente MHC de classe II, em monócitos de pacientes com IND (Gomes *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que a expressão CD86 em monócitos intermediários e não-clássicos no grupo IND esteja relacionada à geração de uma resposta imune regulada/modulada, visto que CD86 possui maior afinidade por CTLA-4 presente nos linfócitos, contribuindo para menor ativação de células T e consequentemente modulação da resposta imune.

Alterações na expressão destas moléculas co-estimuladoras induzidas pelo parasito podem estar associadas a uma resposta regulada versus uma resposta exacerbada em pacientes indeterminados e cardíacos, respectivamente. Isto é evidenciado pelos dados sobre a expressão de citocinas após exposição *in vitro* de células destes indivíduos ao parasito. Dentre essas citocinas, IL-12 está relacionada com a ativação de uma resposta mediada por linfócitos do tipo Th1 e IL-10 contribui para a inibição da produção de IL-12 pelos monócitos, linfócitos e células dendríticas, levando à regulação da resposta imune (Gomes *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram um aumento da frequência de monócitos intermediários e não-clássicos IL-12<sup>+</sup> no grupo IND quando comparado ao grupo NI em cultura controle. Entretanto, após estímulo, observou-se uma redução da expressão dessa citocina nessas subpopulações em pacientes IND. Esse resultado sugere que pacientes IND são capazes de montar uma resposta inflamatória através da produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-12, pelos monócitos. Entretanto, após estímulo com *T. cruzi*, a resposta inflamatória parece ser regulada através da diminuição da expressão de IL-12 pelos monócitos intermediários e não-clássicos em pacientes assintomáticos, impedindo assim a progressão da inflamação. A correlação positiva entre IL-12 e linfócitos Th1 e linfócitos Th17 e negativa entre IL-12 e linfócitos Treg nesses pacientes reforça ainda mais essa afirmação. Adicionalmente, observamos menor expressão de IL-10 em monócitos intermediário e não-clássicos no grupo CARD após estímulo, acompanhado por uma correlação negativa entre IL-10 e IFN- $\gamma$  nos linfócitos Th1.

Souza e colaboradores (2004) mostraram que monócitos de pacientes CARD induziam resposta inflamatória através da expressão de TNF- $\alpha$ . Outros trabalhos demonstram que a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes CARD leva à perda da regulação da resposta imune e contribui para a manutenção da patologia (Gomes *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2016). Dessa forma, podemos constatar que essas citocinas pro-inflamatórias são cruciais para a manutenção do ambiente inflamatório. Entretanto, a redução da expressão de citocinas anti-inflamatórias em pacientes CARD, como observado pelo presente estudo, pode contribuir para a perda da regulação da resposta imune e dessa forma com a progressão da doença. Esse resultado corrobora com o trabalho de Gomes e colaboradores (2005) que demonstrou redução de IL-10 em pacientes CARD quando comparado a indivíduos IND e NI. Diante disso, pacientes com alterações cardíacas graves apresentam um desequilíbrio entre a produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, possuindo alta expressão de citocinas inflamatórias e baixas de citocinas reguladoras, como IL-10, conforme também descrevemos neste estudo. Pacientes CARD também apresentam um desequilíbrio entre a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, indicando um processo inflamatório descontrolado que agrava a cardiopatia (D'avila *et al.*, 2009).

Como foi visto, os monócitos são células apresentadoras de antígeno cruciais para o reconhecimento do microrganismo, assim como para a ativação subsequente da imunidade adquirida, podendo promover a diferenciação dos linfócitos em Th1, Th2, Th17 e Treg, sendo que cada um apresenta características fenotípicas e funções distintas. A partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho foi possível observar maior frequência de linfócitos Th1 em indivíduos NI, quando comparados a pacientes IND e CARD em cultura controle e em cultura com estímulo *in vitro* de antígenos de *T. cruzi*. Muito se sabe a respeito do papel dos linfócitos Th1 na doença de Chagas (Gomes *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2014, Bonney *et al.*, 2015). Essa subpopulação celular inicia e participa das reações imunes mediadas por células através da ativação eficiente de macrófagos para controlar a replicação do parasito durante a fase aguda da doença (Teixeira *et al.*, 2012; Bonney *et al.*, 2015) e aumentar o processo inflamatório durante a fase crônica (Bonney *et al.*, 2015) principalmente em pacientes que apresentam a forma clínica CARD (Gomes *et al.*, 2005). Contudo, a elevada frequência dessa subpopulação de linfócitos encontrada em indivíduos NI quando comparado aos pacientes com doença de Chagas parece refletir uma condição fisiológica, pois esses pacientes apresentam correlação negativa entre IL-12 e Linfócitos Th1 e correlação positiva entre IL-10 e IFN- $\gamma$ , correlações essas que são perdidas em situações patológicas como é observado nos pacientes com a forma clínica CARD.

Também foi possível observar uma maior frequência de linfócitos Th2 e Th17 em indivíduos NI quando comparado a pacientes chagásicos. No contexto da doença de Chagas, a subpopulação celular Th2 está envolvida na formação de um ambiente modulador através da sua relação com a produção de citocinas anti-inflamatórias, assim como os linfócitos Th17 parecem também possuir uma papel protetor (Magalhaes *et al.*, 2013; Bonney *et al.*, 2015). Além disso, observa-se nesses indivíduos proporções iguais de todas as subpopulações de linfócitos T após estímulo *in vitro* pelo Tripo, o que sugere que indivíduos NI respondem aos antígenos miogênicos presentes no *T. cruzi* pela primeira vez de maneira igual, situação diferente quando comparado aos pacientes que apresentam constantemente contato com o *T. cruzi*, mesmo que em baixas concentrações. Também demonstramos que pacientes IND apresentaram uma proporção maior de linfócitos Treg, Th17 e Th2 quando comparados a pacientes CARD. O aumento dessas subpopulações celulares em pacientes assintomáticos pode ser um dos mecanismos que o sistema imune do hospedeiro desenvolve para reduzir a inflamação e dessa forma limitar a progressão da doença.

As células T reguladoras possuem a capacidade de restringir as respostas inflamatórias contribuindo para a regulação do sistema imune (Mengel *et al.*, 2016). Na doença de Chagas existe ainda um número restrito de trabalhos que abordem a atuação dessas células. De Araújo e colaboradores (2012) relacionaram os parâmetros clínicos dos indivíduos chagásicos com a frequência de células T reguladoras e observaram correlação positiva entre a fração de ejeção ventricular esquerda (LVEF) e a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>, e correlação negativa entre diâmetro diastólico ventricular esquerdo (LVDD) e a frequência dessa população de linfócitos T, sugerindo que a presença dessas células pode estar relacionada à melhora na função cardíaca. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram maior frequência de células Treg em pacientes chagásicos quando comparados a indivíduos NI, assim como foi observado um aumento dessa subpopulação celular em pacientes IND e CARD após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*.

Nogueira e colaboradores (2014) avaliaram a expressão de genes associados com as funções das células T reguladoras e observaram uma maior expressão de mRNA de FOXP3 em tecido cardíaco de camundongos com CCC quando comparados a tecido cardíaco de camundongos não infectados. Esses dados inferem que com a infecção pelo parasito, o sistema imunológico do hospedeiro tende a controlar a inflamação através de mecanismos imunossupressores, como por exemplo, através do aumento das células T reguladoras. Nosso grupo, também mostrou que a presença de células Treg no tecido cardíaco de pacientes com doença de Chagas estava associada aos vasos sanguíneos e não ao processo inflamatório, o

que sugere que essas células podem estar envolvidas no recrutamento de células efetoras para o coração (De Araújo *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, observamos nesse trabalho que monócitos clássicos CD86<sup>+</sup> estão associados com a ativação de linfócitos Th2 e Treg nos indivíduos NI e monócitos não-clássicos CD86<sup>+</sup> estão associados com linfócitos Treg nos pacientes IND e CARD. Por outro lado, monócitos clássicos CD80<sup>+</sup> estão associados com linfócitos Th2 e Th17 nos pacientes IND, e monócitos não clássicos CD80<sup>+</sup> com Treg nos pacientes CARD. Esses dados podem sugerir a migração preferencial de certas subpopulações celulares durante o processo inflamatório e conseqüentemente a tentativa de regular a resposta imune induzida pelo parasito que pode ser ou não bem sucedida como ocorre nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Dessa forma, a presença de *T. cruzi* aumenta a expressão de IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-10 por células de pacientes com a forma clínica IND da doença. Esta observação é ainda suportada por estudos anteriores que demonstraram que os linfócitos T de memória circulante produzem IFN- $\gamma$  e IL-10 em resposta à estimulação com antígenos de *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Fiuza *et al.*, 2009; De Araújo *et al.*, 2011). Recentemente, foi demonstrado que a IL-17 é necessária para a proteção do hospedeiro contra a infecção por *T. cruzi* na fase aguda, uma vez que a IL-17 controla a resistência à infecção experimental pelo *T. Cruzi*, regula a diferenciação de células Th1, a produção e controle de citocinas e quimiocinas e a miocardite induzida pelo parasito, regulando o influxo de células inflamatórias para o tecido cardíaco (Guedes *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013; Bonney *et al.*, 2015).

As citocinas liberadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> também são importantes em caracterizar as diferentes subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg como IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 e IL-10 respectivamente. Demonstramos uma maior frequência de linfócitos Th2 IL-4<sup>+</sup> e Th17 IL-17<sup>+</sup> em indivíduos NI quando comparados a pacientes infectados. Esses resultados corroboram com os de Magalhães e colaboradores (2013) que demonstraram uma menor frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th17 e da citocina IL-17 em pacientes CARD quando comparados a indivíduos NI. Curiosamente, o aumento da frequência de células Treg co-expressando IL-10<sup>+</sup> e IL-17<sup>+</sup> em pacientes IND em relação a pacientes CARD após estímulo *in vitro* com antígeno de *T.cruzi* parece reforçar esse achado. Vitelli-Avelar e colaboradores (2008) e De Araújo e colaboradores (2011) observaram um aumento da frequência de linfócitos Treg no sangue periférico de pacientes IND, assim como a expressão aumentada de IL-10 nessas células. Sendo assim, os linfócitos Treg parecem ser essenciais para a imunorregulação e formação de um ambiente regulado em pacientes assintomáticos.

Magalhães e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes com a forma clínica IND também possuíam maior frequência de linfócitos totais IL-17<sup>+</sup>, inserindo a IL-17 com uma função cardíaca competente nesses pacientes, e capaz de prevenir o dano cardíaco na fase crônica da doença de Chagas. De Araújo e colaboradores (2012) demonstraram percentual elevado de células Treg expressando IL-17 nos pacientes com a forma clínica IND, sugerindo o envolvimento dessas células na produção de IL-17 e, conseqüentemente, na modulação da resposta imune induzida pelo parasito. Assim, o aumento da expressão de linfócitos Treg IL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> em pacientes assintomáticos sugere que a atuação dessas duas citocinas simultaneamente pode ser uma forma desses pacientes em regular o sistema imunológico para evitar a evolução da doença e o aparecimento de danos teciduais. Nossos resultados demonstraram ainda maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> em pacientes chagásicos quando comparados a indivíduos NI após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*. Esses dados sugerem que pacientes infectados possuem maior quantidade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com capacidade de proliferação, dessa forma atuam de forma efetora desencadeando a formação de um ambiente inflamatório, como é visto nos pacientes chagásicos quando comparados a indivíduos NI. A molécula de ativação CD25 é uma subunidade do receptor IL-2R expressa principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, efetores e de memória (Bolkun *et al.*, 2016), que se ligam à citocina IL-2 de forma autócrina, iniciando a expansão clonal.

Outro ponto importante é a ativação/regulação dos linfócitos no que se refere a resposta imune do hospedeiro. Os ligantes CD28 e CTLA-4 presentes nos linfócitos são cruciais para determinar a ativação e a regulação dessas células. CD28 direciona a ativação dos linfócitos quando ligado a molécula co-estimuladora CD80/86 de monócitos, enquanto a CTLA-4 ligado as mesmas moléculas direciona a inibição da resposta celular linfocitária (Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2007). Contudo, Pentcheva-Hoang e colaboradores (2004) demonstraram que CD86 é o principal ligante de CTLA4, enquanto CD80 é o principal ligante para CD28 durante a sinapse imunológica, corroborando com nossos resultados onde células dos pacientes IND tem expressão aumentada de CD86 e CTLA4, enquanto células de pacientes CARD expressam CD80 e CD28 após estímulo. Aliado a isso, linfócitos T ativados também podem apresentar redução da expressão de CD28 e ao aumento de CTLA-4, tornando essas células ativas menos responsivas através de um mecanismo de feedback negativo (Souza *et al.*, 2007).

Finalmente, nossos dados mostraram uma forte associação entre as subpopulações de monócitos que expressam CD86 com linfócitos Treg em todos os grupos avaliados. Sugerimos, então, que expressão de CD86 em qualquer subpopulação de monócito pode

contribuir com a ativação de linfócitos Treg preferencialmente. De fato, pacientes IND apresentaram maior expressão de CD86, o que pode suportar o aumento de linfócitos Treg que observamos nesses pacientes. Em contrapartida, pacientes CARD tiveram a expressão de CD80 aumentada em monócitos e estes apresentaram forte associação a linfócitos Treg apenas no grupo CARD. Conforme demonstramos, pacientes IND e CARD possuem aumento de linfócitos Treg em comparação a NI. No entanto, sugerimos que pacientes CARD têm a ativação de Treg através da interação alternativa com CD80 de monócitos, enquanto pacientes IND e NI tem a ativação de linfócitos Treg via interação com CD86. Peng Gu e colaboradores (2012) demonstraram que CD86 aumenta a função supressora de linfócitos Treg. Diante disso, sugerimos que a ativação de linfócitos Treg induzida por CD80 nos pacientes CARD parece não possuir uma função supressora, sendo assim, ineficiente em contribuir para a resposta inflamatória exacerbada e incontida nesses pacientes.

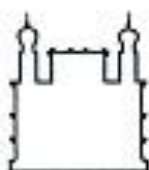
Portanto, a interação parasito-hospedeiro parece induzir um equilíbrio entre citocinas inflamatórias e reguladoras em pacientes IND, mas não nos pacientes CARD. Nossos resultados sugerem que moléculas co-estimuladoras diferentes podem ser um importante mecanismo para o estabelecimento de respostas patogênicas versus protetoras em pacientes infectados com *T. cruzi*. As correlações entre os níveis de citocinas, especificamente o equilíbrio fino entre Th1/Th17/Th2 e as moléculas co-estimuladoras e a evolução da doença cardíaca podem favorecer maior conhecimento sobre a fisiopatologia da doença de Chagas e contribuir para o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle da morbidade crônica de pacientes chagásicos no futuro.

## **7 CONCLUSÃO**

---

O presente trabalho demonstra pela primeira vez a caracterização das subpopulações de monócitos em pacientes com a doença de Chagas e, além disso, a sua associação com as diferentes subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg. Esses resultados sugerem que os monócitos CD86<sup>+</sup> direcionam preferencialmente uma resposta Treg independente do grupo avaliado, apresentando em maior abundância em pacientes IND, favorecendo a formação de um ambiente mais regulado e limitando o desenvolvimento da doença nesses pacientes. Em contrapartida, pacientes CARD além de direcionarem uma resposta mediada por linfócitos do tipo Th1, apresentam ativação das células Treg através da interação alternativa com CD80 de monócitos, sugerindo essa interação ser ineficiente em regular a resposta imune, contribuindo para a formação de uma resposta inflamatória incontida como é observado nesses pacientes.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



**CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2012 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS**

**Protocolo CEP - CPqRR nº: 15/2011**

**Projeto de Pesquisa:** *Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas*.

**Pesquisadora Responsável:** Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

**Instituição Realizadora:** Centro de Pesquisa René Rachou

Após submissão e análise criteriosa das pendências emitidas no parecer emitido em 27 de setembro de 2011, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação das alterações no projeto de pesquisa proposto.

**Situação: APROVADO.**

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios parciais e final.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2012.



  
João Carlos Pinho Dias  
Coordenador do CEP/SH-CPqRR

Anexo B – Planilha com os anticorpos utilizados no presente trabalho.

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular

<b>Marcador</b>	<b>Clone</b>	<b>Marca</b>
CD14	63D3	Biolegend, CA.
CD16	3G8	BD, USA
CD80	16-10A1	Biolegend, CA.
CD86	2331	BD, USA
TLR-2	TL2.1	eBioscience, CA
TLR-4	HTA125	Biolegend, CA
TLR-9	eB72-1665	BD, USA
HLA-DR	G46-6	BD, USA
CD4	RPA	BD, USA
CD25	M-A251	BD, USA
CD28	CD28.2	BD, USA
CTLA-4	BNI3	BD, USA
FOXP3	PCH101	eBioscience
GATA-3	291106	R&D Systems
ROR- $\gamma$ t	Q21-559	BD, USA
Tbet	525803	R&D Systems
IL-17A	BL168	Biolegend, CA
IL-12	2-4E6	BD, USA
IFN- $\gamma$	4S.B3	Biolegend
IL-4	8D4-8	BD, USA
IL-10	JES3-19F1	BD, USA
IL-8	E8N1	Biolegend

## **9 REFERÊNCIAS**

---

Abel LCJ, Ferreira LRP, Navarro IC, Baron MA, Kalil J, Gazzinelli RT, Rizzo LV Cunha-Neto E. Induction of IL-12 Production in Human Peripheral Monocytes by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like Glycoproteins and Potentiated by IFN- $\gamma$  and CD40-CD40L Interactions. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*. 1-7. 2014.

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 148: 32–46. 2007.

Akira S & Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 4: 499-511. 2004.

Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol*. 70(4): 467-77. 2001.

Álvares JM, Fonseca R, Silva HB, Marinho CRF, Bortoluci KR, Sardinha LR, Epiphanyo S, Lima MRI. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. *Mediators of Inflammation*. 1-9. 2014.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8 (7): 1-10. 2014.

Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena DJ, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental Parasitology*. 100(4): 269–275. 2002.

Andrade ZA. *Patologia da Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p-201. 2000.

Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Gironès N, Gea S. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Parasitol Res*. 737-324. 2012.

Ayo CM, Dalalio MMO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EA, Jarduli LR, Alves HV, Sell AM. Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes. *BioMed Research International*. 1-13. 2013.

Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cell function. *J. Immunol*. 169:6210-6217. 2002.

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 177(6): 3515-3519. 2006.

Barreto MP. Epidemiologia. In Brener Z, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 89-151. 1979.

Barreto-deAlbuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, Carvalho-Pinto CE de, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, de Meis J. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from na old infection? *PLOS neglected Tropical Diseases*. 2015.

Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, Sirois C, Kasperkovitz P, Knetter CF, Lien E, Latz E, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 181(2): 1333-1344. 2008.

Basso, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med*. 3(1): 1-10. 2013.

Bogliolo, L. Anatomie causes of cardiac insufficiency in chronic chagasic cardiopathy (myocarditis) studied in comparison to anatomic causes of cardiac insufficiency in other cardiopathies. *Arq Bras Cardiol*. 29(5): 419-24. 1976.

Bołkun L, Rusak M, Eljaszewicz A, Pilz L, Radzikowska U, Lapuc' I, ŁukszaE a, Dałbrowska M, Bodzenta-Łukaszyk A, Kłoczko J, Moniuszko M. Enhanced pretreatment CD25 expression on peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cell predicts shortened survival in acute myeloid leukemia patients receiving induction chemotherapy. *Pharmacological Reports*. 68: 12–19. 2016.

Bonney KM, Taylor JM, Thorp EB, Epting CL, Engman DM. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitol Res*. 114(3): 1167–1178. 2015.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 114(2): 103-110. 1997.

Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in immunology*. 6(659): 1- 15. 2016.

Chagas, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1(2): 159-218. 1909.

Chaves AT, Gomes JAS, Fiuza JA, Carvalho AT, Ferreira KS, Fares RCG, Guimarães PHG, Fagundes SEM, Morato MJ, Fujiwara RT, Rocha MOC, Correa-Oliveira R. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. *BMC Infectious Diseases*. 16(191): 1-11. 2016.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*. 115: 5-13. 2010.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109(7): 856-862, 2014.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human

CD14<sup>dim</sup> Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*. 33(3): 375–386. 2010.

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1:252-8. 2009.

Dario MA, Rodrigues MS, Barros JHS, Xavier SCC, D'Andrea OS, Roque ALR, Jansen AM. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 9(477): 1-12. 2016.

D'Avila DA; Guesdes PMM; Castro AM; Gontijo ED; Chiari E; Galvao LMC; Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104: 100-105. 2009.

de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RCG, Ferreira KS, Nunes MCP, Keesen TS, Damasio MPS, Teixeira-Carvalho A, Gomes JAS. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 217(8): 768–777. 2012.

de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Gomes JAS, Sathler-Avelar R, Rocha MOC, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(5). 2011.

Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 79(4): 513-515. 1984.

Dias JCP, Ramos Jr, AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasusa MA, Coura JR, Torres RM, Melo JRC, Alemida EA, Oliveira Jr W, Silveira AC, Rezende JM, Pinto FS, Ferreira

AW, Rassi A, filho AAF, Sousa AS, Filho DC, Jansen AM, Andrade GMQ, Britto CFPC, Pinto AYN, Rassi Jr A, Campos DE, Abad-Franch F, Santos SE, Chiari E, Hasslocher-Moreno AM, Moreira EF, Marques DSO, Silva EL, Martin-Neto JÁ, Galvão LMC, Xavier SS, Valente SAS, Carvalho NB, Silva RA, Costa VM, Vivaldini SM, Oliveira SM, Valente VC, Lima MM, Alves RV. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. 25: 7-86. 2016.

Domingues CS, Hardoim DJ, Souza CSF, Cardoso FO, Mendes VG, Previtalli-Silva H, Abreu-Silva AL, Pelajo-Machado M, Costa SCG, Calabrese KS. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. Plos One. 1-18. 2015.

Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. Parasite Immunol. 36(8): 377–38. 2015.

Ferreira ER, Bonfim-Melo A, Mortara R, Bahia D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. Front. Immunol. 3(363): 1-6. 2012.

Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, Fares RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Cançado GG, Correa-Oliveira R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 3(9): 512. 2009.

Frade AF, Teixeira PC, Ianni BM, Pissetti CW, Saba B, Wang LHT, Kuramoto A, Nogueira LG, Buck P, Dias F, Giniaux H, Llored A, Alves S, Schmidt A, Donadi E, Marin-Neto JA, Hirata M, Sampaio M, Fragata A, Bocchi EA, Stolf NA, Fiorelli AI, Santos RHB, Rodrigues V, Pereira AC, Kalil J, Cunha-Neto E, Chevillard C. Polymorphism in the Alpha Cardiac Muscle Actin 1 Gene Is Associated to Susceptibility to Chronic Inflammatory Cardiomyopathy. Plos One. 8(12):1-16. 2013

Gaur P, Myles A, Misra R, Aggarwal A. Intermediate monocytes are increased in Enthesitis Related Arthritis a category of Juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Immunol. 2016.

Gomes JA, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar D, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos S, Martins-Filho OA. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. *Immunobiology*. 217(10): 1005-1016. 2012.

Gomes JAS, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 73(12):7960-7966. 2005.

Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli, G, Correa-Oliveira R. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*. 71(3):1185–1193. 2003.

Gomes JAS, Molica AM, Keesen TSL, Morato MJF, De Araújo FF, Fares RCG, Fiuza JÁ, Chaves AT, Pinheiro V, Nunes MCP, Correa-Oliveira R, Rocha MOC. Inflammatory Mediators From Monocytes Down-Regulate Cellular Proliferation And Enhance Cytokines Production In Patients With Polar Clinical Forms Of Chagas Disease. *Human Immunology*. 1-31. 2013.

Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*. 8(5): 1-10. 2013.

Guedes PMM, Veloso VM, Afonso LCC, Caliarí MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Matta MAV, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvão LMC, Bahia MT. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 130: 43–52. 2009.

Guedes PMM, Veloso VM, Mineo TWP, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, Nascimento MSL, Lana M, Chiari E, Galvão LMC, Bahia MT. Hematological alterations

during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21(2): 151-156. 2012.

Gu P, Gao JF, D'Souza CA, Kowalczyk A, Chou KY, Zhang L. Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells. Cell Mol Immunol. 9(2): 136-46. 2012

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo SC, Linsley P, Hodes RJ. Comparative Analysis of B7-1 and B7-2 Costimulatory Ligands: Expression and Function. The Journal of experimental Medicine. 180: 631-640. 1994.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert reviews in molecular medicine. 12(29): 1-23. 2010.

Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect., 12(7): 511-517. 2010.

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) Bind with Similar Avidities but Distinct Kinetics to CD28 and CTLA-4 Receptors. Immunity. 1: 793-801. 1994.

Macêdo V. Indeterminate Form of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(Suppl.I): 311-316, 1999.

Maga P, Mikolajczyk TP, Partyka L, Krzanowski M, Malinowski KP, Nizankowski R. Percutaneous Transluminal Angioplasty in Patients with Peripheral Arterial Disease Does Not Affect Circulating Monocyte Subpopulations. Biomed Res Int. 1-9. 2016.

Magalhães LMD, Viana A, Chiari E, Galvão LMC, Gollob KJ, Dutra WO. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. Plos Neglected Tropical diseases. 1-17.2015.

Magalhães LMD, Villani FNA, Nunes MCP, Gollob KJ, Rocha, MOC, Dutra WO. High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 207:661–665. 2013.

Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *The American Journal of Medicine*. 2015.

Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clin. Cardiol*. 2015.

Mathews JC. Valor de la Prueba de Esfuerzo Graduado (Ergometria) para Determinar la Capacidad Laboral del Cardiópata Chagásico Crónico, PhD Thesis, Universidad Nacional de Córdoba, 1973.

Melo AS, Lorena VMB, Braz SCM, Docenab C, Gomes YM. IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine*. 58(2):207–212. 2012.

Mendes da Silva LD, Gatto M, Miziara de Abreu Teodoro M, de Assis Golim M, Pelisson Nunes da Costa ÉA, Capel Tavares Carvalho F, Ramos Rodrigues D, Câmara Marques Pereira P, de Campos Soares ÂM, Calvi SA. Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease. *Scand J Immunol*. 2016.

Meneghelli UG. Clinical Treatment of the Digestive Form of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94: 341-342. 1999.

Mengel J, Cardillo F, Pontes-de-Carvalho L. Chronic Chagas'Disease: targeting the interleukin-2 axis and regulatory T cells in a condition for which there is no treatment. *Front.Microbiol*.7:675. 2016.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acessado em: 09 de agosto de 2016.

Moncayo A & Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104(Suppl I): 17-30. 2009.

Morrot A, Villar SR, González FB, Pérez AR. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? Front Microbiol. 7(704) 2016.

Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, 494 p. 2010.

Nogueira LG, Santos RHB, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA, Bocchi EA, Stolf NA, Kalil J, Cunha- Neto E. Myocardial Gene Expression of T-bet, GATA-3, Ror- $\gamma$ t, FoxP3, and Hallmark Cytokines in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: An Essentially Unopposed TH1-Type Response. Mediators of Inflammation. 1-9. 2014.

Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. Journal of the American College of Cardiology. 62(9): 767- 776. 2013.

Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonça-Previato L, Nobrega A, Bellio M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J Immunol. 173(9): 5688-5696. 2004.

Poncini CV, Giménez G, Pontillo CA, Alba-Soto CD, de Isola ELD, Piazzón I, Cappa SMG. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. Molecular Immunology. 47:1981–1988. 2010.

Prata A. Classificação da infecção chagásica no homem. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 23(2): 109-113. 1990.

Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 21: 401–413. 2004.

Rakebrandt N, Littringer K, Joller N. Regulatory T cells: balancing protection versus Pathology. *Swiss Medical Weekly*. 1-8. 2016.

Rezende JM, Moreira, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In Castro L P, Coelho LCV *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. 2004, p.325-392.

Rezende JM. The digestive tract in Chagas's disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 79: 97-106. 1984.

Ribeiro ALP, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature. Rev. Cardiol*. 9:576–589. 2012.

Ribeiro ALP, Rocha MO. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31: 301-314. 1998.

Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 5(4):727-743. 2007.

Rodrigues DBR, Reis MA, Romano A, Pereira SAL, Teixeira VPA, Junior ST, Rodrigues Jr V. In Situ Expression of *Clinical and Developmental Immunology*. 1-7. 2012.

Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res*. 2012.

Sangenis LHC, Saraiva RM, Geog I, Castro L, Lima VS, Roque ALR, Xavier SCC, Santos LC, Fernandes FA, Sarquis O, Lima MM, Costa AC, Bóia MN. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *Infectious Diseases*. 15(4): 1-12. 2015.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104(suppl I): 246-251, 2009.

Savino W, Villa-Verdea DMS, Mendes-da-Cruza DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MP, Bottasso O, Guiñazú N, Silva-Barbosa SD, Gea S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. 18 (2): 107-124, 2007.

Schmitz V, Svensjö E, Serra RR, Teixeira MM, Scharfstein J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. J Leukoc Biol. 85(6):1005-1014. 2009.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115 (1-2): 14-21, 2010.

Silveira AC. & Dias JCP. O controle da transmissão vetorial. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44(2): 52-63. 2011.

Soares AKA, Neves PAF, Melo Cavalcanti MGAM, Marinho SM, Júnior WO, Souza JR, Lorena VMB, Gomes YM. Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 is altered in CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> monocytes from patients with Chagas disease following induction by *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Rev Soc Bras Med Trop. 49(5):632-636. 2016.

Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. Immunology. 124(1): 13–22. 2008.

Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CAS, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infection and immunity. 72(9): 5283-5291. 2004.

Souza PEA, Rocha, MOC, Menezes CAS, Coelho JS, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' Disease. Infection and immunity 75(4): 1886–1894. 2007.

- Stahl P, Ruppert V, Schwarz RT, Meyer T. *Trypanosoma cruzi* Evades the Protective Role of Interferon-Gamma-Signaling in Parasite-Infected Cells. *Plos One*. 9(10): 1-14. 2014.
- Stanaway JD, Roth G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Glob Heart*. 10(3): 139-144. 2015.
- Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 7(317): 1-8. 2014.
- Takeda K, Kaisho T, Shizuo A. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 21: 335-376. 2003
- Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi* induced heart disease (Chagas disease). *Prog. Cardiovasc. Dis*. 51:524-539. 2009.
- Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*. 24(3): 592-630. 2011.
- Thaler B, Hohensinner PJ, Krychtiuk KA, Matzneller P, Koller L, Brekalo M, Maurer G, Huber K, Zeitlinger M, Jilma B, Wojta J, Speidl WS. Differential in vivo activation of monocyte subsets during lowgrade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Nature*. 2016.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad SJ, Tostes Jr S, Moreira MCV, Filho GBF, Pena SDJ. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease - Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs. *American Journal of Pathology*. 156(5): 1885-1889. 2000.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol*. 68(5):516-25. 2008.

Wildgruber M, Czubba M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Hapfelmeier A, Glinzer A, Schiemann M, Zimmermann A, Eckstein HH, Berger H, Wohlgemuth WA, Meier R, Libby P, Zernecke A. Increased intermediate CD14<sup>++</sup>CD16<sup>++</sup> monocyte subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty. *Atherosclerosis*. 253: 128-134. 2016.

World Health Organization, WHO. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=en). Acessado em: 04 de julho de 2016.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *The American Society of Hematology*. 116(16): 74-80. 2016.