

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS MOLÉCULAS CD80 E CD86 EXPRESSAS POR
MONÓCITOS NA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E NO DIRECIONAMENTO DE
UM PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO/IMUNOMODULATÓRIO NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Bruna Fernandes Pinto

Belo Horizonte
Fevereiro / 2020

Bruna Fernandes Pinto

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS MOLÉCULAS CD80 E CD86 EXPRESSAS POR
MONÓCITOS NA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E NO DIRECIONAMENTO DE
UM PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO/IMUNOMODULATÓRIO NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva
Gomes Estanislau

Belo Horizonte
Fevereiro / 2020

043

Pinto, Bruna Fernandes.

Avaliação do papel das moléculas CD80 e CD86 expressas por monócitos na ativação dos linfócitos T CD4+ e no direcionamento de um perfil pró-inflamatório/imunomodulatório nas diferentes formas clínicas da doença de chagas [manuscrito] / Bruna Fernandes Pinto. - 2020.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Doença de Chagas. 3. Monócitos. 4. Antígeno B7-1. 5. Antígeno B7-2. 6. Linfócitos T CD4-Positivos. I. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

BRUNA FERNANDES PINTO

225/2020
entrada
2º/2016
2016752488

Às **treze horas** do dia **21 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS MOLÉCULAS CD80 E CD86 EXPRESSAS POR MONÓCITOS NA ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD4+ E NO DIRECIONAMENTO DE UM PERFIL PRO-INFLAMATÓRIO/IMUNOMODULATÓRIO NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dr. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau	UFMG	<i>Aprovada</i>
Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza	PUC Minas	<i>APROVADA</i>
Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	UFMG	<i>APROVADA</i>
Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo	UFMG	<i>Aprovada.</i>
Dra. Soraya Torres Gaze Jangola	Instituto René Rachou - FIOCRUZ	<i>APROVADA</i>

Pelas indicações, a candidata foi considerada: *Aprovada*
O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2020.**

Dr. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Orienta) *Jeptanislau*
Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza *Paulo*
Drª. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis *Reis*
Drª. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo *Ludmila R.P. Ferreira*
Drª. Soraya Torres Gaze Jangola *Soraya*

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Prof. Vanessa Pinho da Silva
Vanessa Pinho da Silva
Prof. Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular (ICB/UFMG)

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Morfologia

Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Dr^a. Nayara Ingrid de Medeiros

Me. Tereza Cristina Minto Fontes Cal

Me. Mayara Belchior Bezerra

Marina Rodrigues Alves Nazareth

Bruna Roque de Souza

Instituto René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – MG

Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira

Dr^a. Andréia Teixeira de Carvalho

Dr^a. Silvana Maria Eloi-Santos

Dr^a. Jacqueline Fiuza

Ambulatório Bias Fortes - Hospital das Clínicas (HC) – MG

Dr^a Maria do Carmo Pereira Nunes

Dr^a Silvana Araújo

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 na plataforma de citometria do Instituto René Rachou/IRR - FIOCRUZ-MG.

RECURSOS FINANCEIROS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

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). (Bolsa de doutorado)

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

*Aos meus pais que sempre me incentivaram para a realização dos meus ideais e a minha avó
Clóres, a minha eterna saudade.*

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. Tenham certeza que aonde vocês estiverem, sempre estarão em meu coração!

A minha avó Horandina pelo apoio e a minha querida avó 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 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. Muito obrigada por tudo!

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 5 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 nos aproximou bastante. Muito obrigada por estar ao meu lado nesses quase 5 anos de convivência me incentivando e me orientando. Sei que sempre poderei contar com você. E mais uma vez obrigada por ser o regente nesse grande sonho. Ainda teremos muitas publicações e conquistas juntas!

Aos nossos colaboradores Dr. Rodrigo por toda orientação, Dra. Walderez pelas contribuições e por me permitir usufruir do seu laboratório para a realização desse trabalho de extrema importância em minha vida e Dra. Andréa Teixeira por ser um exemplo de profissional Obrigada por todo carinho e belíssimas contribuições para o desenvolvimento do meu trabalho e da minha jornada científica.

As doutoras Silvana Maria Eloi, Maria do Carmo e Silvana Araújo por permitirem a realização das coletas de sangue dos pacientes e por todo apoio para o desenvolvimento do projeto.

A Dra. Jacqueline Fiuza pela realização das leituras dos tubos na plataforma de citometria da FIOCRUZ e por toda contribuição. Muito obrigada por todo apoio!

As minhas “filhotes” companheiras de trabalho e grandes amigas Tereza e Mayaraque sempre estiveram ao meu lado nessa jornada. May, obrigada por todo carinho e auxílio durante essa importante etapa da minha vida. Obrigada pelos lanchinhos quando virávamos as noites na UFMG. Tê, obrigada por toda paciência, por sempre me defender e pelas milhares de caronas. A vocês, minhas pequenas, obrigada pela compreensão comigo nos momentos de tristeza e cansaço. Obrigada por estarem comigo nos longos dias, noites e madrugadas para o desenvolvimento dos experimentos. Sem a ajuda de vocês essa tese não seria possível. A vocês, minhas meninas, a minha eterna amizade e carinho. Saibam que vocês sempre estarão em meu coração!

A minha “filhote” Nay, agradeço por dividir seus conhecimentos sobre Chagas comigo e pelas palavras que sempre me tranquilizavam. 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 ex-aluna de iniciação científica Isabela Naziazeno, que mesmo agora formada, sempre se importou comigo e propôs me ajudar no que fosse necessário. Muito obrigada pela oportunidade de passar meus conhecimentos para você e pelas boas risadas que demos no laboratório. Muito mais do que uma aluna, você se tornou uma grande amiga. Conte sempre comigo.

A minha querida aluna de iniciação científica Marina, obrigada por todas as tardes e noites juntas trabalhando no meu projeto de doutorado e em outros mais. Obrigada por me deixar participar um pouquinho da sua formação. Conte sempre comigo!

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 IRR pela dedicação e sábios ensinamentos que contribuíram para a formação do profissional que me tornei.

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

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

A minha amiga Katiene e familiares por todo apoio.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para essa mais nova conquista. A vocês 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

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta em 1909, mas continua sendo um sério problema de saúde pública e econômico em muitos países da América Latina, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. Durante a fase crônica da doença, os indivíduos podem ser classificados nas formas clínicas indeterminada (IND), caracterizada pela ausência de sintomas, ou cardíaca (CARD) quando as manifestações clínicas resultam em danos progressivos ao miocárdio. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas são ainda pouco compreendidos, entretanto, o estudo da resposta imune é crucial para determinar a evolução da doença. As moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 expressas por monócitos e suas subpopulações apresentam um papel fundamental na ativação de linfócitos, e dessa forma, da resposta imune adaptativa subsequente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em monócitos e suas subpopulações no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Os resultados demonstraram maior expressão de CD86 em todas as subpopulações de monócitos apenas em IND em comparação com o grupo NI. Após estimulação com *T. cruzi*, pacientes IND também apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ quando comparado aos indivíduos NI. Por análise de regressão linear observamos associação entre CD80 e CD28, e entre CD86 e CTLA-4, com uma alta proporção de células Treg em pacientes IND. Posteriormente, avaliamos o papel de CD80 e CD86 no direcionamento das subpopulações Th1, Th2, Th17, Treg através de um ensaio utilizando bloqueio para os receptores CD80 ou CD86 em cultura com PBMC de indivíduos NI, IND e CARD. Demonstramos redução na frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ em cultura anti-CD86 apenas no grupo IND. Além disso, Treg apresentou maior expressão de CTLA-4 quando comparado às outras subpopulações. Verificamos aumento na frequência de Th1 CD28⁺ na presença de anticorpo anti-CD86, assim como maior frequência de Th2 e Th17 no grupo CARD. Observamos que na presença de anti-CD80 ocorria aumento da frequência de linfócitos de Treg e Treg CTLA-4⁺, enquanto anti-CD86 reduzia a frequência dessas populações apenas no grupo IND. Em pacientes CARD, anti-CD80 leva à redução da frequência de linfócitos Treg e Treg CTLA-4⁺, e a presença de anti-CD86 leva ao aumento de Treg CTLA-4⁺. Verificamos que na presença de anti-CD86, CD80 pode estar relacionada com a expressão de CTLA-4 expressos por Th2 e Th17 e CD80 apresenta correlação negativa apenas com CTLA-4 em Treg do grupo IND. Finalmente, avaliamos atuação das moléculas CD80 e CD86 no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores. Observamos maior frequência de linfócitos CD8⁺ Treg CD28⁺ em pacientes CARD e de CD8⁺ Treg, CD8⁺ Treg IL-10⁺ e CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ no grupo IND. Observamos correlação negativa entre CD8⁺ Treg CD28⁺ com monócitos na cultura anti-CD80 e entre CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ com monócitos patrulhadores na cultura anti-CD86. Concluimos que os linfócitos Th2 e Th17 podem ser ativados através da interação entre os receptores CD80/CTLA-4 em pacientes assintomáticos e sugerimos que linfócitos Th1 são ativados por meio da interação entre os receptores CD80/CD28 em pacientes CARD. Além disso, propusemos que o receptor CD86 possa estar envolvido na imunorregulação pela sua associação com CTLA-4, sendo decisivo na ativação de linfócitos Treg apenas pacientes assintomáticos. Todavia, células Treg de pacientes CARD podem ser ativadas de forma alternativa, via interação entre os receptores CD80/CTLA-4. Assim, concluimos que CD86 é uma molécula chave na interação com CTLA-4 e ativação dos linfócitos reguladores principalmente em pacientes assintomáticos, podendo representar uma nova estratégia para controlar a inflamação e os danos teciduais em pacientes com doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, was discovered in 1909, but remains a serious public and economic health problem in many countries in Latin America, with approximately 8 million people infected worldwide. During the chronic phase of the disease, individuals can be classified as indeterminate clinical forms (IND), characterized by the absence of symptoms, or cardiac (CARD) when the clinical manifestations result in progressive damage to the cardiac tissue. The mechanisms underlying the development of severe forms of Chagas disease remain poorly understood, however, the study of the immune response is crucial to determine the evolution of the disease. CD80 and CD86 co-stimulatory molecules expressed by monocytes and their subsets induce lymphocyte activation, thereby triggering the subsequent adaptive immune response. The aim of this work was to evaluate the role of CD80 and CD86 co-stimulatory molecules in monocytes and their subsets in targeting the different CD4⁺ T lymphocytes subsets (Th1, Th2, Th17, Treg), after *in vitro* stimulation with *T. cruzi*, in the different clinical forms of Chagas disease. The results showed high CD86 expression in all monocyte subsets only in IND compared to the NI group. After *T. cruzi* stimulation, IND also showed high frequency of CD4⁺CTLA-4⁺ T lymphocytes when compared to NI individuals. By linear regression analysis we observed an association between CD80 and CD28, and between CD86 and CTLA-4, with a high proportion of Treg cells in IND patients. Next, we evaluated the role of CD80 and CD86 in targeting the Th1, Th2, Th17, Treg subsets through an assay using blockade for CD80 or CD86 in PBMC from NI, IND and CARD individuals. We demonstrated reduction in the frequency of CTLA-4⁺ Treg lymphocytes in anti-CD86 culture only in IND group. In addition, Treg showed higher expression of CTLA-4 when compared to other subsets. We found an increase of Th1 CD28⁺ frequency in the presence of anti-CD86 antibody, as well as a higher frequency of Th2 and Th17 in the CARD group. We observed that in the presence of anti-CD80 there was an increase in the Treg and Treg CTLA-4⁺ frequency, while anti-CD86 reduced the frequency of these populations only in the IND group. In CARD patients, anti-CD80 leads to a reduction of Treg and Treg CTLA-4⁺ frequency, and the presence of anti-CD86 leads to an increase in Treg CTLA-4⁺. We found that in the presence of anti-CD86, CD80 may be related to CTLA-4 expressed by Th2 and Th17, however CD80 presents a negative correlation only with the CTLA-4 by Treg cells of the IND group. Finally, we evaluate the role of CD80 and CD86 molecules in the development of the immune response mediated by T CD8⁺ and CD8⁺ regulatory T lymphocytes. We showed a higher frequency of CD8⁺Treg CD28⁺ in CARD patients and, CD8⁺Treg, CD8⁺Treg IL-10⁺ and CD8⁺Treg CTLA-4⁺ in the IND group. We observed a negative correlation between CD8⁺Treg CD28⁺ with monocytes in anti-CD80 culture and, between CD8⁺Treg CTLA-4⁺ with patrolling monocytes in anti-CD86 culture. We conclude that Th2 and Th17 lymphocytes can be activated through the interaction between CD80/CTLA-4 receptors in asymptomatic patients and we suggest that Th1 lymphocytes are activated through the interaction between CD80/CD28 in CARD patients. In addition, we proposed that the CD86 receptor may be involved in immunoregulation due to its association with CTLA-4, being decisive in the activation of Treg lymphocytes only in asymptomatic patients. However, Treg cells from CARD patients can be activated alternatively via interaction between CD80/CTLA-4 receptors. Therefore, we concluded that CD86 is a key molecule in the interaction with CTLA-4 and activation of regulatory lymphocytes, mainly in asymptomatic patients, and may represent a new strategy to control inflammation and tissue damage in patients with Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do ciclo da doença de Chagas	27
Figura 2. Associação dos mediadores expressos pelos monócitos/macrófagos no direcionamento dos diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T CD4 ⁺ (Th1, Th2, Th17 ou Treg).....	32
Figura 3. Desenho experimental.....	39
Figura 4. Análise representativa da porcentagem de receptores CD86 bloqueados após a utilização do anticorpo anti-CD86.....	44
Figura 5. Análise do perfil fenotípico dos monócitos do sangue periférico e suas subpopulações por citometria de fluxo	46
Figura 6. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T CD4 ⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo.....	47
Figura 7. Análise do perfil fenotípico das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ por citometria de fluxo.....	48
Figura 8. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T CD8 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ regulatórios do sangue periférico por citometria de fluxo.....	49
Figura 9. Análise da frequência dos monócitos totais e suas subpopulações.....	54
Figura 10. Expressão das moléculas de reconhecimento e ativação em monócitos totais e suas subpopulações.....	55
Figura 11. Expressão das moléculas co-estimuladoras em monócitos totais e suas subpopulações.....	57
Figura 12. Razão e proporção da expressão de CD80 e CD86 por monócitos após estimulação <i>in vitro</i> de antígenos de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 13. Expressão de citocinas por monócitos totais e suas subpopulações	59
Figura 14. Análise dos linfócitos T CD4 ⁺ e suas subpopulações	60

Figura 15. Frequência de citocinas pelas subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺	62
Figura 16. Análise dos marcadores de ativação em linfócitos T CD4 ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	66
Figura 17. Expressão de IFN-γ ⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th1 CD4 ⁺ Tbet ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	67
Figura 18. Expressão de IL-4 ⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th2 CD4 ⁺ GATA3 ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	68
Figura 19. Expressão de IL-17 ⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th17 CD4 ⁺ RORγT ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	69
Figura 20. Expressão de IL-10 ⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Treg CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	70
Figura 21. Proporção da frequência de linfócitos Treg CTLA-4 ⁺ e Th1 CD28 ⁺ após estimulação <i>in vitro</i> de antígenos de <i>T. cruzi</i> . em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	71
Figura 22. Análise da frequência dos marcadores de ativação nas subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ após estimulação <i>in vitro</i> de antígenos e <i>T. cruzi</i> em cultura PBMC, αCD80 e αCD86	72
Figura 23. Análise de correlação entre os monócitos e suas subpopulações com a expressão de CD28 e CTLA-4 pelas subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ após estimulação <i>in vitro</i> de antígenos de <i>T. cruzi</i> em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	74
Figura 24. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	76
Figura 25. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ após estimulação <i>in vitro</i> de antígenos de <i>T. cruzi</i> . em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	77
Figura 26. Análise dos marcadores de ativação em linfócitos T CD8 ⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	78
Figura 27. Expressão de IL-10 e dos marcadores de ativação em linfócitos CD8 ⁺ Treg em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.....	80

Figura 28. Resumo geral dos principais resultados encontrados na tese..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular e intracitoplasmáticos.....	42
Tabela 2. Análise de regressão linear e correlação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 por monócitos e suas subpopulações com CD28 e CTLA-4 e linfócitos Th1, Th2, Th17 and Treg.....	64
Tabela 3. Análise das correlações significativas entre monócitos e suas subpopulações com a expressão de CD28 e CTLA-4 por linfócitos T CD8 ⁺ e T CD8 ⁺ reguladores em cultura PBMC, αCD80 e αCD86.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – *Allophycocyanin* (Aloficocianina)
- α CD80 – Cultura com receptor anti-CD80
- α CD86 – Cultura com receptor anti-CD86
- BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)
- CARD – Forma clínica cardíaca
- CD – *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciação)
- CDG – Forma clínica cardiodigestiva
- DIG – Forma clínica digestiva
- ECG – Eletrocardiograma
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiaminotetracético)
- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FITC – *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
- FOXP3 – *Forkhead box P3*
- FSC – *Forward Scatter* (Tamanhocelular)
- GATA-3 – *GATA-binding protein-3*
- GIPL – *Glycoinositolphospholipid* (glicoinositolfosfolipídio)
- GPI – *Glycosylphosphatidylinositol* (glicosilfosfatidilinositol)
- HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno de leucócito humano)
- IFN- γ – Interferon gamma
- IgE – Imunoglobulina E
- IL – Interleucina
- IND – Forma clínica indeterminada
- iNOS – *Inducible Nitric Oxide Synthase* (Síntese de óxido nítrico induzida)
- IRR- Instituto René Rachou
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MHC-I – Complexo de histocompatibilidade de classe I
- MHC-II – Complexo de histocompatibilidade de classe II
- MIF – *Mean Intensity Fluorescence* (Intensidade média de fluorescência)
- MyD88 – *Myeloid differentiation primary response 88* (Fator de diferenciação mielóide 88)
- NI – Não-infectados
- NF- κ B – *Nuclear factor kappa B* (Factor nuclear kappa B)

NK – *Natural Killer* (Células Natural Killer)

NO – Óxido nítrico

PBMC – Peripheral blood mononuclear cell (Células mononucleares do sangue periférico)

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 – *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

PE-Cy7 – *Phycoerythrin cyanine 7* (Ficoeritrina cianina 7)

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

ROR- γ t – *Retinoid-related orphan receptor γ t*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SSC – *Side Scatter* (Granulosidade)

Tbet – *T-box expressed in T cells*

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

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

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

TNF- α – *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* (Brilhante violeta 421)

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

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Aspectos éticos	36
4.2 Caracterização da população de estudo	36
4.2.1 Critérios de inclusão	37
4.2.2 Critérios de exclusão	37
4.3. Desenho experimental	39
4.4 Preparação dos antígenos derivados da forma tripomastigota (TRIPO) do <i>T. cruzi</i>	39
4.5 Cultura de sangue total dos indivíduos envolvidos no estudo na presença ou ausência de antígenos solúveis de <i>T. cruzi</i>	40
4.6 Análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo	40
4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	42

4.8 Ensaio funcional com anticorpo anti-CD80 e anti-CD86.....	43
4.9 Aquisição e estratégia de análise dos dados	44
4.9.1 Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações monócitos	45
4.9.2 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos T CD4 ⁺ e suas subpopulações Th1, Th2, Treg e Th17	46
4.9.3 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos T CD8 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺ regulatórios	48
4.10 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS	51
5.1 CAPÍTULO 1	53
5.1.1 Pacientes com a doença de Chagas apresentam diferentes frequências das subpopulações de monócitos em culturas controle e estimuladas por <i>T. cruzi</i>	53
5.1.2 Monócitos de pacientes assintomáticos demonstraram menor expressão de TLR	54
5.1.3 Pacientes com doença de Chagas apresentam diferentes níveis de expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos	56
5.1.4 A expressão das moléculas CD80 e CD86 nas subpopulações de monócitos de pacientes com doença de Chagas é regulada após estimulação <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T. cruzi</i>	56
5.1.5 Monócitos totais de pacientes com a forma clínica indeterminada apresentaram maior expressão de CD86 quando comparado à CD80.....	57
5.1.6 Monócitos totais e clássicos de pacientes assintomáticos com doença de Chagas apresentaram equilíbrio entre a expressão de IL-12 e IL-10.....	58
5.1.7 A molécula CTLA-4 é regulada em linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes com a forma clínica IND da doença de Chagas	59

5.1.8 Redução na frequência de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e aumento de Treg é observada principalmente em pacientes IND	61
5.1.9 A molécula co-estimulatória CD86 pode induzir uma resposta imunomodulatória mediada por células Treg em pacientes assintomáticos	62
5.2 CAPÍTULO 2	65
5.2.1 Linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes assintomáticos apresentam maior expressão de CTLA-4 após estimulação in vitro com antígenos de <i>T. cruzi</i>	65
5.2.2 CD86 parece regular a expressão de CTLA-4 em linfócitos Treg de pacientes IND, enquanto CD80 regula a expressão de CD28 em Th1 de pacientes CARD.....	66
5.2.3 A proporção de linfócitos Treg CTLA-4 ⁺ em cultura αCD80 e αCD86 apresentam um padrão de expressão oposto em pacientes IND e CARD	70
5.2.4 Linfócitos Treg apresentam a maior expressão de CTLA-4 quando comparado às outras subpopulações de células T CD4 ⁺	71
5.2.5 Bloqueio do receptor CD86 correlaciona negativamente com a expressão de CTLA-4 em linfócitos Treg de pacientes assintomáticos	72
5.2.6 A presença do receptor CD86 em monócitos parece direcionar maior frequência de células Treg em pacientes IND.....	75
5.3 CAPÍTULO 3	78
5.3.1 Pacientes CARD apresentam maior frequência de linfócitos T CD8 CD28 ⁺	78
5.3.2 Pacientes com a forma clínica IND apresentam maior frequência de linfócitos CD8 ⁺ Treg, CD8 ⁺ Treg CTLA-4 ⁺ e CD8 ⁺ Treg IL-10 ⁺	79
5.3.3 Bloqueio de CD80 parece estar relacionado negativamente com CD28, assim como o bloqueio de CD86 relaciona-se negativamente com CTLA-4 em linfócitos T CD8 ⁺ Treg.....	81
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO.....	95

8 ANEXOS	97
Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética do IRR	98
Anexo B – Artigos	99
9 REFERÊNCIAS	101

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, 2015, 2020). O aumento da morbidade em regiões não endêmicas tem recebido grande atenção atualmente devido à migração de indivíduos infectados para áreas não endêmicas 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 (Prata, 1990). Entretanto, aproximadamente 30% dos indivíduos desenvolvem a cardiopatia chagásica crônica, 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; Frade *et al.*, 2013; Álvares *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015a).

Mesmo após 111 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).

O direcionamento da resposta imune, especialmente a associação entre a resposta imune inata/adaptativa, constitui um mecanismo importante para determinar a evolução da doença (Savino *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2016). As moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 presentes nos monócitos e suas subpopulações são de extrema importância em promover a ativação de células T CD4⁺ através da interação com os receptores CD28 e CTLA-4 e podem estar relacionadas com o direcionamento das suas diferentes subpopulações resultando em células efetoras dos tipos Th1, Th2, Th17 ou Treg (Teixeira *et al.*, 2011).

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 das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 na geração da resposta adaptativa induzida pelo *T. cruzi*, o presente trabalho traz um maior entendimento sobre a imunopatologia contribuindo para o esclarecimento do estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em monócitos e suas subpopulações no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*, nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a população de monócitos e suas subpopulações em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.
2. Avaliar o perfil funcional dos monócitos e suas subpopulações através da expressão dos seguintes marcadores: TLR-2, TLR-4, TLR-9, HLA-DR, CD80, CD86, IL-10 e IL-12, em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.
3. Caracterizar as subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg, através dos fatores de transcrição Tbet, GATA3, ROR γ T e FOXP3, respectivamente, em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.
4. Avaliar a expressão das moléculas CD25, CD28 e CTLA-4 nos linfócitos T CD4⁺ totais, assim como a expressão das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 pelos linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente, em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.
5. Avaliar o efeito do bloqueio de CD80 e CD86 nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*:
 - a frequência de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg, assim como a expressão das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10, respectivamente;

- a expressão das moléculas CD28 e CTLA-4 nos linfócitos totais e suas subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg;
- o papel das moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 em monócitos e suas subpopulações na ativação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e no direcionamento de um perfil pró-inflamatório/imunomodulatório;
- a frequência de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ regulatórios, assim como a expressão moléculas CD28 e CTLA-4 por essas células;
- o papel das moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 em monócitos e suas subpopulações na ativação dos linfócitos T CD8⁺ e dos linfócitos CD8⁺Treg.

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 111 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, 2020).

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada 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 10.000 óbitos por ano e mais de 25 milhões de indivíduos em risco de infecção (WHO, 2020).

Desde o início da década de 1990, as medidas mais eficazes para o controle da doença de Chagas na América Latina foram através de programas para combate da transmissão vetorial e triagem de bolsas de sangue (WHO, 2015; Dias *et al.*, 2016; Pérez-Molina & Molina, 2017). A Iniciativa Cone Sul (Iniciativa de Saúde do Cone Sul, INCOSUR) foi lançada em 1991 para eliminar o principal vetor, *Triatoma infestans*, e a transmissão por transfusão de sangue na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (Yamagata & Nakagawa, 2006; Rocha *et al.*, 2007; Silveira & Dias, 2011; Sangenis *et al.*, 2015). Essa iniciativa levou à redução da transmissão do *T. cruzi* e sua interrupção foi certificada no Uruguai (1997), Chile (1999), Argentina (2001), Brasil (2000) e Paraguai (2002) (Iniciativa de Salud del Cono Sur, 2005; WHO, 2015). Entretanto, apesar desses esforços para o combate da transmissão da doença em regiões endêmicas na América Latina 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, 2020).

A principal forma de transmissão da doença é através de insetos pertencentes à família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* (Deane *et al.*, 1984; WHO, 2015; Cardoso *et al.*, 2016) podendo pertecer aos três seguintes gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* (Pérez-Molina & Molina, 2017). A transmissão da doença para o homem inicia-se quando insetos vetores hematófagos, durante ou após o repasto sanguíneo, transmitem a forma tripomastigota, 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 sanguíneos, 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 metacíclicas, 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 (Deane *et al.*, 1984; Brener & Gazzinelli, 1997; Neves, 2010; Stahl *et al.*, 2014) (Figura 1).

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 (transmissão oral) (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 2.172 casos da doença de Chagas aguda no território nacional entre o período de 2008 e 2017 e aproximadamente 70% dos casos referia-se a transmissão oral (Ministério da Saúde, 2020).

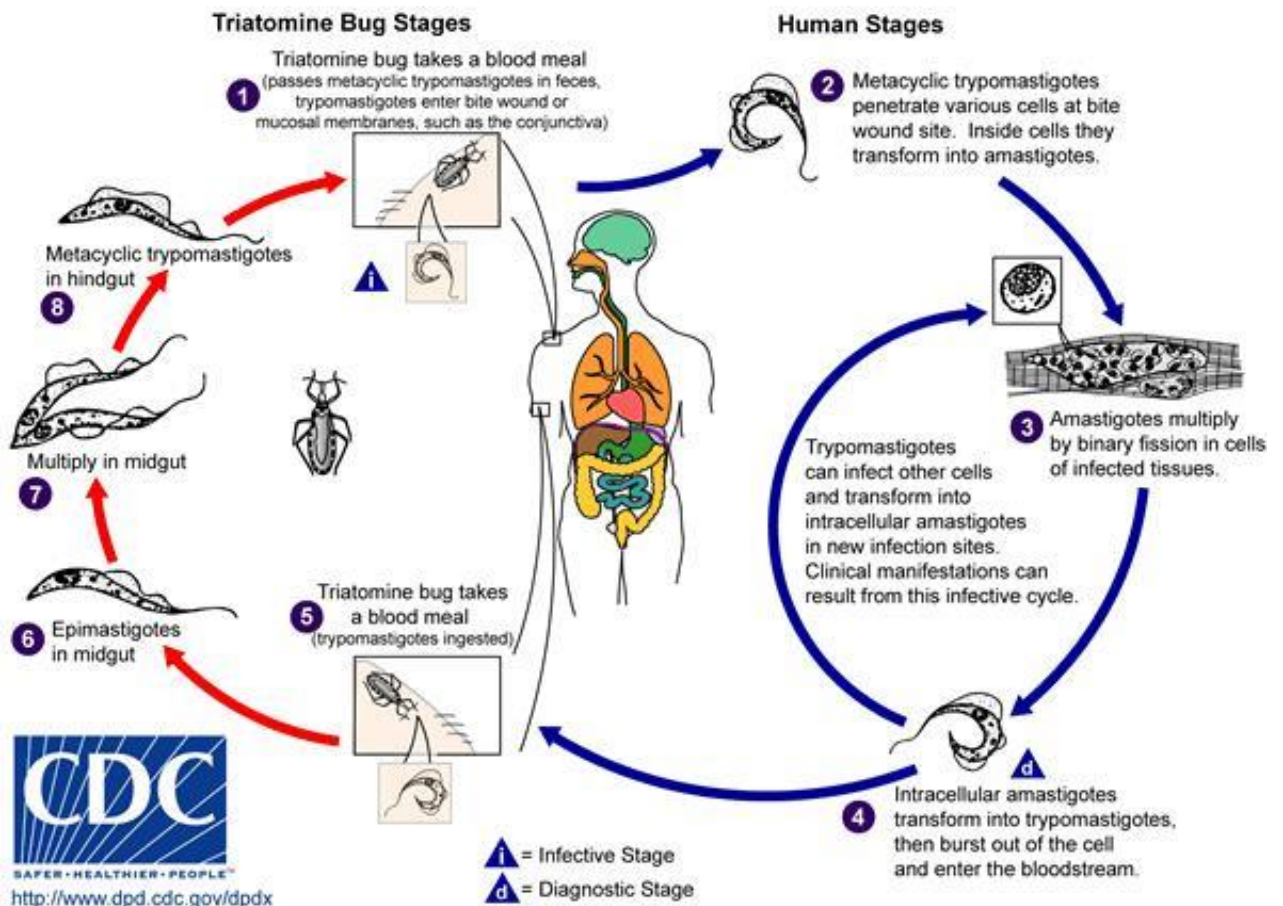


Figura 1. Representação do ciclo da doença de Chagas. Fonte: Centers for Disease Control – CDC, (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>). Acessado em: 31 de janeiro de 2020.

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 e pode durar entre um e dois meses. Nessa fase, a maioria dos casos é assintomática, ou oligo-sintomática, quando algumas manifestações clínicas são evidentes como febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia ou miocardite (Prata, 1990; Ribeiro *et al.*, 2012; Frade *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Steverding, 2014). Entretanto, em pacientes infectados pelo *T. cruzi* através da transmissão vetorial, é possível observar sinais clássicos da doença como o chagomade inoculação, sendo definido por um edema no local da infecção pelo triatomíneo, ou sinal de Romaña, 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 (Brenner & Gazzinelli., 1997; Ribeiro & Rocha, 1998; Marinho *et al.*, 1999; Ayo *et al.*, 2013), assim como pela morte do paciente devido a complicações graves (Steverding, 2014). Durante essa fase os tripomastigotas podem ser detectados por microscopia sanguínea.

A evolução ou regressão da carga parasitária pode ser monitorada através da Reação em Cadeia da Polimerase, que oferece uma avaliação qualitativa da carga parasitária do *T. cruzi* (Malik *et al.*, 2015b). A transição da fase aguda para a crônica é acompanhada por uma redução acentuada da parasitemia como resultado da resposta imune do hospedeiro. Nesta fase, o diagnóstico concentra-se na detecção de anticorpos séricos contra o parasito por meio dos testes sorológicos: hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ensaio de imunoabsorção enzimática (Malik *et al.*, 2015b).

Na fase crônica os pacientes podem apresentar diferentes manifestações clínicas (Laranja *et al.*, 1956; Prata, 1990; Ayo *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014; 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 (Prata, 1990). Entretanto, ao longo do tempo, indivíduos assintomáticos podem desenvolver alterações e evoluírem para uma forma clínica sintomática (Malik *et al.*, 2015b).

Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clínica cardíaca (CARD), podendo levar a danos progressivos no miocárdio (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). Essa forma clínica 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.*, 2015b). A falência cardíaca causada pela cardiopatia chagásica crônica 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.*, 2014).

A forma clínica digestiva (DIG) atinge aproximadamente 10% dos indivíduos infectados (Ayo *et al.*, 2013), sendo caracterizada por distúrbios gastrointestinais através da denervação parassimpática de gânglios intramurais que pode se agravar levando ao surgimento do megacólon e megaesôfago (Meneghelli, 1999; Stanaway & Roth, 2015; WHO, 2020). 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. As células Natural Killer (NK), células dendríticas e os monócitos/macrófagos são células do sistema imune inato que apresentam um importante papel no controle do parasito através da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Machado *et al.*, 2008; 2012). A interação dos monócitos com o *T. cruzi* é mediada por receptores de reconhecimento de padrão, como os receptores tipo Toll (TLR) principalmente TLR-2 e TLR-4 que desencadeiam a fagocitose do protozoário e sua internalização no fagolisossomo (Almeida & Gazzinelli, 2001; Junqueira *et al.*, 2010; Gravina *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014). O receptor TLR-9 presente na membrana dos endossomos também atua durante a infecção pelo *T. cruzi* (Akira & Takeda, 2004; Bartholomeu *et al.*, 2008). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e transmitem um sinal citoplasmático desencadeando o recrutamento da molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e posteriormente induz a ativação do *factor nuclear kappa B* (*NF-κB*) levando à síntese de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo controle da replicação do parasito (Machado *et al.*, 2012).

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 pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) 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/macrófagos formam uma população celular heterogênea apresentando distintas subpopulações (Mukherjee *et al.*, 2015; Thaler *et al.*, 2016). Monócitos provenientes de humanos podem ser caracterizados de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD14, um co-receptor de TLR-4 que medeia eventos de transdução de sinal induzidos por LPS (Cros *et al.*, 2010; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2017) e CD16, um receptor com afinidade pela porção Fc de anticorpos (Cros *et al.*, 2010; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2017), em três diferentes subpopulações: monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e monócitos patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) (Cros *et al.*, 2010; Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Antonelli *et al.*, 2014; Gaur *et al.*, 2016; Maga *et al.*, 2016; Thaler *et al.*, 2016; Wildgruber *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Os monócitos clássicos possuem alta capacidade de fagocitose e em condições normais correspondem aproximadamente 85-90% dos monócitos (Moniuszko *et al.*, 2008; Thaler *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Essa subpopulação é rapidamente recrutada nos sítios de inflamação possuindo um caráter pró-inflamatório (Serbina & Pamer 2006; Grad *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017). Os monócitos patrulhadores apresentam um perfil anti-inflamatório, possuem um comportamento de “patrulha” observado *in vivo* e realizam fagocitose mediada por FcR (Wong *et al.*, 2011; Thaler *et al.*, 2016; Grad *et al.*, 2017). Estudos moleculares demonstram que os monócitos inflamatórios apresentam um perfil transitório entre os monócitos clássicos e patrulhadores e possuem alta expressão do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (Wong *et al.*, 2011). Contudo, o perfil fenotípico-funcional das três subpopulações de monócitos ainda é controverso sendo que seus papéis ainda não são compreendidos na doença de Chagas.

Os monócitos/macrófagos são essenciais para ativação dos linfócitos e dessa forma da resposta adaptativa subsequente. Os macrófagos reconhecem e processam o *T. cruzi* para apresentarem fragmentos de peptídeos através do MHC-II (HLA-DR) para o linfócito T CD4⁺ via receptor de células T (TCR). Foi demonstrado que a interação do TCR com o antígeno peptídico ligado ao MHC-II não é capaz de induzir a ativação das células T e o envolvimento de moléculas co-estimuladoras é crucial para a ativação e proliferação linfocitária (Jenkins & Schwartz, 1987; Van Gool *et al.*, 1996; Croft & Dubey *et al.*, 1997). Assim, a apresentação antigênica induz a expressão de moléculas co-estimuladoras nos monócitos CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) a interagirem com os receptores CD28 e CTLA-4 (CD152) presentes na superfície

celular dos linfócitos T (Linsley & Ledbetter, 1993; Linsley *et al.*, 1994). Enquanto a interação com CD28 induz a ativação das células T levando à proliferação celular e a síntese de citocinas (Linsley & Ledbetter, 1993; Souza *et al.*, 2007), a ligação com CTLA-4 direciona a inibição da resposta celular linfocitária (Zheng *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2012). CD86 é expresso constitutivamente em baixos níveis nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) apresentando maior afinidade com receptor CTLA-4 e interagindo mais fracamente com CD28 quando comparado ao receptor CD80. Por outro lado, CD80 é regulado posteriormente somente após a ativação, se liga de forma mais árdua com CD28 e CTLA-4 e não é expresso em APCs quiescentes (Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994; Sigal *et al.*, 1998; Sharpe, 2002). Dessa forma, as moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 promovem a ativação de células T CD4⁺ e podem estar relacionadas 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; Soares *et al.*, 2016) (Figura 2).

A subpopulação de linfócitos T *helper* Th1, caracterizada pela expressão do fator de transcrição “*T-box expressed in T cells*” (T-bet) (Afzali *et al.*, 2007, Nogueira *et al.*, 2014), possuem capacidade de recrutar e ativar outras células do sistema imune como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B durante a infecção pelo *T. cruzi*. Essas células medeiam a resposta imune celular através da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ e TNF- α sendo cruciais para direcionar uma ação efetora mais eficiente pelos macrófagos (Teixeira *et al.*, 2011). Na doença de Chagas, Gomes e colaboradores (2003) mostraram que a produção exacerbada de IFN- γ contra antígenos do *T. cruzi* favorece o desenvolvimento de uma resposta Th1 em pacientes com a forma clínica CARD, levando à progressão dos danos cardíacos.

Os linfócitos Th2, caracterizados pela expressão do fator de transcrição “*GATA-binding protein-3*” (GATA-3) (Afzali *et al.*, 2007, Nogueira *et al.*, 2014), 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 e IL-10 que na doença de Chagas pode ajudar no controle das respostas inflamatórias mediadas por células T e assim prevenir o dano tecidual durante à infecção pelo *T. cruzi*. (Mariano *et al.*, 2008; Bonney *et al.*, 2015;).

As células Th17, que apresentam o fator de transcrição “*retinoid-related orphan receptor γ* ” (ROR γ -T) (Afzali *et al.*, 2007, Nogueira *et al.*, 2014), têm sido amplamente

estudadas em diferentes patologias, como nas doenças autoimunes (Teixeira *et al.*, 2011), incluindo artrite reumatóide e esclerose múltipla (Rakebrandt *et al.*, 2016), podendo estar associada com funções anti ou pró-inflamatórias (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 controlar o desenvolvimento da cardiopatia chagásica por sua capacidade de regular as funções pró-inflamatórias dos linfócitos Th1 (Guedes *et al.*, 2012; Bonney *et al.*, 2015).

As células T reguladoras (Treg), caracterizadas pela expressão de “*forkhead box P3*” (FOXP3), são uma população celular de linfócitos T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ que possuem capacidade de controlar a resposta imune através do contato celular e/ou produção de citocinas (Baecher-Allan *et al.*, 2002; Afzali *et al.*, 2007, Sojka *et al.*, 2008; de Araújo *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2014; Mengel *et al.*, 2016). 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. CD8 Treg é uma subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ também dotadas de funções imunossupressoras (Salgame *et al.*, 1991), entretanto pouco se sabe sobre a sua atuação na patologia chagásica.

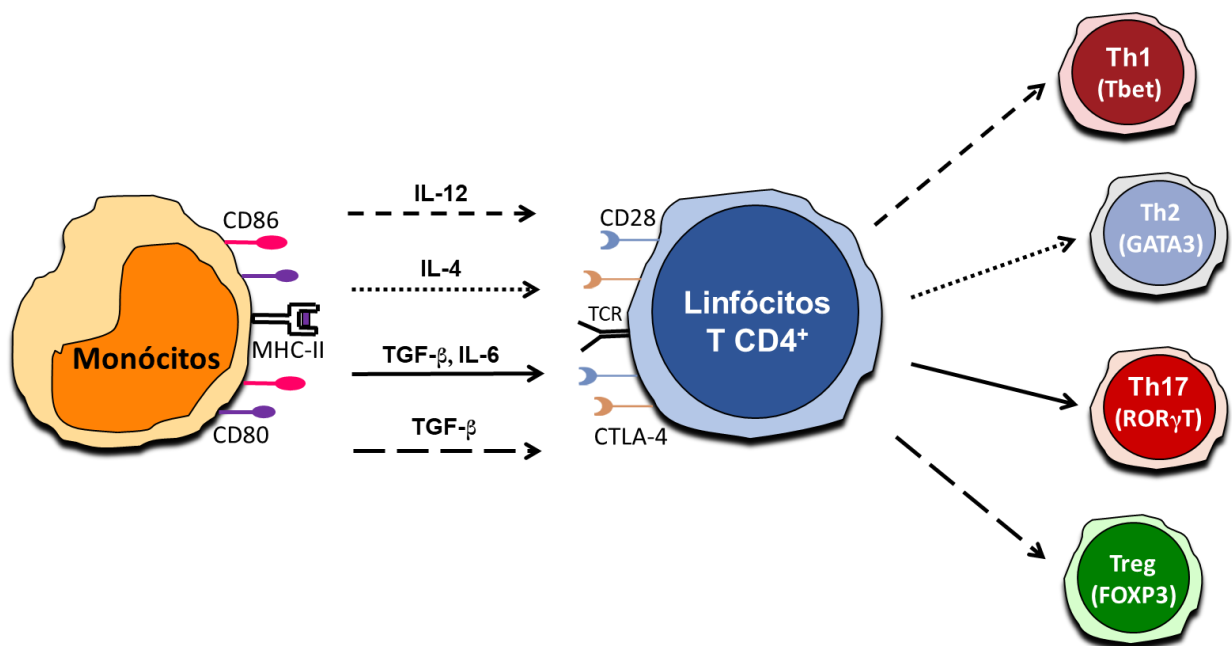


Figura 2. Associação dos mediadores expressos pelos monócitos/macrófagos no direcionamento dos diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T $CD4^+$ (Th1, Th2, Th17 ou Treg). Os diferentes tracejados das linhas estão diretamente relacionados com o desenvolvimento das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$.

Células não fagocíticas e fagocíticas, como os monócitos, também podem ser infectadas pelo *T. cruzi*, dando assim início ao processo de apresentação antigênica dos peptídeos lisados através do MHC-I, levando à ativação dos linfócitos T CD8⁺ (Martin & Tarleton, 2004). Essa ativação requer a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 com CD28 (Banchereau & Steinman, 1998; Lang *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2004). Durante a infecção por *T. cruzi*, as células T CD8⁺ são essenciais para o controle da infecção através da produção de IFN- γ e da destruição de células infectadas (Brener & Gazzinelli, 1997; Martin & Tarleton, 2004). Além disso, durante a fase crônica foi demonstrado que a depleção dessas células resulta em exacerbação da infecção com aumento da carga parasitária (Tarleton, 1990; Tarleton *et al.*, 1994). Lang e colaboradores (2002) observaram que o bloqueio de CD80 resulta na expansão de linfócitos citotóxicos em modelo experimental para doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD). Porém, ainda é necessário estudos que avaliem o papel das moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 na ativação dessa população celular na doença de Chagas. Além disso, o bloqueio das interações entre CD80/CD86 e CD28 resulta na perda da resposta antígeno específica (Van Gool *et al.*, 1999).

Muitos estudos demonstram que os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas possuem diferentes tipos de respostas mediadas por linfócitos T. Estes estudos sugerem que pacientes com cardiopatia chagásica produzem de forma exacerbada citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que leva a formação de uma resposta do tipo Th1 e linfócitos T CD8⁺, 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.*, 2012a; Frade *et al.*, 2013; Basso, 2013; Chaves *et al.*, 2016). Por outro lado, pacientes com a forma clínica IND apesar de apresentarem uma resposta inflamatória Th1 importante para controlar a replicação do parasito, produzem predominantemente citocinas anti-inflamatórias como IL-10, possuindo um equilíbrio entre a produção de citocinas inflamatórias e regulatórias que controlam os danos teciduais e desencadeiam assim, uma resposta mediada por linfócitos T mais modulada (Dutra *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2003; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008, de Araújo *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2012; Magalhães *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2014; 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 da doença de Chagas (Gomes *et al.*, 2005; Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

Os receptores CD80, CD86, CD28 e CTLA-4 são os mais estudados dentre as moléculas co-estimuladoras, atuando na ativação/inibição da imunidade adaptativa mediada por linfócitos (Sharpe *et al.*, 2009). Camundongos deficientes em CTLA-4 demonstram grande infiltrado leucocitário em vários órgãos, evidenciando alta capacidade proliferativa dessas células (Waterhouse *et al.*, 1995). June e colaboradores (1990) observaram que a molécula co-estimuladora CD28 pode desencadear a ativação de células T ou anergia.

Muitos trabalhos demonstram o papel funcional dos receptores CD80, CD86, CTLA-4 e CD28 em diferentes contextos patológicos (Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2004; Qureshi *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2014; Flörcken *et al.*, 2017). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel dessas moléculas co-estimuladoras na doença de Chagas. Alguns estudos demonstraram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem desencadear diferentes mecanismos de ativação da resposta imune mediada por monócitos e linfócitos. Magalhães e colaboradores (2015) observaram maior expressão de CD80 e CD86 por monócitos humanos infectados com a cepa Col cl1.7, mas não pela cepa Y. Também foi observado aumento na expressão de CD80 por células dendríticas infectadas com as cepas AQ1.7, MUTUM e 2369. Entretanto, esse resultado não foi observado na cepa de 1849 (Da Costa *et al.*, 2014). Foi observado que camundongos deficientes em CD28 infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* apresentaram maior suscetibilidade à infecção. O bloqueio de CD80 e CD86 por anticorpos monoclonais também exacerbou a infecção por *T. cruzi* (Miyahira *et al.*, 2003). Por outro lado, existem poucos estudos avaliando a expressão dessas moléculas co-estimuladoras nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Souza *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2016).

Tendo em base esse contexto, pouco se conhece a respeito do papel das moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 presentes nos monócitos e suas subpopulações na geração da resposta adaptativa induzida pelo *T. cruzi*. Assim, a interação dessas moléculas no direcionamento da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos pode ser importante para diferenciar a resposta imune encontrada nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Dessa forma, a hipótese do presente trabalho é que as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 expressas pelos monócitos podem ser importantes na modulação da resposta imune na doença de Chagas e podem determinar o prognóstico da infecção.

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. Os indivíduos incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou (IRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Nº 15/2011) (Anexo A).

4.2 Caracterização da população de estudo

Os indivíduos incluídos para o desenvolvimento do capítulo 1 da presente tese foram recrutados no Ambulatório de Doenças Infecto-parasitárias do IRR, sob a coordenação da Dra. Silvana Maria Eloi Santos. Para o desenvolvimento dos capítulos 2 e 3, os pacientes foram recrutados no Ambulatório de doenças infecto parasitárias do IRR e no Ambulatório Bias Fortes do Hospital das Clínicas sob a coordenação da Dr^a Maria do Carmo Pereira Nunes e Dr^a Silvana Araújo (Figura 3). 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 apresentavam 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 apresentavam a forma clínica indeterminada (IND): Constituído por pacientes que apresentavam positividade sorológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ou sinais da moléstia; eletrocardiograma (ECG) convencional normal e estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Grupo de pacientes que apresentavam a forma clínica cardíaca (CARD): Constituído por pacientes que apresentavam positividade sorológica 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 com doença de Chagas 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. Desenho experimental

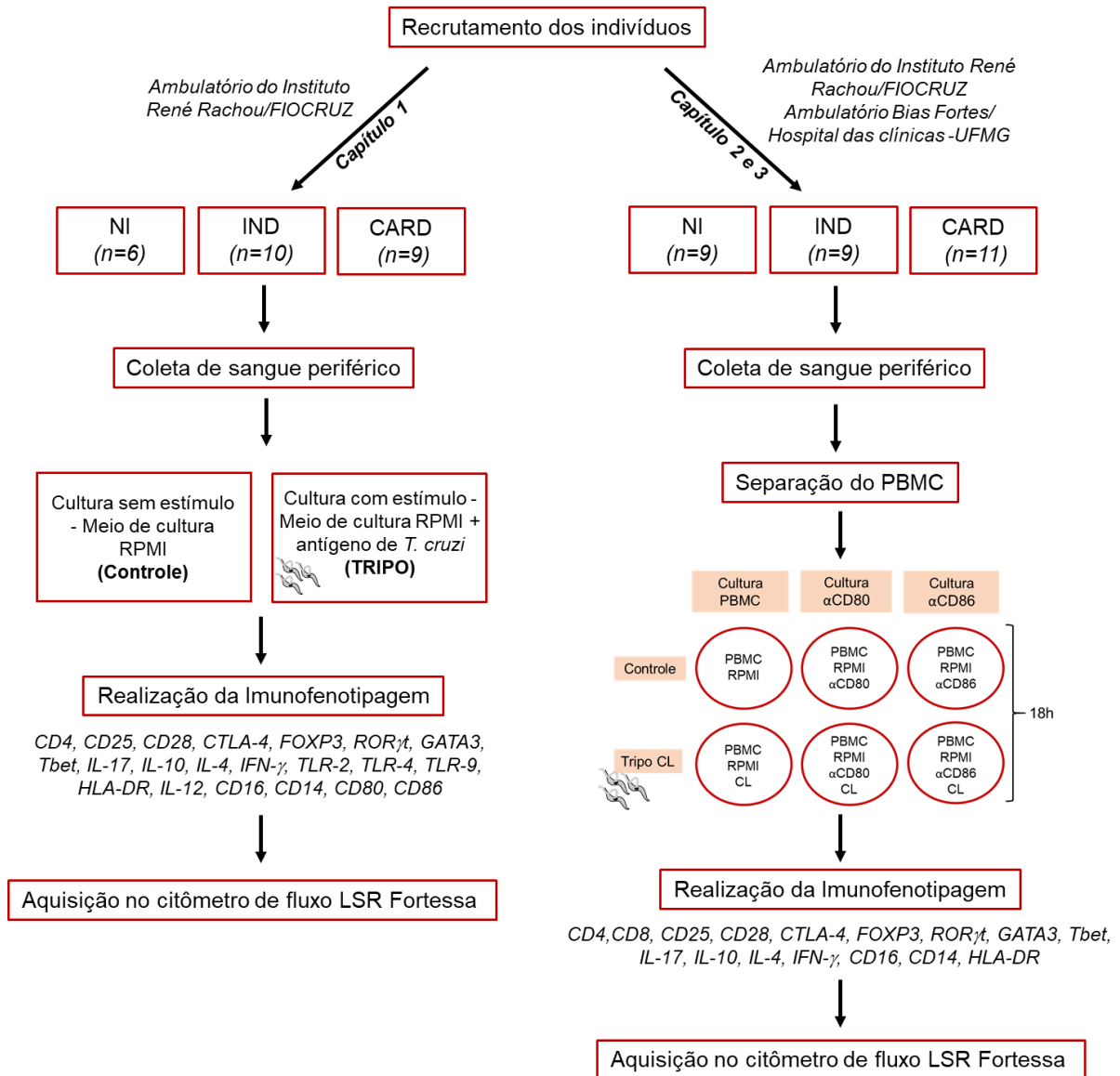


Figura 3. Desenho experimental. A primeira parte refere-se aos experimentos dispostos no capítulo 1 e a segunda parte refere-se aos capítulos 2 e 3 desenvolvidos na presente tese.

4.4 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 Elvejen, 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 (ThermoScientific) e a concentração final utilizada foi de 20µg/mL.

4.5 Cultura de sangue total dos indivíduos envolvidos no estudo na presença ou ausência de antígenos solúveis de *T. cruzi*

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 CO₂ 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 CO₂ 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.

4.6 Análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo

Foram adicionados 200µL do sangue após incubação 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 1. Os anticorpos foram conjugados com FITC, PE, PERCP (ou PE-Cy5 ou PERCP-Cy5.5), APC, APC-Cy7, PE-Cy7, BV421.

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados para avaliação da expressão de marcadores de superfície celular e intracitoplasmáticos.

Marcador	Clone	Marca
<i>Marcadores de superfície celular</i>		
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
HLA-DR	G46-6	BD, USA
CD4	RPA	BD, USA
CD8	RPA-T8	Biolegend, CA
CD25	M-A251	BD, USA
CD28	CD28.2	BD, USA
CTLA-4	BNI3	BD, USA
<i>Marcadores intracitoplasmáticos</i>		
TLR-9	eB72-1665	BD, USA
FOXP3	PCH101	eBioscience
GATA-3	291106	R&D Systems
ROR- γ t	Q21-559	BD, USA
Tbet	525803	R&D Systems
IL-17A	BL168	Biolegend, CA
IL-12	2-4E6	BD, USA
IFN- γ	4S.B3	Biolegend
IL-4	8D4-8	BD, USA
IL-10	JES3-19F1	BD, USA

4.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue periférico dos pacientes envolvidos no estudo e indivíduos não-infectados foi coletado em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado sobre o *Ficoll-Hypaque* (Sigma) na proporção de 1:1 em tubo de polipropileno de 14mL (Falcon, E.U.A). O tubo foi centrifugado a 400g por 40 minutos a T. A.

Ao final da centrifugação obtinha-se um anel de PBMC entre a mistura de *Ficoll-Hypaque* e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e posteriormente armazenado em alíquotas de 2ml devidamente identificadas a -20°C. O PBMC foi retirado com auxílio de uma micropipeta e transferido para um tubo *Falcon* de 50mL. As células foram lavadas três vezes por centrifugação a 400g por 10 minutos a 4°C em PBS 1X estéril (PBS pH 7.4) e posteriormente ressuspensas em RPMI, contadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para a concentração desejada. Toda a manipulação, com exceção da contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.8 Ensaio funcional com anticorpo anti-CD80 e anti-CD86

Para realização do ensaio funcional com anticorpo anti-CD80 e anti-CD86 foi utilizado meio CMBLAST que continha 1,6% de L-glutamina (Sigma), 3% penicilina e estreptomicina e 5% de soro humano do tipo AB inativado (Sigma) diluído em meio RPMI. O cultivo era realizado em 6 tubos de polipropileno (Sarstedt, Alemanha) de 5 ml onde acrescentava-se a cada tubo 150µl de células na concentração de 10^7 células/ml e meio CMBLAST. Em alguns tubos eram adicionados antígenos solúveis detripomastigotas do *T. cruzi* (TRIPO) na concentração de 20µg/mL e anticorpo bloqueio anti-CD80 (2D10.4) ou anticorpo anti-CD86 (IT2.2) (ThermoFisher scientific), na concentração de 5 µg/ml, obtendo volume final de 1,5 ml (Figura 3). Os tubos foram incubados por 18 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific - EUA). Após o período de incubação, foi adicionado 1mg/ml de Brefeldina A seguidos de uma nova incubação por 4 horas. As células foram transferidas para tubos poliestireno de 5mL (Falcon, EUA) devidamente identificados e contendo os anticorpos de superfície correspondentes e foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e centrifugadas a 400g por 10 minutos a 4°C. Foi adicionado formaldeído a 2% para fixação das células seguindo de incubação a 20 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Foi adicionado as amostras 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 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. As moléculas intracitoplasmáticas foram avaliadas através da adição de anticorpos específicos em cada tubo, seguindo de uma incubação por 1 hora. Após a incubação as células foram lavadas com 1mL de PBS-P e centrifugadas a 400g por 10 minutos a 4°C. Ao final, foram adicionados 150µL de PBS 1X e as amostras foram adquiridas no citometro de fluxo (FACS LDRFortessa - BD, E.U.A). Foram adquiridos 50.000

eventos totais. As moléculas de superfície e intracitoplasmáticas analisadas estão descritas na tabela 1. Os anticorpos foram conjugados com FITC, PE, PERCP (ou PE-Cy5 ou PERCP-Cy5.5), APC, APC-Cy7, PE-Cy7, BV421. Obtivemos 65% dos receptores para CD80 e 70,7% dos receptores para CD86 bloqueados (Figura 4).

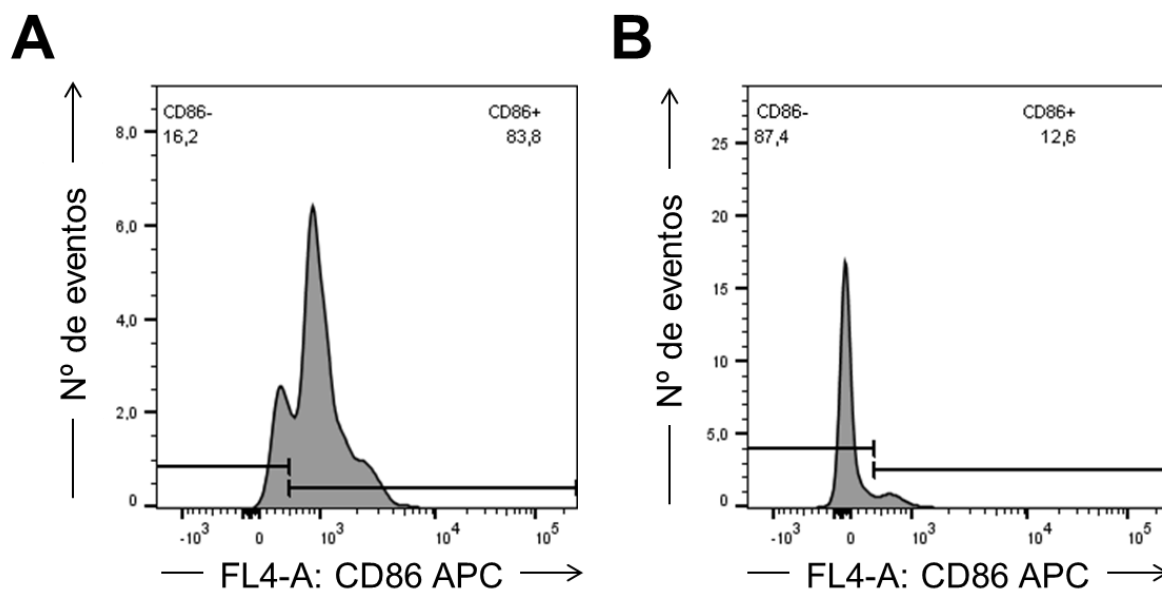


Figura 4. Análise representativa da porcentagem de receptores CD86 bloqueados após a utilização do anticorpo anti-CD86. Representação da frequência do receptor CD86 em cultura PBMC (A) e representação da frequência do receptor CD86 após a utilização do anticorpo anti-CD86 (B).

4.9 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, APC-Cy7, PE-Cy7 e BV421, simultaneamente. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações foi realizada através do software *FlowJo* 10.6.1.

4.9.1 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* intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14 PerCP), sendo selecionado por uma janela –“gate” a população de monócitos totais (Figura 5A). Após a seleção da população de interesse, foi criado um novo gráfico de intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14 PerCP) *versus* intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD16 APC-Cy7), ocorrendo a delimitação das três subpopulações de monócitos: monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e monócitos patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) (Figura 5B).

A próxima estratégia correspondeu à avaliação do perfil fenotípico-funcional das subpopulações de monócitos. As moléculas TLR-2, TLR-4, TLR-9, HLA-DR, CD80 e CD86 expressas nessas subpopulações celulares foram analisadas quanto à intensidade média de fluorescência (IMF) em gráfico de histograma (Figura 5C). A mesma estratégia de análise foi realizada para as moléculas produzidas por essas células (IL-10 e IL-12) (Figura 5D).

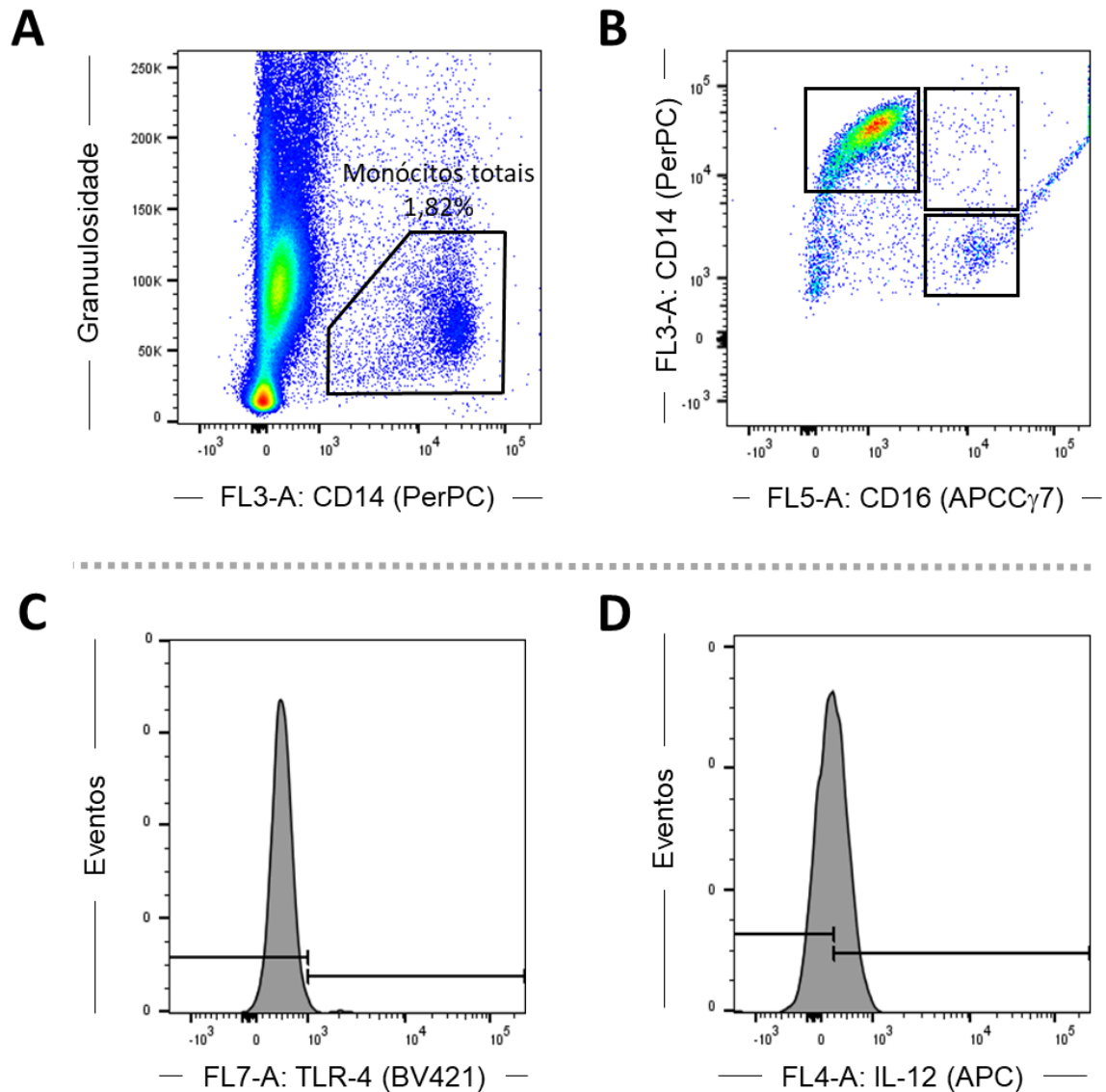


Figura 5. Análise do perfil fenotípico dos monócitos do sangue periférico e suas subpopulações por citometria de fluxo. Representação da população de monócitos totais, selecionados no gate “Monócitos” em gráfico de granulosidade (SSC) *versus* intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14 PerCP) e das subpopulações: monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monócitos inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e monócitos patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺), em gráfico de intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD14 PerCP) *versus* intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD16 APC- γ 7) (B). Representação do perfil de análise da expressão de TLR-4 (C) e IL-12 (D) por monócitos e subpopulações por intensidade média de fluorescência (IMF).

4.9.2 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos T CD4⁺ 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 6A). Posteriormente, foi criado um novo gráfico de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) *versus* intensidade de fluorescência-7 (FL7-A, CD4 BV421) na qual foi criado um “gate” na população de linfócitos auxiliares (linfócitos T CD4⁺) (Figura 6B).

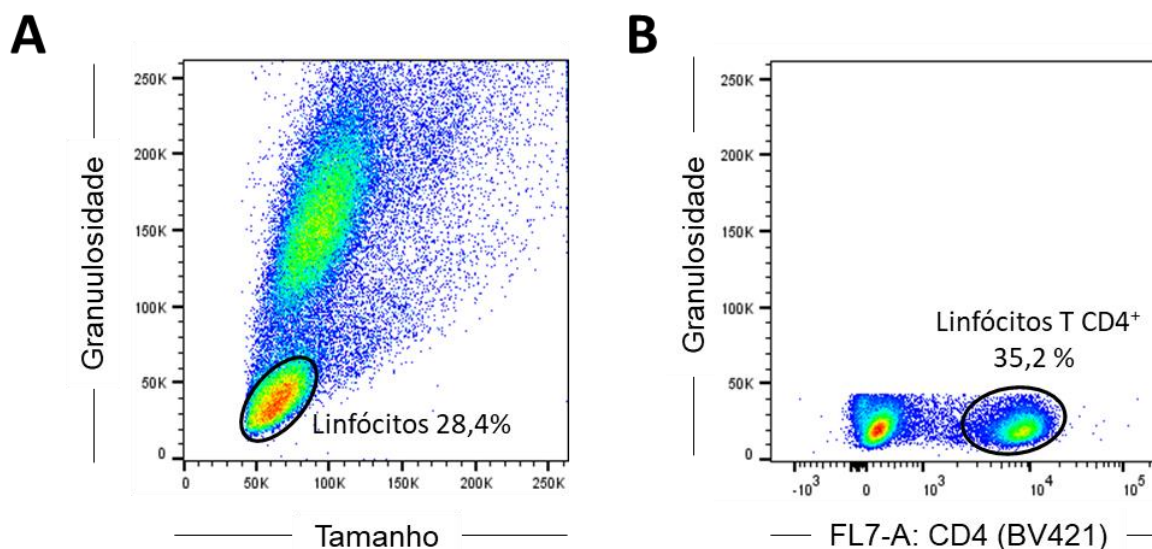


Figura 6. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo. Representação da população de linfócitos totais selecionados no gate “Linfócitos” em gráfico de granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) (A) e da população de linfócitos T CD4⁺ através do gráfico de granulosidade (SSC) *versus* intensidade de fluorescência-7 (FL7-A, CD4 BV421) (B).

A próxima estratégia utilizada foi para a identificação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ de interesse. Após selecionar o “gate” na população de linfócitos T CD4⁺ foi criado um gráfico de intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, Tbet FITC) *versus* intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, IFN- γ PE) que caracteriza a subpopulação Th1 (Figura 7A), um gráfico de intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, GATA3 FITC) *versus* intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, IL-4 PE) que caracteriza a subpopulação Th2 (Figura 7B), um gráfico de intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, ROR γ T PE) *versus* intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, IL-17A FITC) que caracteriza a subpopulação Th17 (Figura 7C) e um gráfico de intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APC-Cy7) *versus* intensidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PECy7) que caracteriza a subpopulação Treg (Figura 7D). Foram avaliados nos linfócitos totais a frequência de CD25, CD28 e CD152 pela frequência de células produtoras em gráfico de histograma.

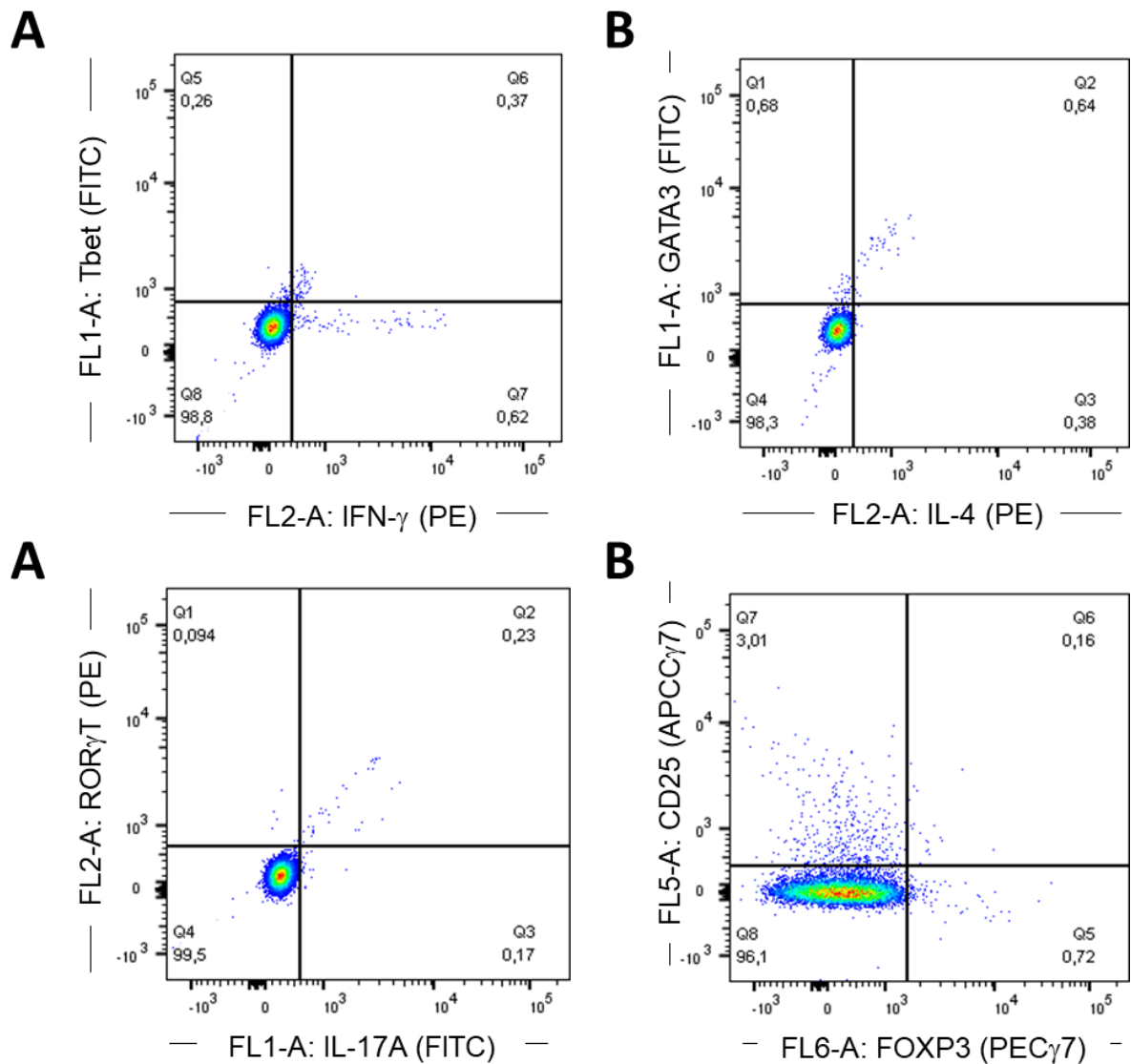


Figura 7. Análise do perfil fenotípico das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ por citometria de fluxo. Representação da subpopulação de linfócitos Th1 através do gráfico de intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, Tbet FITC) *versus* intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, IFN- γ PE) (A), Th2 pela expressão do fator de transcrição GATA3 através do gráfico de intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, GATA3 FITC) *versus* intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, IL-4 PE) (B), Th17 pela expressão do fator de transcrição ROR γ T através do gráfico de intensidade de fluorescência-2 (FL2-A, ROR γ T PE) *versus* intensidade de fluorescência-1 (FL1-A, IL-17A FITC) (C) e Treg pela expressão do fator de transcrição FOXP3 através do gráfico de intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APC-Cy7) *versus* intensidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PECy7) (D).

4.9.3 Estratégias de análise para a caracterização dos linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ regulatórios

A caracterização dos linfócitos T CD8⁺ foi obtida através do gráfico de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) *versus* intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD8 PerCP) na qual

foi criado um “gate” na população de linfócitos citotóxicos (linfócitos T CD8⁺) (Figura 8B). Para a caracterização de linfócitos T CD8⁺ regulatórios foi criado dentro do “gate” de linfócitos T CD8⁺ um gráfico de intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APC-C γ 7) *versus* intensidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PEC γ 7) (Figura 8C).

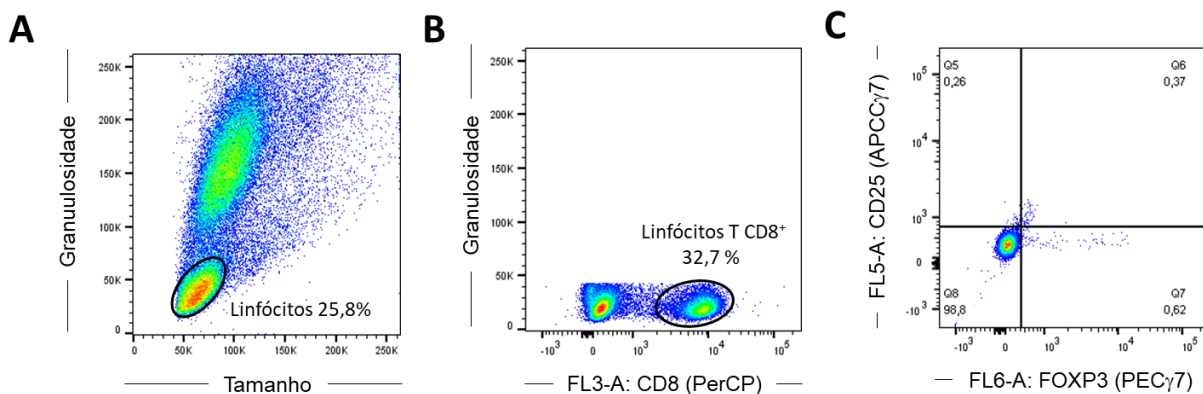


Figura 8. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ regulatórios do sangue periférico por citometria de fluxo. Representação da população de linfócitos totais, selecionados no gate “Linfócitos” em gráfico de granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) (A), população de linfócitos TCD8⁺ através do gráfico de granulocidade (SSC) *versus* intensidade de fluorescência-3 (FL3-A, CD8 PerCP) (B) e de linfócitos T CD8⁺ regulatórios através do gráfico de intensidade de fluorescência-5 (FL5-A, CD25 APC-C γ 7) *versus* intensidade de fluorescência-6 (FL6-A, FOXP3 PEC γ 7) (C).

4.10 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, assim como entre as culturas PBMC, com anticorpo anti-CD80 (α CD80) e anti-CD86 (α CD86) 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 realizada entre as variáveis dependentes foi avaliada considerando o coeficiente de Spearman (ρ) através do software JMP, sendo consideradas as diferenças estatísticas significativas quando $p < 0,05$.

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 que determinam tal evolução. Dessa forma, para compreender o papel das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 presentes em células da imunidade inata no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg) e em linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores, após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* em pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas, os resultados do presente estudo serão apresentados em três capítulos.

O primeiro capítulo constitui-se da caracterização fenotípica-funcional dos monócitos totais e de suas subpopulações (monócitos clássicos, inflamatórios e patrulhadores) em pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas e a relação da expressão das moléculas CD80 e CD86 com os receptores CD28 e CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ totais e com as subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg.

O segundo capítulo apresenta os resultados obtidos através do bloqueio dos receptores CD80 e CD86 expressos por monócitos totais e suas subpopulações e a interação dessas moléculas co-estimuladoras com os receptores CD28 e CTLA-4 presentes em cada subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e Treg) no direcionamento de uma resposta pró-inflamatória/imunomodulatória nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

O terceiro e último capítulo compreende a atuação das moléculas CD80 e CD86 expressas por monócitos totais e de suas subpopulações após ensaio de bloqueio no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores.

5.1 CAPÍTULO 1

Os resultados referentes ao capítulo 1 foram organizados em forma de artigo e publicados em 2018 na revista *Frontiers in Immunology* sob o título de “*CD86 Expression by Monocytes Influences the Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease*”

5.1.1 Pacientes com a doença de Chagas apresentam diferentes frequências das subpopulações de monócitos em culturas controle e estimuladas por *T. cruzi*

A frequência dos monócitos totais e das suas subpopulações obtidos de pacientes com doença de Chagas e indivíduos não-infectados está apresentada nas Figuras 9A e B. Nossos resultados demonstraram redução significativa na frequência de monócitos totais no grupo CARD após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (cultura TRIPO) quando comparados com a cultura controle. Observamos maior frequência de monócitos inflamatórios no grupo CARD quando comparado ao grupo NI na cultura controle. Os resultados também demonstraram redução na frequência dessa subpopulação de monócitos no grupo CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 9B). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Quando analisamos as proporções das subpopulações de monócitos de pacientes com doença de Chagas e indivíduos saudáveis em culturas TRIPO, observamos que os grupos NI, IND e CARD apresentaram maior proporção de monócitos clássicos do que inflamatórios e patrulhadores (Figura 9A).

Monócitos

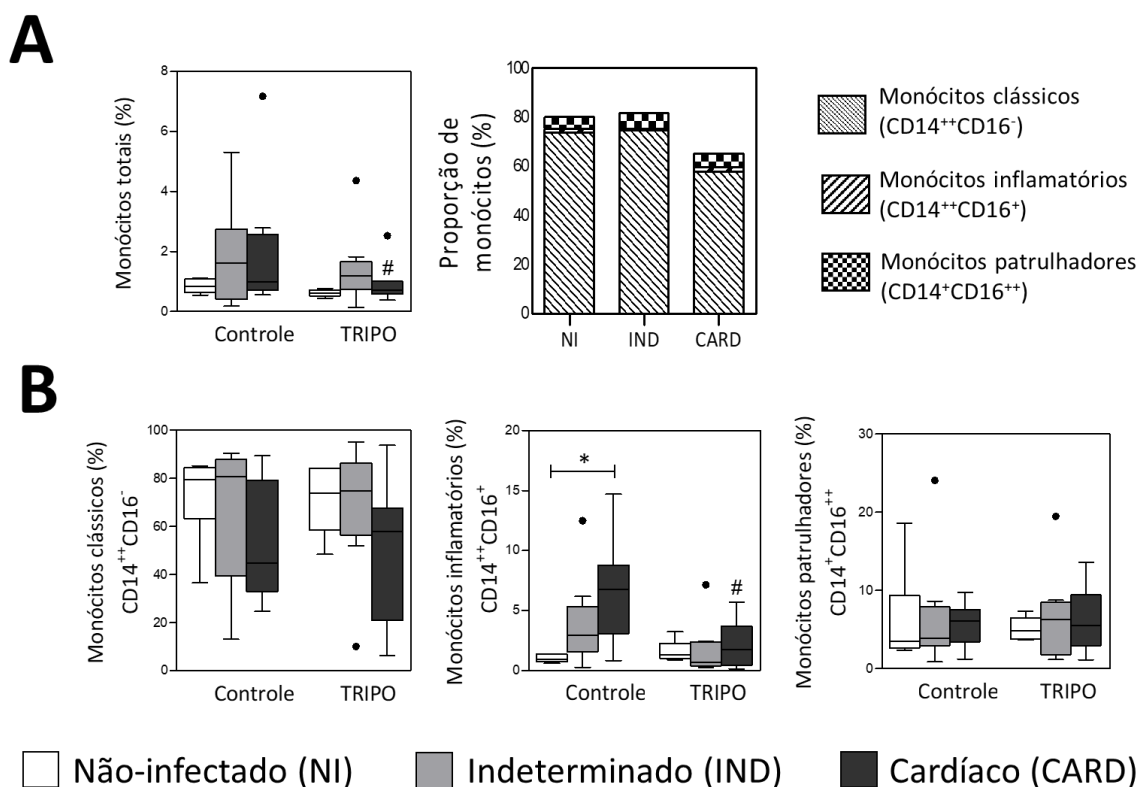


Figura 9. Análise da frequência dos monócitos totais e suas subpopulações. Frequência de monócitos totais (A). Frequência das subpopulações de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) (B) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.1.2 Monócitos de pacientes assintomáticos demonstraram menor expressão de TLR

A estimulação com antígenos de *T. cruzi* aumentou a expressão de TLR-2 e reduziu a expressão desse receptor em monócitos inflamatórios do grupo NI e CARD, respectivamente, quando comparado às culturas controle. O desafio com antígenos de *T. cruzi* também levou à menor expressão de TLR-4 em monócitos patrulhadores dos pacientes IND quando comparados ao grupo NI. Além disso, após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*, os monócitos totais de indivíduos IND apresentaram alta expressão de TLR-9. Por outro lado, observamos menor expressão desse receptor em monócitos inflamatórios e patrulhadores do grupo IND quando comparados com indivíduos NI nas culturas controle e TRIPO, assim como foi

observada redução de TLR-9 em monócitos patrulhadores no grupo CARD em comparação ao grupo NI após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 10A). Outras diferenças significativas não foram observadas.

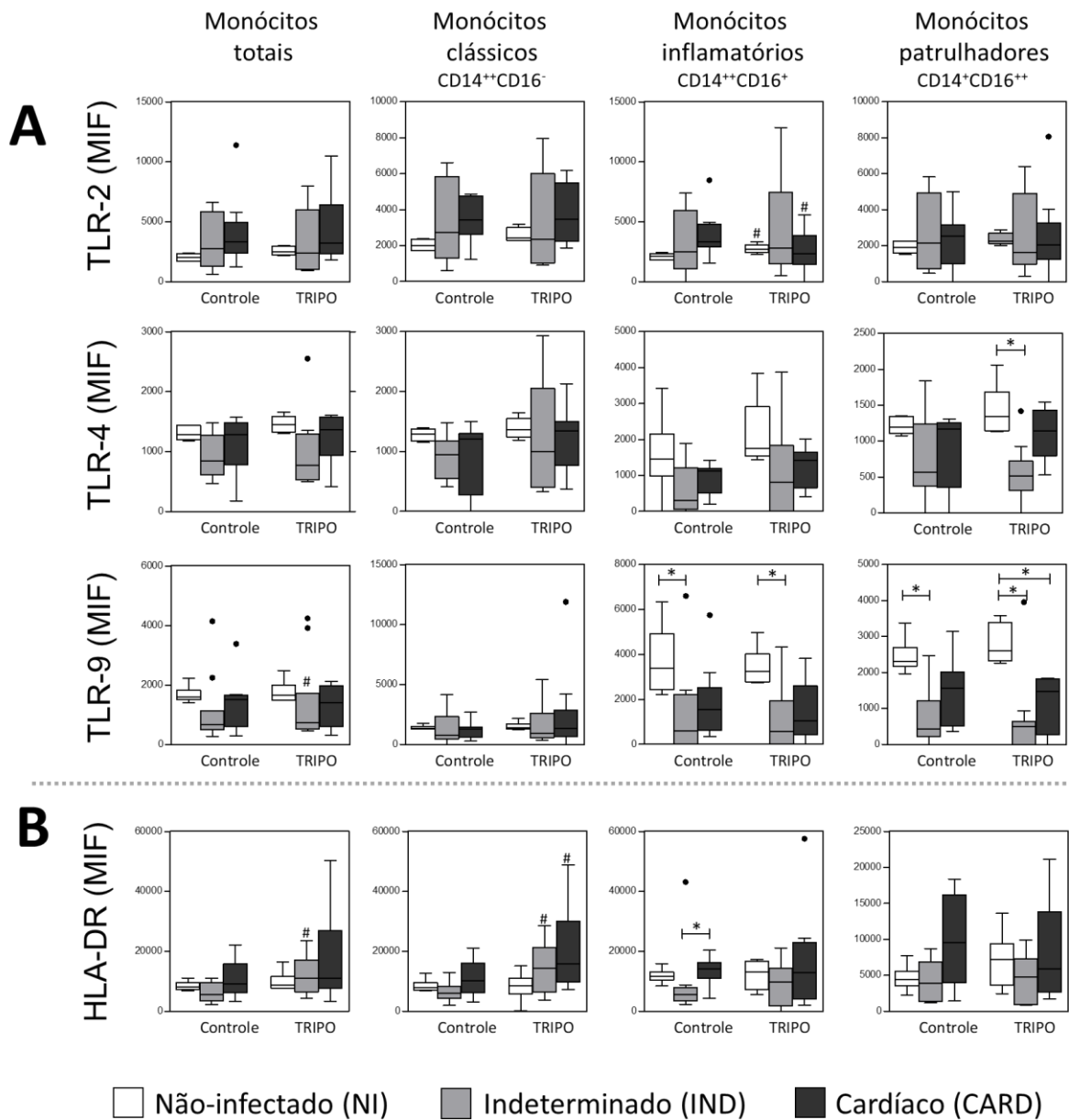


Figura 10. Expressão das moléculas de reconhecimento e ativação em monócitos totais e suas subpopulações.

Expressão de receptores toll-like (TLR) (A) e HLA-DR (B) por monócitos totais, monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) (B). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.1.3 Pacientes com doença de Chagas apresentam diferentes níveis de expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos

Após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*, monócitos totais dos pacientes IND apresentaram maior expressão de HLA-DR quando comparado à cultura controle. Monócitos clássicos dos grupos IND e CARD na cultura TRIPO apresentaram maior expressão de HLA-DR em comparação com as culturas controle. Os resultados também demonstraram menor expressão de HLA-DR em monócitos inflamatórios de pacientes IND quando comparados com o grupo CARD em culturas controle (Figura 10B). Outras diferenças significativas não foram observadas.

5.1.4 A expressão das moléculas CD80 e CD86 nas subpopulações de monócitos de pacientes com doença de Chagas é regulada após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*.

Em seguida, avaliamos o efeito dos monócitos circulantes de pacientes com doença de Chagas na ativação de células T. Para essa finalidade, caracterizamos a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em culturas *in vitro* de amostras de sangue total na presença de antígenos de *T. cruzi* (Figura 11A e B).

Nas culturas estimuladas TRIPO, a expressão de CD80 nos monócitos clássicos dos grupos IND e CARD foi maior do que no grupo NI. Essa molécula co-estimuladora também foi mais expressa em monócitos inflamatórios do grupo CARD desafiados com antígenos de *T. cruzi* quando comparados com a cultura controle. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de CD80 em monócitos patrulhadores (Figura 11A).

Quando avaliamos a expressão da molécula CD86, observamos que os monócitos totais e todas as suas subpopulações apresentaram maior expressão de CD86 em pacientes IND quando comparados ao grupo NI nas culturas controle e TRIPO, exceto em monócitos patrulhadores após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*. Pacientes CARD demonstraram maior expressão de CD86 apenas em monócitos clássicos quando comparados ao grupo NI nas culturas controle e TRIPO. Também observamos uma expressão reduzida dessa molécula co-estimuladora em monócitos patrulhadores dos grupos IND e CARD após estimulação com *T. cruzi* (Figura 11B). Outras diferenças significativas não foram observadas.

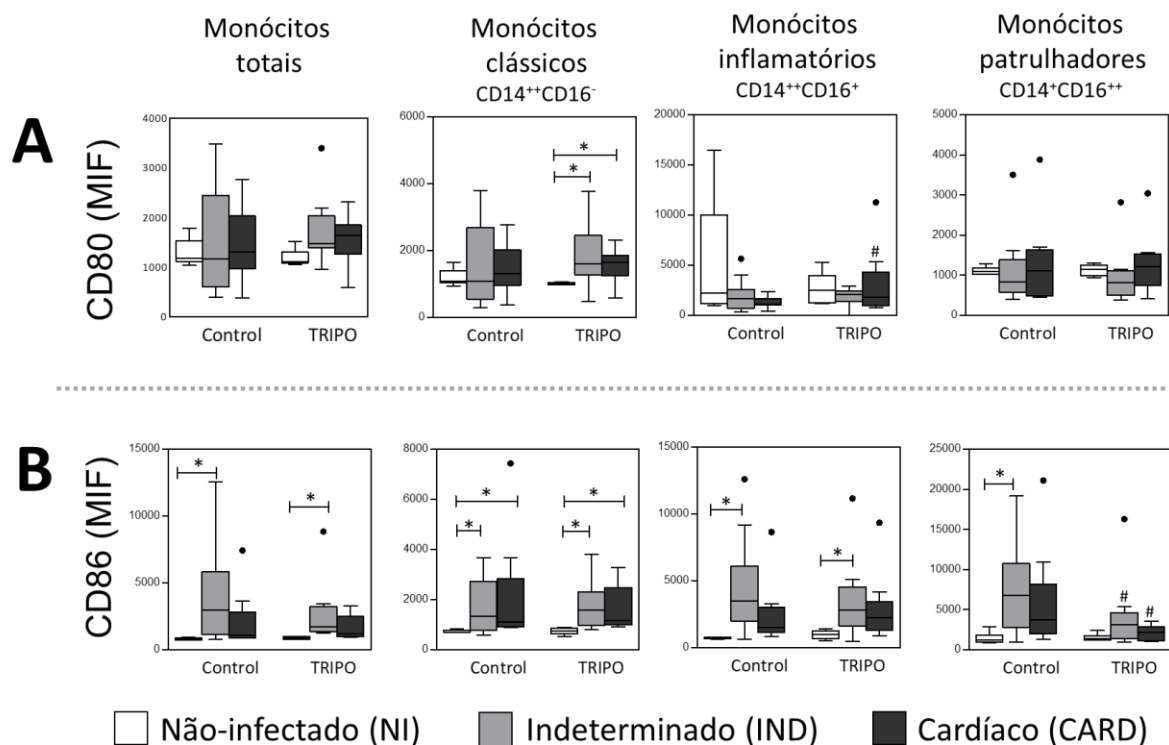


Figura 11. Expressão das moléculas co-estimuladoras em monócitos totais e suas subpopulações. Expressão das moléculas co-estimuladoras de CD80 (A) e CD86 (B) por monócitos totais, monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) (B). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.1.5 Monócitos totais de pacientes com a forma clínica indeterminada apresentaram maior expressão de CD86 quando comparado à CD80

Para comparar a expressão de CD86 e CD80 em monócitos totais e suas subpopulações, calculamos um índice de expressão relativo, considerando a razão CD86/CD80 e a proporção através da intensidade média de fluorescência dessas moléculas em culturas TRIPO de indivíduos NI, IND e CARD (Figura 12). Nossos resultados demonstraram maior razão da expressão de CD86/CD80 nos monócitos totais do grupo IND em comparação ao grupo NI (Figura 12A). A maior expressão de CD80 foi observada nos monócitos inflamatórios do grupo NI. À medida que a doença progride, a expressão de CD80 diminuiu nos monócitos

inflamatórios e patrulhadores e aumentou nos monócitos clássicos do grupo IND. Além disso, a maior expressão de CD80 foi modificada dos monócitos inflamatórios do grupo IND para patrulhadores no grupo CARD, enquanto a expressão observada nos monócitos clássicos permaneceu estável (Figura 12B).

Encontramos uma proporção semelhante da expressão de CD86 em monócitos clássicos, inflamatórios e patrulhadores do grupo NI. Com a progressão da doença, a expressão de CD86 aumentou em todas as subpopulações de monócitos dos pacientes IND em comparação com os do grupo NI e reduziu nas subpopulações de monócitos do grupo CARD (Figura 12B).

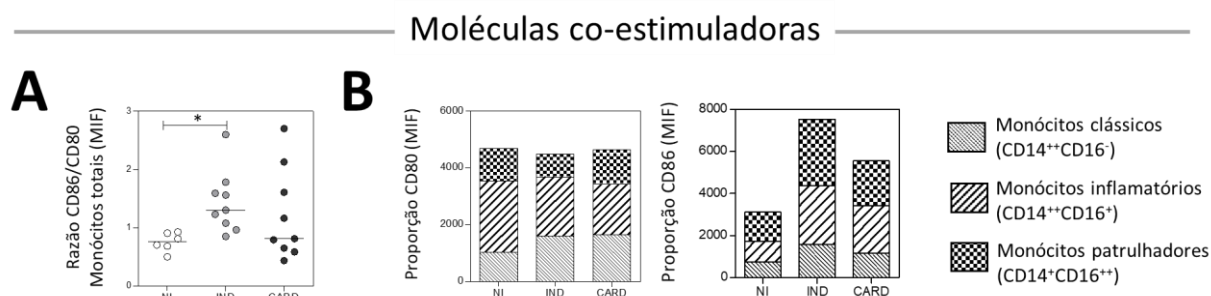


Figura 12. Razão e proporção da expressão de CD80 e CD86 por monócitos após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi*. Razão da expressão de CD86/CD80 por monócitos totais (A) e proporção dessas moléculas co-estimuladoras pelas subpopulações de monócitos (B) após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi*. Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

5.1.6 Monócitos totais e clássicos de pacientes assintomáticos com doença de Chagas apresentaram equilíbrio entre a expressão de IL-12 e IL-10

Verificamos que os monócitos totais de pacientes com doença de Chagas apresentam maior expressão de IL-12 quando comparado ao grupo NI, nas culturas controle e TRIPO. Após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*, os monócitos totais do grupo CARD demonstraram menor expressão dessa citocina (Figura 13A).

Quando analisamos as subpopulações de monócitos observamos maior expressão de IL-12 nos monócitos clássicos de pacientes IND quando comparados com o grupo NI na cultura controle e, após estimulação *in vitro* com antígenos *T. cruzi*, nos pacientes IND e CARD em comparação com o grupo NI. Também detectamos maior expressão de IL-12 em monócitos patrulhadores de pacientes IND quando comparados com o grupo NI na cultura controle (Figura 13A). Além disso, os monócitos clássicos apresentaram maior expressão de IL-10 apenas em

pacientes IND, quando comparados ao grupo NI na cultura controle (Figura 13B). Não foi possível observar outras diferenças significativas.

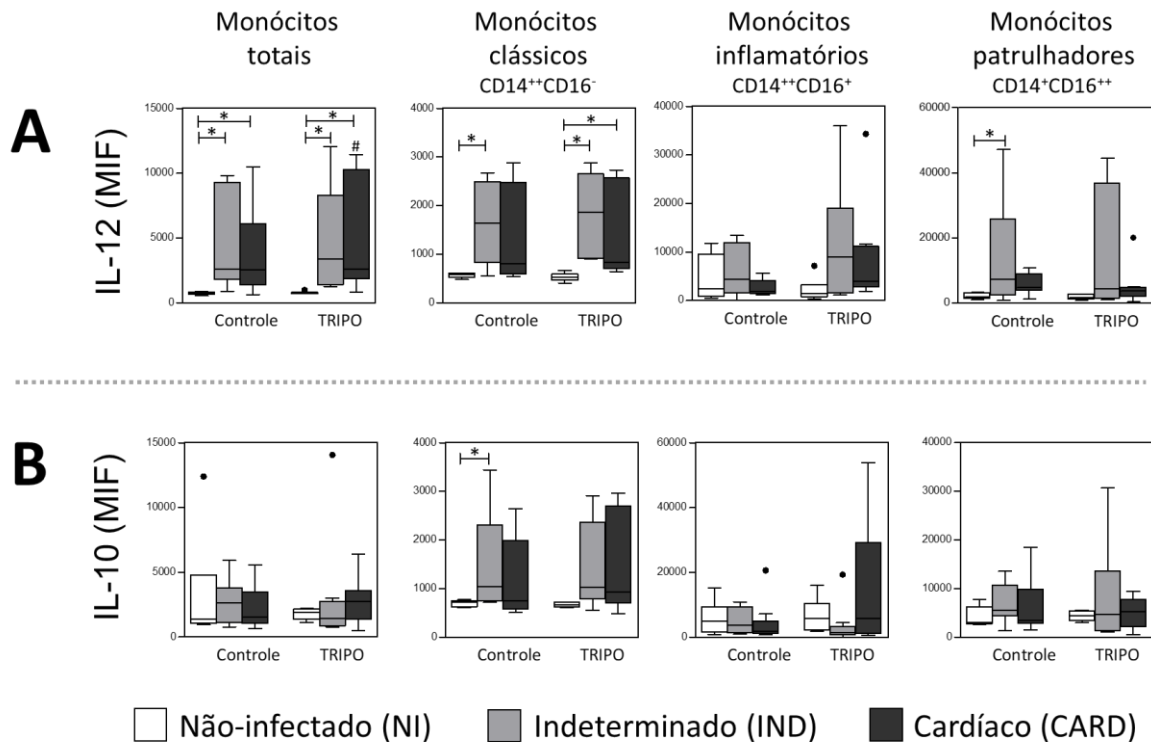


Figura 13. Expressão de citocinas por monócitos totais e suas subpopulações. Expressão da citocina IL-12 (A) e IL-10 (B) por monócitos totais, monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) e patrulhadores (CD14⁺CD16⁺⁺) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.1.7 A molécula CTLA-4 é regulada em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a forma clínica IND da doença de Chagas

Os receptores CD25, CD28 e CTLA-4 são importantes moléculas de ativação presentes na superfície dos linfócitos T sendo essenciais para a resposta imune adaptativa (Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994; Bolkun *et al.*, 2016). Assim, avaliamos a expressão dessas moléculas em células T CD4⁺ de indivíduos NI, IND e CARD. Encontramos uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em culturas TRIPO de pacientes IND e CARD em comparação com o grupo NI e em comparação com a frequência observada nas culturas

controle. Também detectamos um pequeno aumento significativo da frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ na cultura TRIPO em comparação com a cultura controle de pacientes IND. Quando avaliamos a frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺, foi possível observar que após estimulação com antígenos de *T. cruzi*, pacientes IND e CARD apresentaram um aumento da frequência dessas células em comparação com a cultura controle. Entretanto, apenas pacientes IND apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ quando comparados ao grupo NI na cultura TRIPO (Figura 14A). Outras diferenças significativas não foram observadas.

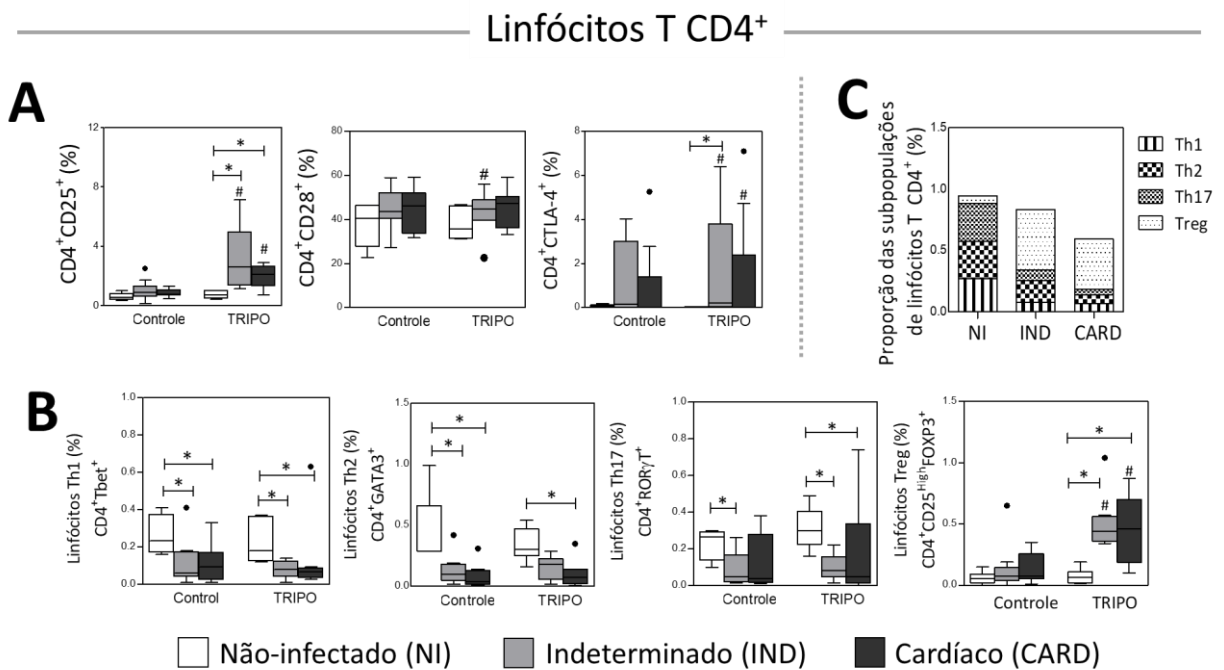


Figura 14. Análise dos linfócitos T CD4⁺ e suas subpopulações. Frequência de linfócitos CD4⁺ que expressam CD25, CD28 e CTLA-4 (A) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO). Frequência das subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg) (B) e proporção das subpopulações de linfócitos (C). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

5.1.8 Redução na frequência de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e aumento de Treg é observada principalmente em pacientes IND

O próximo passo foi avaliar a frequência de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg no sangue periférico de indivíduos não-infectados e pacientes com a doença de Chagas após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*. Os dados demonstram uma diminuição geral na frequência de linfócitos Th1, Th2 e Th17 de pacientes com Chagas em comparação com indivíduos NI, nas culturas controle e TRIPO. Por outro lado, a frequência de linfócitos Treg foi significativamente maior nos grupos IND e CARD em comparação com indivíduos NI após estimulação *in vitro* com antígenos *T. cruzi* e em comparação com a frequência observada nas culturas controle (Figura 14B). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Quando analisamos as proporções das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com doença de Chagas e indivíduos saudáveis em culturas TRIPO, foi possível observar proporções semelhantes de linfócitos Th1, Th2 e Th17 e pequena proporção de células Treg no grupo NI. Com a progressão da doença a proporção de células Th1, Th2 e Th17 diminui em indivíduos IND e CARD. Em contraste, a proporção de células Treg aumenta drasticamente em pacientes com doença de Chagas em comparação com o grupo NI, principalmente no grupo IND (Figura 14C).

A expressão de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ é um fator chave para a diferenciação e caracterização das subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2011). Encontramos menor frequência de linfócitos Th2 IL-4⁺ em culturas controle de pacientes IND e CARD em comparação com o grupo NI. Também detectamos uma menor frequência de linfócitos Th17 IL-17⁺ nas culturas controle e TRIPO de indivíduos CARD e IND quando comparados com o grupo NI, respectivamente (Figura 15). Não foram observadas diferenças significativas em relação aos linfócitos Th1 IFN- γ ⁺ e aos linfócitos Treg IL-10⁺.

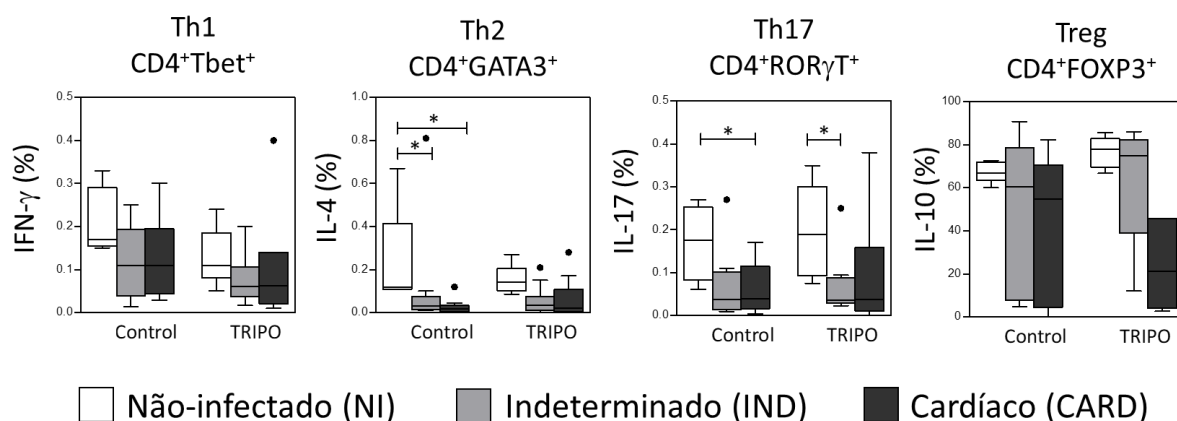


Figura 15. Frequência de citocinas pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺. Expressão de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 produzidas por linfócitos T CD4⁺ que caracterizam as subpopulações Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg), respectivamente. Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 6), forma clínica indeterminada (IND, n = 10) e cardíaca (CARD, n = 9) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.1.9 A molécula co-estimulatória CD86 pode induzir uma resposta imunomodulatória mediada por células Treg em pacientes assintomáticos

Como descrito anteriormente, pacientes com a forma clínica IND da doença de Chagas apresentam expressão mais alta de CD86 do que da molécula co-estimuladora CD80 em todas as subpopulações de monócitos. A interação entre CD80 ou CD86 com CD28 ativa os linfócitos e aprimora a resposta imune, enquanto sua ligação ao CTLA-4 inibe a ativação dos linfócitos reduzindo a modulação da resposta imune (Souza *et al.*, 2007). Assim, investigamos essa interação realizando análises de regressão e correlação em cultura após estímulo *in vitro* de antígenos de *T. cruzi*.

Primeiramente, avaliamos a interação entre CD80/CD86 de monócitos totais e CD28/CTLA-4 em culturas TRIPO de indivíduos NI, IND e CARD e encontramos uma associação significativa entre as células CD80 e CD28 no grupo NI ($R^2=0,73/p=0,03$). Também detectamos nesses indivíduos uma correlação positiva significativa entre os receptores CD80 e CTLA-4 ($\rho=0,93/p=0,008$). Também foi observada uma associação significativa entre CD86 e CTLA-4 em pacientes CARD ($R^2=0,81/p=0,001$) (Tabela 2).

A análise da interação entre CD80 e CD86 expressos nas subpopulações de monócitos com CD28/CTLA-4 em culturas TRIPO de pacientes NI, IND e CARD revelou associação significativa entre CD80 de monócitos inflamatórios e CD28 em indivíduos NI

($R^2=0,84/p=0,01$). Observamos associação significativa entre CD86 expressos em monócitos clássicos e CTLA-4 em pacientes IND ($R^2=0,55/p=0,04$) e CARD ($R^2=0,81/p=0,001$). Também encontramos associação significativa ($R^2=0,57/p=0,03$) e correlação positiva ($\rho=0,86/p=0,007$) entre CD80 presente em monócitos inflamatórios e CTLA-4 em pacientes IND. Além disso, foi encontrado correlação negativa entre CD80 de monócitos patrulhadores e o receptor CTLA-4 em pacientes CARD ($\rho=-0,80/p=0,00$). Foi observada associação significativa entre CD86 expressas por monócitos patrulhadores e CTLA-4 em pacientes CARD ($R^2=0,54/p=0,02$) (Tabela 2).

Posteriormente, utilizamos análises de regressão linear e de correlação para explorar a relação entre a expressão de CD80 e CD86 por monócitos totais e suas subpopulações no direcionamento de uma resposta Th1, Th2, Th17 e Treg em culturas TRIPO de indivíduos NI, IND e CARD. Foi encontrada correlação negativa entre CD80 e células Treg em monócitos totais no grupo NI ($\rho=-0,94/p=0,00$) e IND ($\rho=-0,73/p=0,02$) (Tabela 2).

A análise de associação entre CD80 e CD86 nas subpopulações de monócitos das culturas TRIPO de pacientes NI, IND e CARD revelou associação significativa entre CD86 de monócitos patrulhadores e células Treg de indivíduos NI ($R^2=0,79/p=0,02$). Além disso, observamos correlação negativa entre CD86 de monócitos clássicos ($\rho=-0,78/p=0,01$) e CD86 de monócitos patrulhadores ($\rho=-0,73/p=0,03$) com as células Treg de indivíduos IND. Também encontramos correlação positiva entre CD80 e CD86 com Th2 em monócitos clássicos ($\rho=0,75/p=0,02$) e patrulhadores ($\rho=0,68/p=0,04$) dos pacientes IND, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de regressão linear e correlação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 por monócitos e suas subpopulações com CD28 e CTLA-4 e linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg.

		Monócitos totais		Monócitos clássicos		Monócitos inflamatórios		Monócitos patrulhadores			
		R ² (valor de p)	ρ (valor de p)	R ² (valor de p)	ρ (valor de p)	R ² (valor de p)	ρ (valor de p)	R ² (valor de p)	ρ (valor de p)		
Não-infectado (NI)	CD80	CD28	0.73 (0.03)*	-0.03 (0.96)	0.20 (0.38)	-0.09 (0.87)	0.84 (0.01)*	-0.37 (0.47)	0.001 (0.94)	0.23 (0.66)	
		CTLA-4	0.58 (0.08)	0.93 (0.008)*	0.002 (0.93)	0.20 (0.70)	0.28 (0.28)	0.43 (0.39)	0.16 (0.43)	0.03 (0.96)	
		Th1	0.07 (0.62)	0.086 (0.87)	0.21 (0.34)	-0.43(0.40)	0.04 (0.70)	0.26(0.63)	0.18 (0.40)	0.37(0.47)	
		Th2	0.05 (0.68)	-0.54 (0.27)	0.19 (0.38)	-0.43(0.40)	0.01 (0.88)	0.09(0.87)	0.03 (0.76)	0.029(0.96)	
		Th17	0.04 (0.70)	0.029 (0.96)	0.36 (0.21)	-0.77(0.07)	0.03 (0.75)	0.09(0.87)	0.13 (0.48)	0.26(0.63)	
		Treg	0.33 (0.23)	-0.94 (0.00)*	0.27 (0.29)	-0.2 (0.70)	0.20 (0.38)	- 0.31 (0.54)	0.01 (0.89)	- 0.06 (0.87)	
		CD86	CD28	0.01 (0.84)	0.03 (0.96)	0.22 (0.34)	-0.64 (0.17)	0.38 (0.19)	-0.54 (0.27)	0.005 (0.89)	-0.26 (0.62)
	CTLA-4	0.06 (0.65)	-0.26 (0.62)	0.48 (0.13)	-0.14 (0.79)	0.04 (0.71)	-0.23 (0.66)	0.03 (0.76)	-0.20 (0.70)		
	Th1	0.27 (0.29)	0.43 (0.40)	0.02 (0.78)	-0.2 (0.7)	0.02 (0.80)	0.14 (0.79)	0.60 (0.07)	0.49 (0.33)		
	Th2	0.45 (0.14)	0.43 (0.40)	0.41 (0.17)	0.54 (0.27)	0.04(0.71)	0.43 (0.40)	0.56 (0.09)	0.54 (0.27)		
	Th17	0.04 (0.71)	0.086 (0.87)	0.048 (0.68)	-0.25(0.62)	0.01 (0.86)	0.31 (0.54)	0.64 (0.06)	-0.14(0.79)		
	Treg	0.22 (0.35)	0.66 (0.16)	0.43 (0.16)	0.77 (0.07)	0.01 (0.86)	- 0.08 (0.87)	0.79 (0.02)*	0.6 (0.21)		
	Indeterminado (IND)	CD80	CD28	0.24 (0.18)	-0.58 (0.10)	0.20 (0.23)	-0.57 (0.11)	0.009 (0.78)	-0.18 (0.64)	0.004 (0.87)	0.07 (0.86)
			CTLA-4	0.13 (0.39)	0.40 (0.32)	0.13 (0.38)	0.29 (0.49)	0.57 (0.03)*	0.86 (0.007)*	0.19 (0.29)	-0.31 (0.46)
Th1			0.10 (0.40)	0.23 (0.56)	0.03 (0.66)	0.06 (0.88)	0.01 (0.91)	0.17(0.67)	0.08 (0.45)	0.19 (0.62)	
Th2			0.28 (0.14)	0.47 (0.2)	0.41 (0.06)	0.75 (0.02)*	0.19 (0.23)	0.46(0.22)	0.27 (0.15)	-0.59(0.09)	
Th17			0.31 (0.12)	0.39 (0.29)	0.26 (0.16)	0.40 (0.28)	0.23 (0.18)	0.40(0.28)	0.06 (0.54)	-0.06(0.88)	
Treg			0.10 (0.42)	-0.73 (0.02)*	0.07 (0.49)	- 0.63 (0.07)	0.00 (0.98)	- 0.38 (0.30)	0.02 (0.72)	0.59 (0.09)	
CD86			CD28	0.16 (0.29)	-0.42 (0.26)	0.003 (0.88)	-0.08 (0.83)	0.07 (0.49)	-0.23 (0.55)	0.10 (0.41)	-0.32 (0.41)
CTLA-4		0.17 (0.30)	0.60 (0.12)	0.55 (0.04)*	0.67 (0.07)	0.10 (0.45)	0.29 (0.49)	0.10 (0.44)	0.45 (0.26)		
Th1		0.17 (0.26)	0.13(0.75)	0.004 (0.87)	0.17 (0.67)	0.04 (0.60)	-0.08(0.83)	0.15 (0.31)	0.18 (0.64)		
Th2		0.27 (0.26)	0.54(0.13)	0.08 (0.46)	0.24 (0.54)	0.26 (0.16)	0.41(0.28)	0.33 (0.10)	0.68 (0.04)*		
Th17		0.30 (0.13)	0.29(0.44)	0.03 (0.67)	0.21 (0.59)	0.38 (0.08)	0.49(0.18)	0.29 (0.13)	0.24(0.53)		
Treg		0.11 (0.38)	-0.66 (0.05)	0.22 (0.20)	-0.78 (0.01)*	0.12 (0.36)	- 0.53 (0.14)	0.10 (0.40)	- 0.73 (0.03)*		
Cardíaco (CARD)		CD80	CD28	0.003 (0.89)	0.06 (0.86)	0.003 (0.89)	0.07 (0.87)	0.16 (0.29)	0.60 (0.09)	< 0.01 (0.10)	-0.55 (0.13)
			CTLA-4	0.05 (0.55)	-0.09 (0.81)	0.05 (0.55)	-0.09 (0.81)	0.10 (0.41)	-0.44 (0.24)	0.38 (0.08)	- 0.80 (0.00)*
	Th1		0.02 (0.69)	-0.37(0.33)	0.02 (0.68)	-0.37(0.33)	0.03 (0.64)	-0.35(0.36)	0.004 (0.86)	-0.43(0.24)	
	Th2		0.04 (0.59)	0.20 (0.60)	0.04 (0.59)	0.20 (0.60)	0.18 (0.25)	-0.33(0.38)	0.06 (0.52)	-0.20(0.62)	
	Th17		0.0003 (0.96)	0.13 (0.73)	0.0003 (0.96)	0.13 (0.73)	0.09 (0.42)	-0.22(0.58)	0.008 (0.81)	-0.27(0.49)	
	Treg		0.33 (0.11)	0.27 (0.49)	0.33 (0.11)	0.27 (0.48)	0.17 (0.28)	-0.55 (0.12)	0.001 (0.93)	0.02 (0.97)	
	CD86		CD28	0.18 (0.25)	-0.50 (0.17)	0.18 (0.25)	-0.50 (0.17)	0.03 (0.64)	-0.02 (0.97)	0.23 (0.19)	0.18 (0.64)
	CTLA-4	0.81 (0.001)*	0.61 (0.08)	0.81 (0.001)*	0.60 (0.08)	0.02 (0.72)	0.29 (0.46)	0.54 (0.02)*	0.54 (0.13)		
	Th1	0.02 (0.69)	0.33 (0.38)	0.02 (0.69)	0.33 (0.38)	0.07 (0.48)	0.20(0.60)	0.15 (0.31)	0.37(0.33)		
	Th2	0.33 (0.10)	0.44 (0.23)	0.33 (0.10)	0.44 (0.23)	0.09 (0.43)	-0.38(0.32)	0.33 (0.10)	0.02(0.97)		
	Th17	0.001 (0.91)	0.30 (0.43)	0.001 (0.91)	0.30 (0.43)	0.11 (0.39)	-0.40(0.29)	0.29 (0.13)	0.02(0.97)		
	Treg	0.005 (0.84)	0.52 (0.15)	0.005 (0.84)	0.51 (0.15)	0.04 (0.59)	-0.13 (0.73)	0.10 (0.39)	0.53 (0.14)		

Treg - Linfócitos T regulatórios. Demonstramos r-squared (R²) e coeficiente de Spearman (ρ). () indica diferenças significativas (p<0.05).

5.2 CAPÍTULO 2

Com a finalidade de compreender o papel das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 presentes em monócitos e suas subpopulações no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg) foi realizado ensaio utilizando bloqueio para os receptores CD80 ou CD86 em cultura com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) provenientes de indivíduos saudáveis e com a doença de Chagas, estimuladas ou não com antígenos *in vitro* de *T. cruzi*.

5.2.1 Linfócitos T CD4⁺ de pacientes assintomáticos apresentam maior expressão de CTLA-4 após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*

Os resultados demonstraram aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em culturas sem bloqueio (PBMC) e com bloqueio de anticorpo para o receptor CD80 (α CD80) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* no grupo CARD em comparação com as culturas controles (Figura 16A). Por outro lado, aumento significativo da frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ foi observado nas culturas PBMC, α CD80 e com bloqueio de anticorpo para o receptor CD86 (α CD86) em pacientes IND após estímulo com antígenos de *T. cruzi* em comparação com a cultura controle. Também observamos maior frequência dessas células em cultura TRIPO de pacientes CARD na presença de anticorpo anti-CD80 (Figura 16C). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Linfócitos T CD4⁺

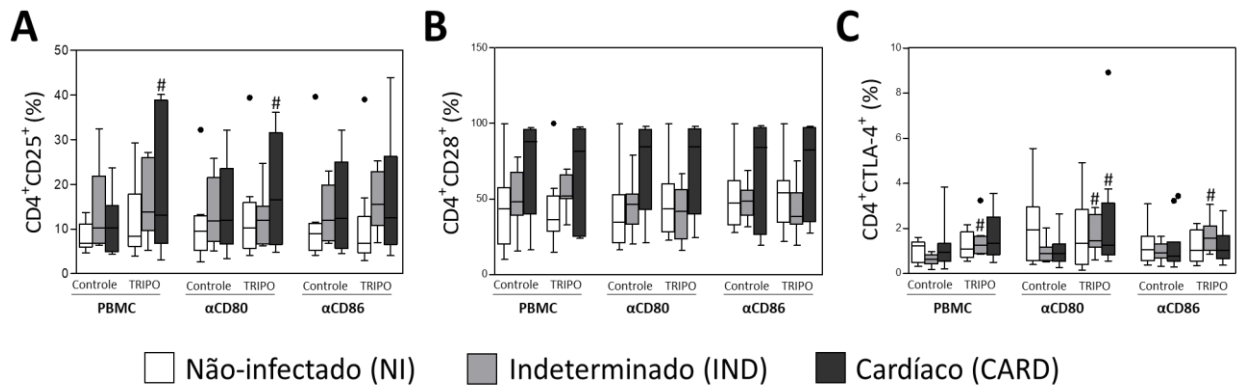


Figura 16. Análise dos marcadores de ativação em linfócitos T CD4⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Frequência de linfócitos CD4⁺CD25⁺ (A), CD4⁺CD28⁺ (B) e CD4⁺CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa (p < 0,05) entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.2.2 CD86 parece regular a expressão de CTLA-4 em linfócitos Treg de pacientes IND, enquanto CD80 regula a expressão de CD28 em Th1 de pacientes CARD

Posteriormente, avaliamos a expressão das moléculas CD28 e CTLA-4 presentes nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺, assim como a expressão das citocinas IFN-γ, IL-4, IL-17 e IL-10 expressas pelos linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg, respectivamente em cultura PBMC, αCD80 e αCD86, após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. Foi observado redução na frequência de linfócitos Th1 IFN-γ⁺ em cultura αCD80 de pacientes CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 17A). Esses pacientes também demonstraram aumento na frequência de Th1 CD28⁺ em cultura controle e TRIPO na presença de anticorpo anti-CD86 quando comparado ao grupo NI (Figura 17B). Não foram observadas outras diferenças significativas.

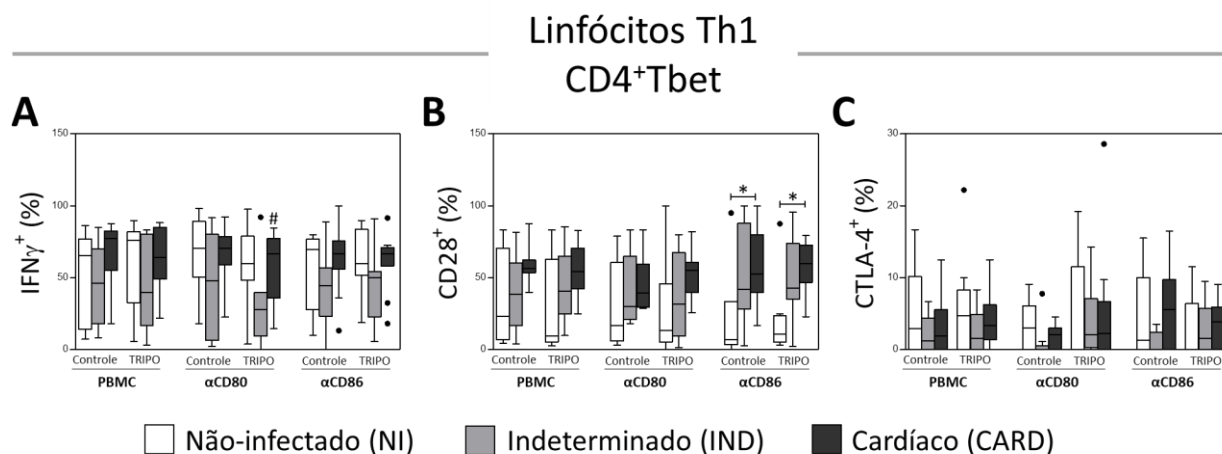


Figura 17. Expressão de IFN- γ ⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th1 CD4⁺Tbet⁺ em cultura PBMC, α CD80 e α CD86. Frequência de linfócitos Th1 IFN- γ ⁺ (A), Th1 CD28⁺ (B) e Th1 CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura α CD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura α CD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

Encontramos maior frequência de linfócitos Th2 CD28⁺ em cultura PBMC, α CD80 e α CD86 em pacientes com a doença de Chagas em comparação ao grupo NI de ambas culturas controle e TRIPO (Figura 18B). Os resultados também demonstraram maior frequência de Th2 CTLA-4⁺ em pacientes CARD quando comparados ao grupo NI em cultura PBMC controle e TRIPO. Interessantemente, foi possível observar aumento na frequência de Th2 CTLA-4⁺ em indivíduos NI na cultura α CD80 em comparação com PBMC na presença de estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 18C). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Linfócitos Th2 CD4⁺GATA3

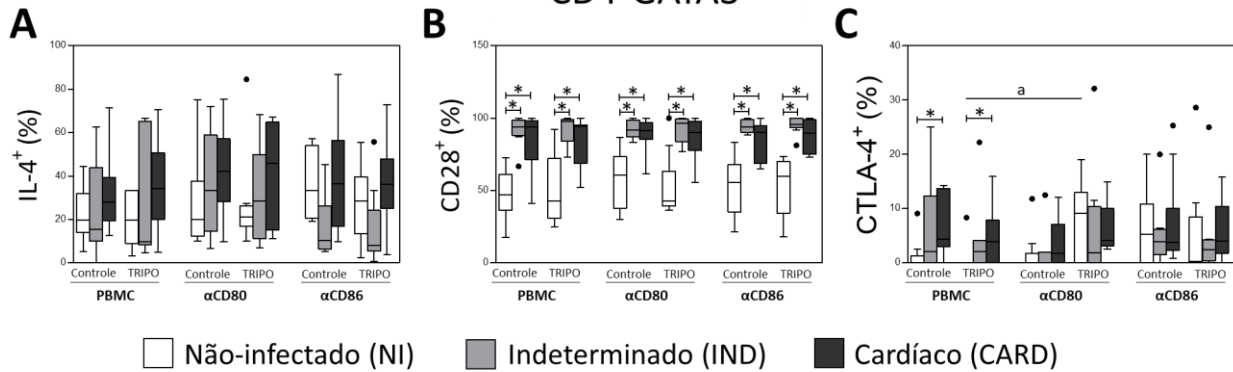


Figura 18. Expressão de IL-4⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th2 CD4⁺GATA3⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Frequência de linfócitos Th2 IL-4⁺ (A), Th2 CD28⁺ (B) e Th2 CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. (a) representa diferença significativa observada entre PBMC e αCD80 no grupo NI em cultura TRIPO. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

A partir da análise dos dados observamos maior frequência de linfócitos Th17 CD28⁺ em pacientes IND em comparação com grupo NI em cultura PBMC e αCD80 na presença e na ausência de antígenos de *T. cruzi*, respectivamente. Também detectamos maior frequência dessa subpopulação de linfócitos em cultura PBMC de pacientes CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 19B). Não foram observadas diferenças significativas referentes aos dados obtidos de linfócitos Th17 IL-17⁺ e Th17 CTLA-4⁺ nos diferentes estímulos e nos grupos avaliados.

Linfócitos Th17 CD4⁺RORγT⁺

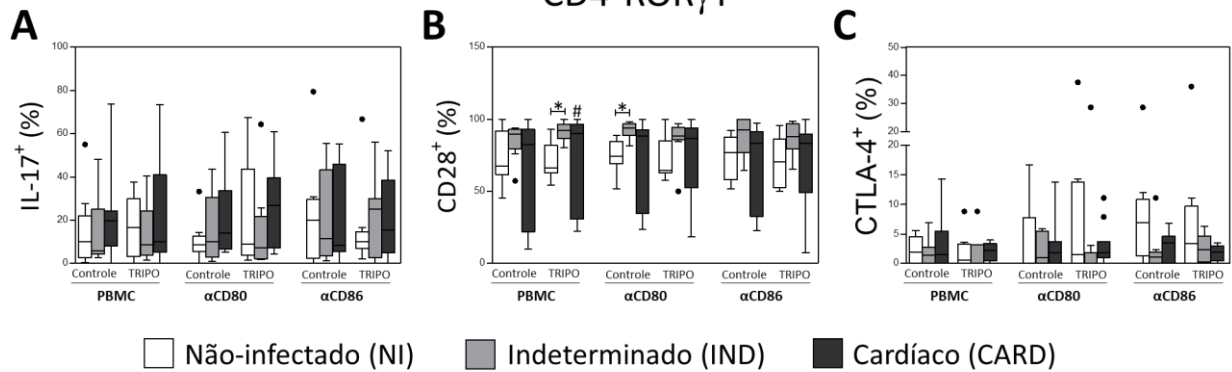


Figura 19. Expressão de IL-17⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Th17 CD4⁺RORγT⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Frequência de linfócitos Th17 IL-17⁺ (A), Th17 CD28⁺ (B) e Th17 CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

Por fim, avaliamos a expressão de IL-10, CD28 e CTLA-4 em linfócitos Treg e observamos maior frequência de células Treg IL-10⁺ em cultura TRIPO de pacientes CARD na presença de anticorpo anti-CD86 quando comparado ao grupo NI (Figura 20A). Além disso, foi possível observar aumento na frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ no grupo IND e CARD em culturas PBMC e αCD80, respectivamente, após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*. Em cultura na presença de anticorpo anti-CD86 foi observado aumento da frequência dos linfócitos Treg CTLA-4⁺ em pacientes IND e CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, porém, apenas pacientes IND demonstraram menor frequência dessa população celular em comparação ao grupo NI na cultura controle (Figura 20C). Outras diferenças significativas não foram observadas.

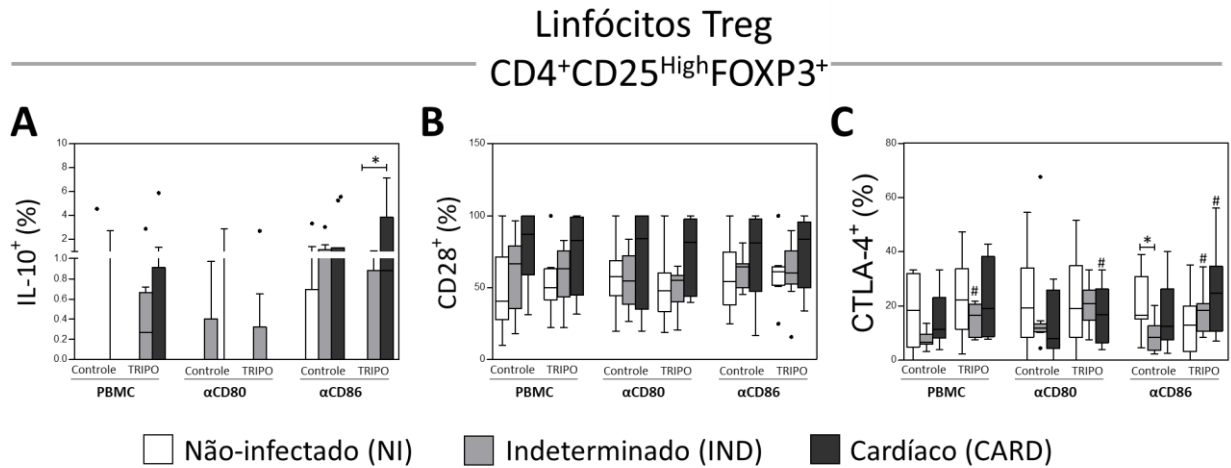


Figura 20. Expressão de IL-10⁺ e dos marcadores de ativação em linfócitos Treg CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Frequência de linfócitos Treg IL-10⁺ (A), Treg CD28⁺ (B) e Treg CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores outliers.

5.2.3 A proporção de linfócitos Treg CTLA-4⁺ em cultura αCD80 e αCD86 apresentam um padrão de expressão oposto em pacientes IND e CARD

Como descrito anteriormente, em cultura na presença de anticorpo anti-CD86, pacientes IND apresentam redução da frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺, enquanto pacientes CARD apresentam aumento na frequência de Th1 CD28⁺. Assim, analisamos as proporções de linfócitos Treg CTLA-4⁺ e Th1 CD28⁺ em pacientes com doença de Chagas e indivíduos saudáveis após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. Foi possível observar maior proporção de CTLA-4 na cultura PBMC no grupo NI quando comparado aos pacientes com Chagas. Com o bloqueio de CD80, interessantemente ocorreu aumento da frequência das células Treg CTLA-4⁺ apenas em pacientes IND, assim como a redução dessa população celular foi observada no grupo CARD. Por outro lado, a cultura αCD86 reduziu a frequência de Treg CTLA-4⁺ em pacientes IND, assim como aumentou a frequência dessa subpopulação de linfócitos apenas em pacientes CARD (Figura 21A).

Quando avaliamos a proporção de Th1 CD28⁺ observamos maior frequência dessa população celular em pacientes com doença de Chagas quando comparado aos indivíduos NI em cultura PBMC. Com o bloqueio de CD80 é possível observar uma pequena redução da frequência de Th1 CD28⁺ em pacientes IND e um pequeno aumento no grupo CARD. Na cultura αCD86 é possível observar um pequeno aumento da frequência de Th1 CD28⁺ no grupo IND (Figura 21B).

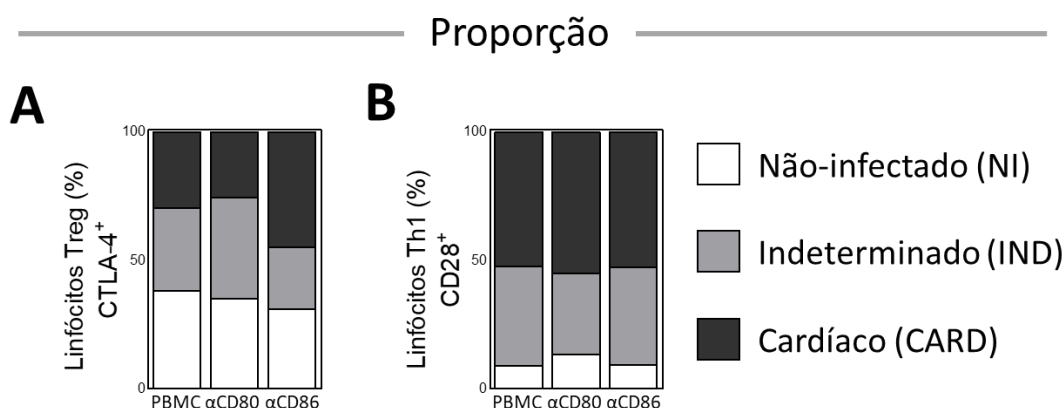


Figura 21. Proporção da frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ e Th1 CD28⁺ após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Proporção de CTLA-4 expresso por células Treg (A) e de CD28 expresso por células Th1 (B) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas.

5.2.4 Linfócitos Treg apresentam a maior expressão de CTLA-4 quando comparado às outras subpopulações de células T CD4⁺

Nosso próximo passo foi avaliar a frequência dos receptores CTLA-4 e CD28 expressos pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em culturas estimuladas com antígenos de *T. cruzi* de indivíduos NI, IND e CARD. Foi possível observar maior frequência de CTLA-4 expressos por linfócitos Treg quando comparado as subpopulações Th2 e Th17 em culturas PBMC de indivíduos NI. Também observamos alta frequência desse receptor em células Treg em comparação com Th1 e Th17 em cultura PBMC, Th17 em cultura αCD80, e Th1, Th2, Th17 em cultura αCD86 no grupo IND. No grupo CARD foi observado alta frequência de CTLA-4 também em células Treg quando comparado aos linfócitos Th1, Th2 e Th17 em cultura PBMC e αCD86 e em Th1 e Th17 em cultura αCD80 (Figura 22A).

Os dados demonstraram alta frequência de CD28 expressos por linfócitos Th17 quando comparado a Th1 em culturas PBMC, αCD80 αCD86 e alta frequência de CD28 expresso por

Treg quando comparado a Th1 em cultura α CD86 no grupo NI. Também foi possível observar maior frequência desse receptor em linfócitos Th2 quando comparado a Th1 e Treg, e Th17 quando comparado a Th1 em todas as culturas PBMC, α CD80 α CD86 do grupo IND. Além disso, maior frequência de CD28 em células Th17 foi observada quando comparado a Treg nas culturas PBMC e α CD80 em pacientes IND. Por outro lado, no grupo CARD os dados demonstraram maior frequência de CD28 em células Th2 quando comparado a Th1 nas três culturas avaliadas (Figura 22B).

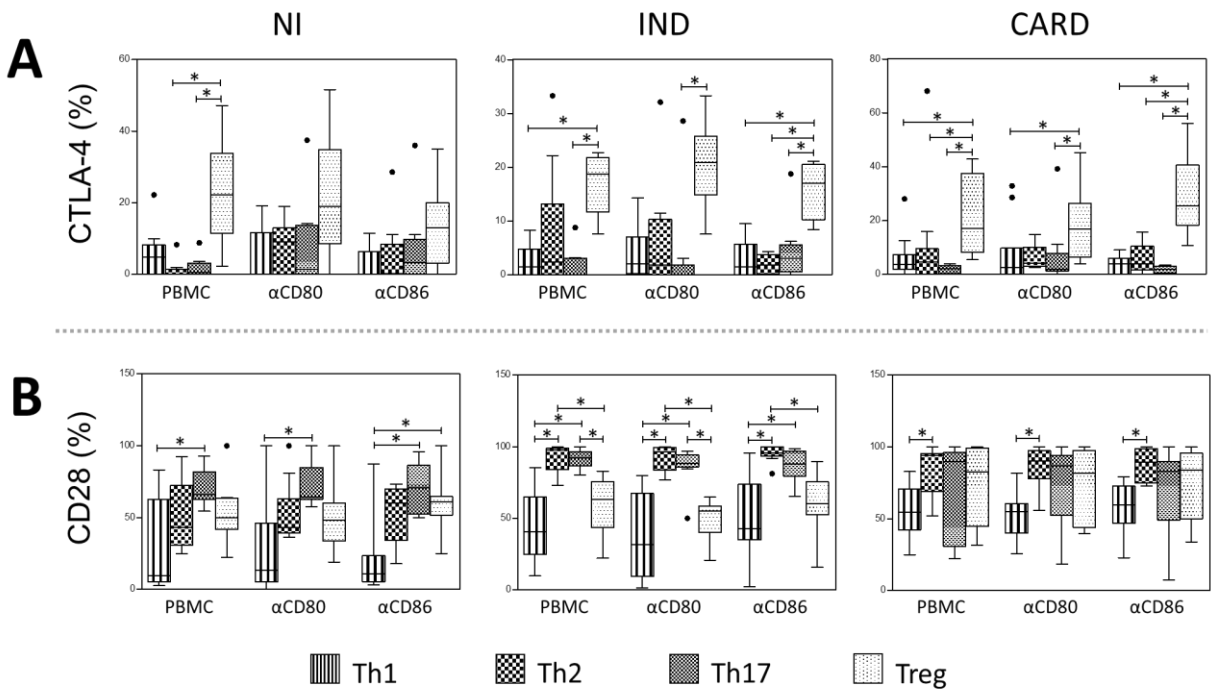


Figura 22. Análise da frequência dos marcadores de ativação nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC, α CD80 e α CD86. Frequência da expressão de CTLA-4 (A) e CD28 (B) em linfócitos Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura α CD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura α CD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as subpopulações são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.2.5 Bloqueio do receptor CD86 correlaciona negativamente com a expressão de CTLA-4 em linfócitos Treg de pacientes assintomáticos

Posteriormente, avaliamos a correlação existente os monócitos e suas subpopulações em cultura PBMC, α CD80 e α CD86 após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* com a

expressão de CTLA-4 e CD28 expressos pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e Treg) em indivíduos NI, IND e CARD.

Quando analisamos os dados referentes à cultura PBMC foi possível observar correlação positiva significativa entre os monócitos inflamatórios ($\rho=0,83/p=0,005$) e patrulhadores ($\rho=0,81/p=0,007$) com linfócitos Th1 CTLA-4⁺ no grupo NI. Os dados também demonstraram correlação positiva significativa entre monócitos patrulhadores com Th1 CD28⁺ ($\rho=0,66/p=0,04$) e Th1 CTLA-4⁺ ($\rho=0,69/p=0,03$) e entre monócitos clássicos e Treg CD28⁺ ($\rho=0,66/p=0,04$) no grupo IND. Correlação negativa significativa foi observada entre monócitos patrulhadores e linfócitos Th2 CTLA-4⁺ ($\rho=-0,77/p=0,004$) no grupo CARD (Figura 23A).

Na cultura α CD80 foi verificado correlação significativa positiva entre monócitos patrulhadores e Th1 CTLA-4⁺ ($\rho=0,67/p=0,04$) e correlação negativa ente monócitos inflamatórios e Th17 CD28⁺ ($\rho=-0,75/p=0,01$) no grupo NI. Observamos apenas uma correlação positiva significativa no grupo IND entre monócitos patrulhadores e Th1 CD28⁺ ($\rho=0,71/p=0,02$). Os dados também demonstraram correlação significativa positiva entre monócitos clássicos e Th1 CTLA-4⁺ ($\rho=0,77/p=0,005$) e entre monócitos patrulhadores e Th2 CD28⁺ ($\rho=0,71/p=0,01$), assim como uma correlação negativa entre monócitos patrulhadores e Th1 CTLA-4⁺ ($\rho=-0,74/p=0,008$) no grupo CARD (Figura 23B).

Quando avaliamos os resultados referentes à cultura α CD86 foi observado correlação negativa entre monócitos totais e monócitos inflamatórios com Th17 CD28⁺ ($\rho=-0,69/p=0,03$) e Th2 CD28⁺ ($\rho=-0,76/p=0,01$), respectivamente, no grupo NI. Observamos correlação significativa positiva entre monócitos totais e Th2 CTLA-4⁺ ($\rho=0,89/p=0,001$) e Th17 CTLA-4⁺ ($\rho=0,74/p=0,02$), assim como entre monócitos patrulhadores e Th2 CTLA-4⁺ ($\rho=0,86/p=0,002$) no grupo IND. Interessantemente, foi encontrado apenas correlação negativa significativa ente os monócitos clássicos e Treg CTLA-4⁺ ($\rho=-0,71/p=0,02$) nesse mesmo grupo de pacientes. Não foram observadas correlações significativas ente as populações celulares avaliadas no grupo CARD (Figura 23C).

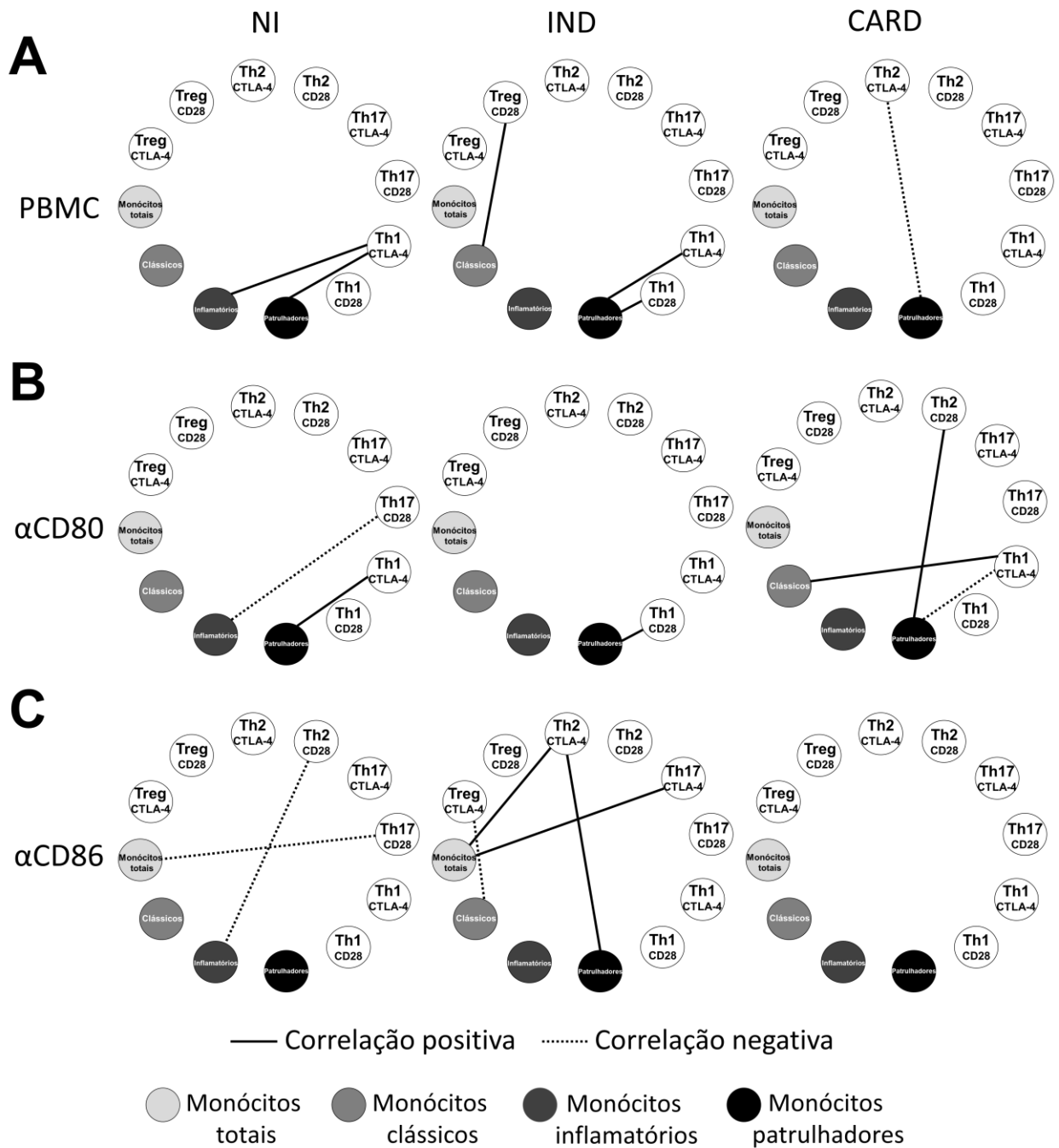


Figura 23. Análise de correlação entre os monócitos e suas subpopulações com a expressão de CD28 e CTLA-4 pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Correlação dos monócitos e suas subpopulações com a expressão de CD28 e CTLA-4 em linfócitos Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* na ausência de bloqueio (cultura PBMC) (A), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) (B) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86) (C). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. As linhas inteiras demonstram correlações significativamente (p < 0,05) positivas e linhas pontilhadas correlações significativamente negativas entre as populações celulares.

5.2.6 A presença do receptor CD86 em monócitos parece direcionar maior frequência de células Treg em pacientes IND

Nosso último passo foi avaliar a frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17 e Treg) em culturas com anticorpo anti-CD80 e anti-CD86 em pacientes com doença de Chagas e indivíduos saudáveis. Nossos resultados demonstraram maior frequência de linfócitos Th2 em pacientes CARD quando comparado ao grupo NI após estímulo com antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC e α CD80, e na cultura controle na presença de anticorpo anti-CD86. Observamos também aumento da frequência de linfócitos Th2 em cultura α CD80 de pacientes IND após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 24B).

Verificamos aumento da frequência de linfócitos Th17 em cultura controle na presença de anticorpo anti-CD80 apenas em pacientes CARD quando em comparação com grupo NI (Figura 24C). Por outro lado, na cultura PBMC, células Treg demonstraram altamente expressas em pacientes IND em comparação com o grupo CARD na cultura controle, e em comparação com grupo NI na cultura TRIPO. Além disso, pacientes IND apresentaram maior frequência de linfócitos Treg quando comparado aos grupos NI e CARD na cultura controle, e quando comparado ao grupo NI na cultura TRIPO em α CD80 e α CD86. Também observamos aumento dessa subpopulação de linfócitos em pacientes CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi* nas culturas PBMC, α CD80 e α CD86 e no grupo NI na cultura α CD86 (Figura 24D).

Linfócitos T CD4⁺

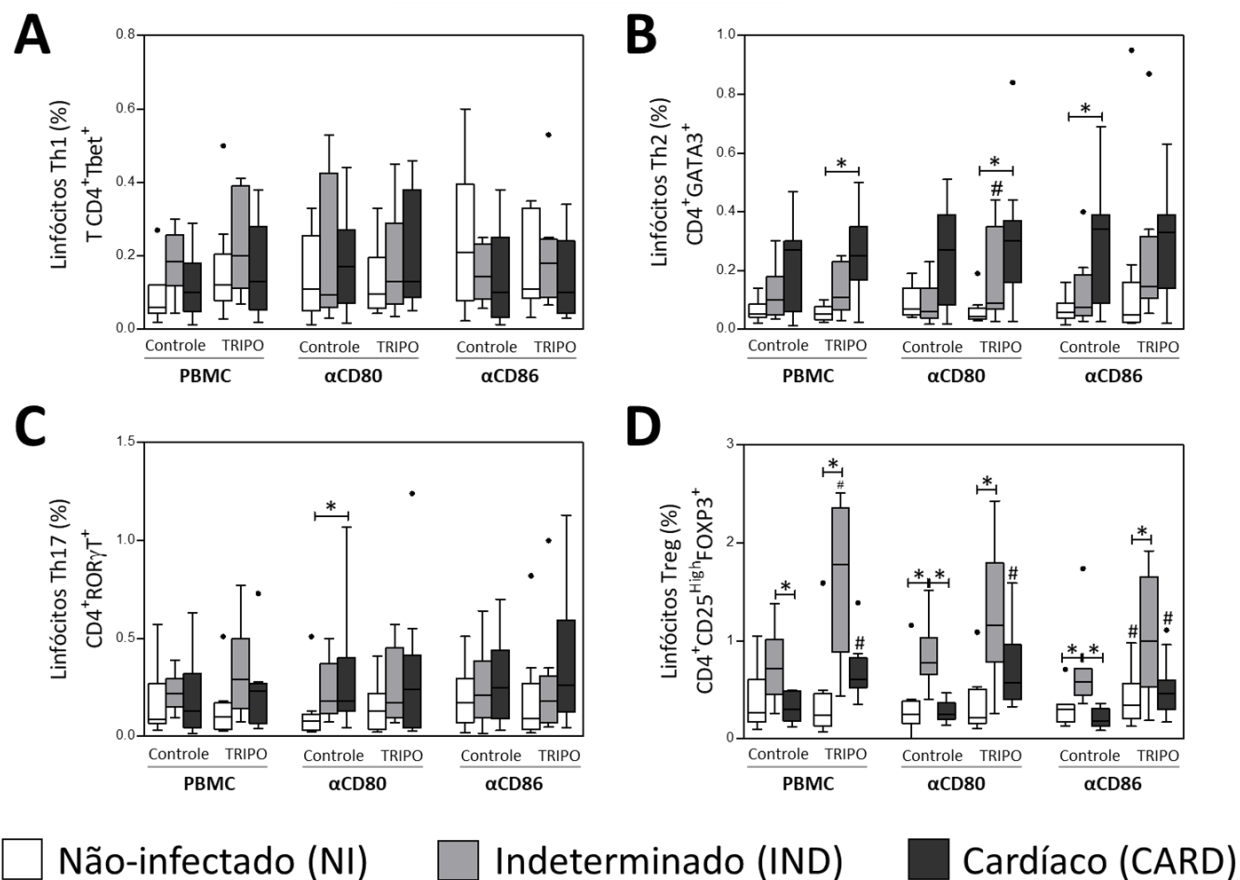


Figura 24. Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em cultura PBMC, αCD80 e αCD86. Frequência das subpopulações de linfócitos Th1 (A), Th2 (B), Th17 (C) e T reguladores (Treg) (D) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura αCD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura αCD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

Posteriormente, analisamos a proporção das subpopulações de linfócitos após estímulo com antígenos de *T. cruzi* em indivíduos NI, IND e CARD e foi possível observar mesma proporção de células Treg no grupo NI e IND em cultura PBMC. De forma interessante, verificamos aumento da frequência de linfócitos Treg apenas em pacientes IND e uma redução no grupo CARD em cultura α CD80 quando comparado a cultura PBMC. Por outro lado, em cultura α CD86 houve uma redução da frequência de Treg em pacientes IND, assim como aumento de Th1 no grupo NI e de Th2 e Th17 no grupo CARD quando comparado as culturas PBMC e α CD80 (Figura 25).

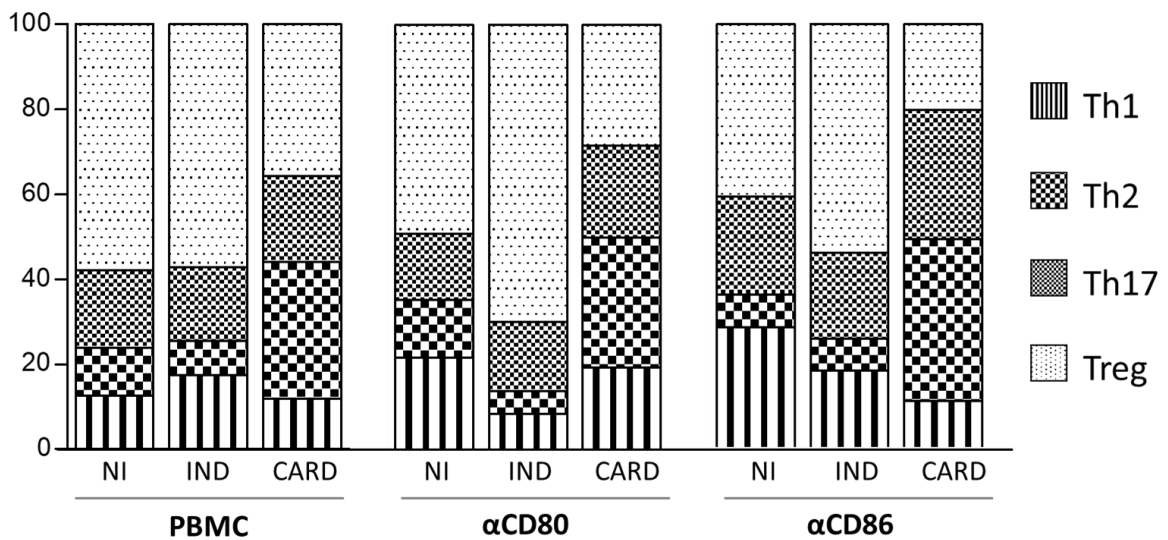


Figura 25. Proporção das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ após estimulação *in vitro* de antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC, α CD80 e α CD86. Proporção da frequência de linfócitos Th1, Th2, Th17 e T reguladores (Treg) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura α CD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura α CD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas.

5.3 CAPÍTULO 3

Nosso último objetivo foi compreender a atuação das moléculas CD80 e CD86 expressas por monócitos totais e suas subpopulações na interação com CD28 e CTLA-4 presentes em linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores através da realização de um ensaio funcional com bloqueio para CD80 e CD86 em cultura com células provenientes de indivíduos NI, IND e CARD.

5.3.1 Pacientes CARD apresentam maior frequência de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺

Os dados demonstraram aumento geral na frequência de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ em pacientes com doença de Chagas em comparação com grupo NI em culturas PBMC, α CD80 e α CD86 (Figura 26A). Análise dos dados demonstrou maior frequência de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ em pacientes CARD quando comparado ao grupo NI na ausência e na presença de antígenos *in vitro* de antígenos de *T cruzi* em culturas PBMC, α CD80 e α CD86. Houve maior frequência dessa população de células em pacientes IND quando comparado ao grupo NI na cultura controle e TRIPO em PBMC e na cultura controle na presença de anticorpo anti-CD86 (Figura 26B). Outras diferenças significativas não foram observadas.

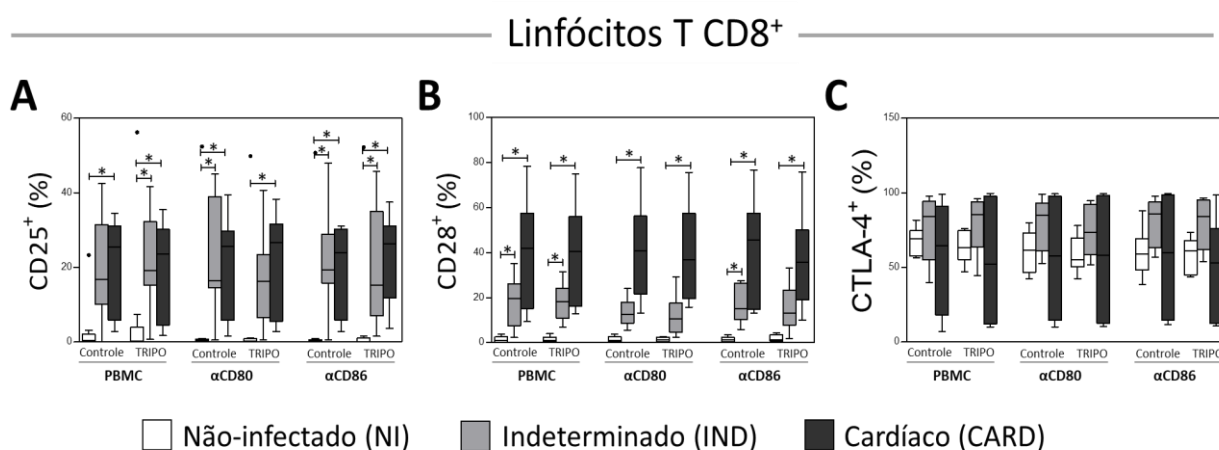


Figura 26. Análise dos marcadores de ativação em linfócitos T CD8⁺ em cultura PBMC, α CD80 e α CD86. Frequência de linfócitos CD8⁺CD25⁺ (A), CD8⁺CD28⁺ (B) e CD8⁺CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura α CD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura α CD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p <0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.3.2 Pacientes com a forma clínica IND apresentam maior frequência de linfócitos CD8⁺ Treg, CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ e CD8⁺ Treg IL-10⁺

De modo geral, os resultados demonstraram maior frequência de linfócitos CD8⁺ Treg em pacientes IND quando comparado aos grupos NI e CARD na ausência e na presença de antígenos de *T. cruzi* em cultura PBMC, αCD80 e αCD86 (Figura 27A). Observamos também aumento na frequência de linfócitos CD8⁺ Treg IL-10⁺ no grupo IND quando comparados aos grupos NI e CARD em cultura TRIPO e controle em PBMC e αCD80, respectivamente. Também observamos maior frequência dessa população celular no grupo IND em comparação ao grupo NI em cultura controle na presença de anticorpo anti-CD86 (Figura 27B).

Quando foi avaliado a expressão de CD28 e CTLA-4 em células T CD8⁺ Treg verificamos maior frequência de linfócitos CD8⁺ Treg CD28⁺ em pacientes CARD quando comparado ao grupo NI na ausência e na presença de antígenos *in vitro* de antígenos de *T. cruzi* em culturas PBMC, αCD80 e αCD86. Interessantemente, observamos maior frequência de células CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ apenas de pacientes IND quando comparado ao grupo NI em cultura TRIPO na presença de anticorpo anti-CD80 (Figura 27C). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Linfócitos Treg CD8⁺CD25^{High}FOXP3⁺

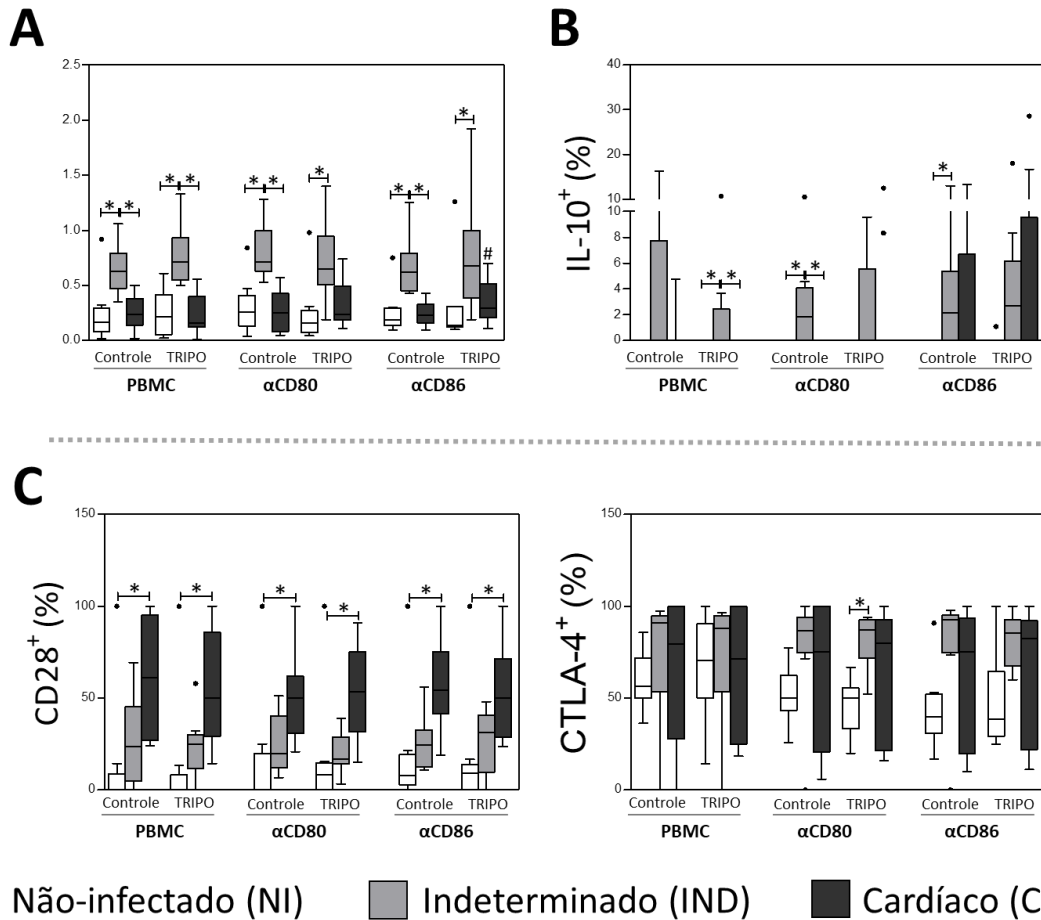


Figura 27. Expressão de IL-10 e dos marcadores de ativação em linfócitos CD8⁺ Treg em cultura PBMC, α CD80 e α CD86. Frequência de linfócitos CD8⁺ Treg (A), CD8⁺ Treg IL-10⁺ (B) e CD8⁺ Treg CD28⁺ e CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ (C) em cultura sem estímulo (controle) e após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (TRIPO) na ausência de bloqueio (cultura PBMC), presença de bloqueio para o receptor CD80 (cultura α CD80) e de bloqueio para o receptor CD86 (cultura α CD86). Os grupos avaliados foram indivíduos não-infectados NI (n = 9), forma clínica indeterminada (IND, n = 9) e cardíaca (CARD, n = 11) da doença de Chagas. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos são evidenciadas por linhas e asteriscos (*) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. O octothorpe (#) indica a diferença estatística significativa (p < 0,05) entre a cultura controle e TRIPO através do teste Wilcoxon. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. O círculo preenchido em preto representa os valores *outliers*.

5.3.3 Bloqueio de CD80 parece estar relacionado negativamente com CD28, assim como o bloqueio de CD86 relaciona-se negativamente com CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺Treg

Posteriormente, avaliamos a correlação existente entre os monócitos e suas subpopulações em cultura PBMC, α CD80 e α CD86 após estimulação com antígenos de *T. cruzi* com a frequência da expressão de CD28 e CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores nos grupos NI, IND e CARD.

Quando analisamos os dados referentes à cultura PBMC foi possível observar correlação positiva significativa entre os monócitos clássicos com linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ ($\rho=0,69/p=0,01$) e linfócitos CD8⁺ Treg CD28⁺ ($\rho=0,68/p=0,02$) em pacientes CARD. Na cultura α CD80 observamos correlação negativa significativa entre os monócitos totais e linfócitos T CD8⁺ CTLA-4⁺ ($\rho=-0,75/p=0,01$) em indivíduos NI e entre monócitos inflamatórios com linfócitos T CD8⁺ Treg CD28⁺ ($\rho=-0,62/p=0,03$) em pacientes CARD. A análise na cultura α CD86 permitiu verificar correlação negativa significativa entre os monócitos patrulhadores com linfócitos T CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ ($\rho=-0,73/p=0,02$) no grupo NI (Tabela 3). Outras diferenças significativas não foram observadas.

Tabela 3. Análise das correlações significativas entre monócitos e suas subpopulações com a expressão de CD28 e CTLA-4 por linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores em cultura PBMC, α CD80 e α CD86.

	Monócitos	Variável	Grupo avaliado	ρ (valor de p)
PBMC	Monócitos clássicos	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CARD	0,69 (0,01)
	Monócitos clássicos	CD8 ⁺ TregCD28 ⁺	CARD	0,68 (0,02)
α CD80	Monócitos totais	CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺	NI	-0,75 (0,01)
	Monócitos inflamatórios	CD8 ⁺ TregCD28 ⁺	CARD	-0,62 (0,03)
α CD86	Monócitos patrulhadores	CD8 ⁺ TregCTLA-4 ⁺	NI	-0,73 (0,02)

*Demonstramos apenas correlações que obtiveram diferenças significativamente ($p<0,05$) após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*

6 DISCUSSÃO

A heterogeneidade das manifestações clínicas na doença de Chagas 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 pró-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 presença de células Treg e 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 pró-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.*, 2012a; 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 imunopatologia na doença de Chagas é encontrar um biomarcador 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 de que os monócitos e os linfócitos através da expressão e produção de suas moléculas podem estar 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). Os monócitos são células importantes do sistema imunológico inato por sua capacidade de processar e apresentar antígenos, produzir citocinas, expressar moléculas co-estimuladoras e ativar a resposta imune adaptativa subsequente (Souza *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre as subpopulações de monócitos na doença de Chagas e a influência das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 na modulação da resposta imune em pacientes com

as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas. Dada a importância dos monócitos e linfócitos T nos processos imunorreguladores, no capítulo 1 da presente tese caracterizamos o perfil fenotípico-funcional de monócitos e suas subpopulações e investigamos o papel das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 presentes nessas populações celulares no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg), após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi* nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

A partir do presente trabalho observamos frequência reduzida de monócitos totais em pacientes CARD, mas não no grupo IND. Além disso, também foi observada redução na frequência dos monócitos inflamatórios no grupo CARD após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. Estudos propõem que os monócitos inflamatórios são uma população celular de transição entre as subpopulações de monócitos clássicos e patrulhadores (Wong *et al.*, 2011). Propomos que, na presença de antígenos de *T. cruzi*, essas células possam se diferenciar em monócitos clássicos e/ou patrulhadores, sendo importante para modular a resposta imune. Estudos anteriores relataram que os monócitos podem estar envolvidos na regulação da resposta imune pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na doença de Chagas (Gomes *et al.*, 2003; 2013). Assim, sugerimos que o *T. cruzi* possa induzir a redução da frequência de monócitos em pacientes CARD, principalmente de monócitos inflamatórios, contribuindo para formação de um ambiente pró-inflamatório que pode estar envolvido com o dano tecidual observado nesses pacientes.

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 (GIPL) presente na membrada de parasitos em diferentes formas evolutivas (Rodrigues *et al.*, 2012b). Por outro lado, os motivos de CpG não metilados presentes no genoma de *T. cruzi* são reconhecidos pelos receptores TLR-9 (Bartholomeu *et al.*, 2008; Gravina *et al.*, 2013). Demonstramos que a expressão de moléculas associadas ao reconhecimento de antígenos foi reduzida em pacientes com doença de Chagas, principalmente a expressão de TLR-9 no grupo assintomático. A ativação do TLR-9 apresenta papel primordial na indução MyD88 que é dependente da síntese de IL-12 e IFN- γ durante a infecção experimental por *T. cruzi* e contribui para a formação de um ambiente pró-inflamatório (Bafica *et al.*, 2006). A regulação desses receptores em monócitos pode ser um importante evento no direcionamento da redução da capacidade de reconhecimento antigênico dessas células, assim

como um mecanismo desenvolvido por pacientes assintomáticos para controlar a inflamação exacerbada e regular a resposta imune. Além disso, a expressão de TLR-2 e TLR-4 está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias na cardiomiopatia chagásica, enquanto em pacientes assintomáticos esses receptores estão predominantemente associados à produção de IL-10 e TGF- β (Mendes da Silva *et al.*, 2016). Em concordância, observamos que pacientes com a doença de Chagas apresentaram maior expressão de IL-12, e apenas os pacientes IND demonstraram aumento da produção de IL-10. Estes resultados sugerem que os monócitos de pacientes IND e CARD induzem uma resposta inflamatória produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, que desencadeiam uma resposta mediada por linfócitos Th1 para controlar a infecção. No entanto, mais uma vez, apenas pacientes assintomáticos parecem regular a resposta inflamatória pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10, evitando assim a progressão da inflamação.

Nossos resultados também demonstraram aumento da expressão de HLA-DR em monócitos clássicos de pacientes com doença de Chagas. Por outro lado, menor expressão dessa molécula foi detectada em monócitos inflamatórios apenas em indivíduos IND. As principais características dos monócitos clássicos são sua alta capacidade fagocítica e perfil pró-inflamatório (Thaler *et al.*, 2016; Grad *et al.*, 2017). Nosso grupo demonstrou que monócitos provenientes de pacientes assintomáticos apresentavam redução na capacidade fagocítica e da expressão de HLA-DR quando comparado aos grupos NI e CARD (Gomes *et al.*, 2012). Sugerimos que a expressão de HLA-DR por monócitos clássicos em pacientes com doença de Chagas está associada ao aumento da capacidade de fagocitose e apresentação antigênica dessas células para controlar a infecção e também para ativar a resposta imune mediada por células T. Por outro lado, a menor expressão de HLA-DR em monócitos inflamatórios apenas em pacientes assintomáticos pode ser uma forma de reduzir a inflamação e evitar danos teciduais.

As moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 expressas em monócitos de pacientes com doença de Chagas após indução por antígenos de *T. cruzi* são importantes para a ativação de células T (Soares *et al.*, 2016). No entanto, nenhum estudo até o momento demonstrou a associação da expressão dessas moléculas nas diferentes subpopulações de monócitos em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Observamos que monócitos clássicos de pacientes com doença de Chagas aumentaram a expressão de CD80. Por outro lado, monócitos totais e todas suas subpopulações apresentaram alta expressão de CD86 apenas no grupo IND. Além disso, a expressão de CD86 em monócitos de pacientes assintomáticos foi superior à expressão de CD80. Propomos que a expressão de CD80 possa estar envolvida na ativação de células T em pacientes com a doença de Chagas, enquanto CD86 pode estar

associado à sua inibição, diminuindo a resposta das células T efetoras em pacientes assintomáticos. Estudos anteriores demonstraram que a exposição de monócitos ao *T. cruzi* leva a um aumento na frequência de CD80 por monócitos de pacientes IND e CARD (Souza *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2016), enquanto a expressão de CD86 é reduzida em indivíduos CARD, mas não em pacientes IND (Souza *et al.*, 2007). Sugerimos que essas moléculas co-estimuladoras tenham funções opostas e provavelmente apresentem um papel fundamental na ativação das células T na doença de Chagas.

Para avaliar o efeito das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 na ativação ou inibição dos linfócitos T totais, analisamos a relação entre essas moléculas e seus ligantes CD28 e CTLA-4. A interação de CD80 e CD86 com CD28 desencadeia a ativação de células T, promovendo a produção de IL-2 e a proliferação de linfócitos, enquanto a ligação ao CTLA-4 inibe a ativação de linfócitos, regulando assim a resposta imune. (Lenschow *et al.*, 1993; Hathcock *et al.*, 1994; Linsley *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2012). A frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ demonstrou-se aumentada em pacientes com doença de Chagas, principalmente no grupo IND. Também observamos uma associação entre CD80 e CD28 e entre CD86 e CTLA-4. É possível que, após a infecção por *T. cruzi*, o receptor CD80 se ligue ao CD28 e promova a ativação dos linfócitos T CD4⁺, desencadeando uma resposta inflamatória. Por outro lado, a associação de CD86 com CTLA-4 em pacientes assintomáticos sugere a inibição das células T e a modulação da resposta imune. Corroborando com nossos resultados, Souza e colaboradores demonstraram maior frequência dessa molécula inibitória em pacientes IND, mas não em pacientes com CARD (Souza *et al.*, 2007). CTLA-4 também implicou na modulação da resposta imune na presença de *T. cruzi* afetando os mecanismos que controlam a produção de IFN- γ e óxido nítrico durante a fase aguda da doença de Chagas (Martins *et al.*, 2004). Assim, propomos que a interação da molécula co-estimuladora CD86 com CTLA-4 em pacientes assintomáticos possa ser um mecanismo de imunorregulação para prevenir danos teciduais e dessa forma a progressão da patologia chagásica.

Pacientes com a doença de Chagas demonstraram menor frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ Th1, Th2 e Th17 quando comparado ao grupo NI. Entretanto, a proporção de células Treg foi mais alta em pacientes assintomáticos. Além disso, apenas CD86 presentes em monócitos patrulhadores foi associado às células Treg, enquanto CD80 expresso em monócitos totais apresentou correlação negativa com essas células reguladoras apenas nos grupos sem cardiomiopatia (NI e IND). Acreditamos que CD86 possa ativar as células Treg, principalmente em pacientes IND, uma vez que demonstraram maior expressão de CD86 e proporção de células Treg.

Neste primeiro capítulo constatamos que a expressão do CD86 pode controlar a resposta imune ligando-se à CTLA-4 e direcionando a resposta por linfócito Treg em IND, mas não em pacientes com CARD. Assim, sugerimos que CD86 é uma molécula chave para direcionar a imunorregulação em pacientes assintomáticos, controlar a resposta imune e prevenir a fibrose progressiva no coração. Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar a atuação dessas moléculas com seus ligantes expressos em cada subpopulação de linfócitos T CD4⁺, assim como compreender e confirmar o papel dessas moléculas de co-estimulação no direcionamento das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Th17, Treg). Para isso foi realizado um ensaio utilizando bloqueio para os receptores CD80 ou CD86 em cultura com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) provenientes de indivíduos saudáveis e com a doença de Chagas, estimuladas ou não com antígenos *in vitro* de *T. cruzi*.

Nossos resultados demonstraram maior frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ no grupo CARD após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* na cultura com bloqueio para CD80. A molécula de ativação CD25 é uma subunidade do receptor IL-2R expressa principalmente por linfócitos T CD4⁺ ativados, efetores e de memória, que se ligam à citocina IL-2 de forma autócrina, iniciando a expansão clonal (Sakaguchi *et al.*, 1995; Hashemi *et al.*, 1999; Setoguchi *et al.*, 2005; Triplett *et al.*, 2012; Bolkun *et al.*, 2016). PBMC de pacientes com doença de Chagas apresentaram maior resposta proliferativa contra antígenos de *T. cruzi* quando comparado aos indivíduos não-infectados (Gomes *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que pacientes CARD apresentam maior capacidade de ativação e proliferação linfocitária, levando à formação de um microambiente inflamatório e ao comprometimento tecidual, como é visto nos pacientes com cardiopatia chagásica.

Observamos também aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺ em pacientes IND após estímulo com antígenos de *T. cruzi* na cultura com bloqueio para CD80 e CD86. Estudo demonstrou maior expressão de CTLA-4 na superfície das células T CD4⁺ de pacientes indeterminados, mas não com forma clínica CARD após exposição de monócitos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2007). Propomos que pacientes com a forma clínica indeterminada apresenta aumento da expressão dessa molécula inibitória em linfócitos T CD4⁺ totais levando à modulação da resposta imune.

Os monócitos são células importantes para o reconhecimento de microrganismo, assim como para a ativação subsequente da imunidade adquirida, podendo promover a diferenciação dos linfócitos em Th1, Th2, Th17 e Treg. Entretanto, nenhum estudo até o momento demonstrou a frequência dessas subpopulações de linfócitos após bloqueio dos receptores CD80

ou CD86 expressos por monócitos e suas subpopulações em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Muito se sabe a respeito do papel dos linfócitos Th1 na doença de Chagas (Gomes *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2014, Bonney *et al.*, 2015). Essa subpopulação celular inicia e participa das reações imunes através da ativação eficiente de macrófagos para controlar a replicação do parasito durante a fase aguda da doença (Teixeira *et al.*, 2011; Bonney *et al.*, 2015), assim como contribui para o aumento do processo inflamatório durante a fase crônica (Bonney *et al.*, 2015), principalmente em pacientes que apresentam a forma clínica cardíaca da doença de Chagas (Gomes *et al.*, 2005). Souza e colaboradores (2004) demonstraram que monócitos de pacientes CARD induziam resposta inflamatória através da expressão de TNF- α . Outros trabalhos observaram que a produção de IFN- γ e TNF- α 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). Pacientes CARD também apresentam um desbalanço entre a produção de IFN- γ e IL-10, indicando um processo inflamatório descontrolado que agrava a cardiopatia (D'avila *et al.*, 2009). Entretanto, nossos resultados demonstraram redução na frequência de linfócitos Th1 IFN- γ ⁺ apenas na cultura na presença de anticorpo anti-CD80 em pacientes CARD. Besteti e colaboradores (2019) observaram maior expressão dos níveis plasmáticos de citocinas relacionadas ao perfil Th1, como IFN- γ e IL-12, em pacientes com cardiopatia chagásica quando comparado ao grupo controle. Nossos resultados também demonstraram aumento da frequência da expressão de CD28 em linfócitos Th1 em cultura na presença de bloqueio para CD86 também em pacientes CARD. Camundongos deficientes em CD28 reduzem a ativação dos linfócitos T- “helper” (Green *et al* 1994; Yu *et al.*, 2000). Além disso, camundongos CD28^{-/-} “knockout” infectados com cepas Y ou colombianas de *T. cruzi* demonstraram alta parasitemia e menor taxa de sobrevivência, apresentando essa molécula papel chave para na ativação dos linfócitos T CD4⁺ durante a infecção por *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2004). Assumindo que com bloqueio de CD80 ou CD86 o outro receptor estaria atuante, propomos que através do bloqueio para o receptor CD80, CD86 pode não ser eficiente para ativação de Th1 em pacientes CARD, levando à redução na expressão de IFN- γ . Porém, com bloqueio de CD86, CD80 pode interagir com o receptor CD28 presente nos linfócitos Th1 e dessa forma contribuir para ativação dessa subpopulação de linfócitos, levando ao direcionamento para o perfil Th1 de citocinas e para a manutenção do ambiente inflamatório observado em pacientes CARD.

A partir dos nossos dados foi possível observar maior frequência de linfócitos Th2 CD28⁺ em pacientes com a doença de Chagas independente do bloqueio para CD80 e CD86. Entretanto, apenas pacientes CARD demonstraram maior frequência de linfócitos Th2 CTLA-4⁺. Citocinas anti-inflamatórias produzidas por linfócitos Th2, incluindo IL-4, IL-10 e TGF- β , apresentam papel importante no controle das respostas inflamatórias mediadas por células T e dessa forma, para prevenção dos danos teciduais durante a infecção por *T. cruzi* (Bonney *et al.*, 2015). Assim, esses resultados sugerem que independente de CD80 e CD86, a expressão aumentada de CD28 em linfócitos Th2 de pacientes com a doença de Chagas pode ser crucial para o controle da inflamação, porém, a maior frequência da molécula de inibição linfocitária CTLA-4 apenas em pacientes CARD pode ser um mecanismo para reduzir a ativação desse tipo celular, levando à perda da regulação da resposta imune e contribuindo para o predomínio do dano inflamatório nesses pacientes. Demonstramos, ainda, maior frequência do receptor CTLA-4 em Th2 apenas na cultura na presença de anticorpo anti-CD80 quando compara à cultura PBMC no grupo NI. Propomos que o bloqueio do receptor CD80 após desafio antigênico leva ao aumento da expressão do receptor CTLA-4 pelos linfócitos Th2, sendo essencial para modulação da resposta imunológica após infecção por *T. cruzi* em indivíduos saudáveis.

Alguns estudos sugerem o papel protetor da citocina IL-17 durante a infecção por *T. cruzi* (Guedes *et al.*, 2010; Miyazaki *et al.*, 2010). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel protetor ou patogênico dos linfócitos Th17, as principais células produtoras de IL-17. Observamos maior frequência de linfócitos Th17 em pacientes CARD na cultura com bloqueio anti-CD80, além de maior expressão de CD28⁺ por essa subpopulação celular em pacientes IND após bloqueio para CD80. Magalhães e colaboradores (2013) observaram menor intensidade de expressão da IL-17 por linfócitos totais em pacientes CARD. Além disso, IL-17 foi associada na melhor função cardíaca em pacientes com doença de Chagas (Magalhães *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017). Guedes e colaboradores (2010) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* resulta na produção de IL-17, que regula a resposta imune, bem como o desenvolvimento de lesões cardíacas durante o curso da infecção. Por outro lado, Almeida e colaboradores (2017) demonstram que aumento da frequência de Th17 e da expressão de IL-17 está correlacionada com a pior função cardíaca na doença de Chagas. Foi proposto ainda que células Th17 parecem modular a função das células Th1 durante o desenvolvimento de respostas inflamatórias potencialmente patogênicas (Dardalhon *et al.*, 2008; Bonney *et al.*, 2015). Outro estudo ainda demonstrou que linfócitos Th17 condicionam melhor controle da infecção em camundongos desafiados com *T. cruzi* quando comparado aos linfócitos Th1 conforme indicado pela maior redução da carga parasitária no sangue dos camundongos (Cai *et al.*, 2016). Assim, sugerimos

que Th17 possa atuar como fator protetor para controlar a replicação do protozoário em pacientes com doença de Chagas. Dessa forma, estudos ainda são necessários para investigar o papel dos linfócitos Th17 na doença de Chagas.

Os linfócitos T reguladores CD4⁺CD25^{high}FOXP3 (Treg) possuem a capacidade de controlar o efeito excessivo ou mal direcionado da resposta imune, incluindo aqueles a patógenos ou auto-antígenos (Baecher-Allan *et al.*, 2002; Belkaid *et al.*, 2007; Mengel *et al.*, 2016). Essa subpopulação celular pode exercer supressão através do contato celular e/ou da produção de citocinas (Sojka *et al.*, 2008). Dentre os muitos mecanismos envolvidos na imunorregulação, a participação de moléculas inibidoras, como o CTLA-4, pode ser um importante fator, assim como a produção de citocinas anti-inflamatórias por essas células, como IL-10 e TGF- β (Sojka *et al.*, 2008; Workman *et al.*, 2009; Pillai *et al.*, 2011). Nossos resultados verificaram aumento da frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ em pacientes com doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*. Observamos também maior frequência de linfócitos Treg em pacientes com a forma clínica assintomática quando comparado aos grupos NI e CARD nas culturas PBMC, anti-CD80 e anti-CD86. Nogueira e colaboradores (2014) avaliaram a expressão de genes associados com as funções das células T reguladoras e observaram maior expressão de mRNA para FOXP3 em tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica quando comparados às amostras provenientes de pacientes com cardiomiopatias de etiologia não inflamatória. Corroborando com nossos resultados, Vitelli-Avelar e colaboradores (2005) e De Araújo e colaboradores (2011, 2012) também observaram aumento da frequência de linfócitos Treg no sangue periférico de pacientes IND quando comparado com pacientes com cardiomiopatia chagásica. De Araújo e colaboradores (2011) observaram também menor presença de linfócitos T reguladores no tecido cardíaco em indivíduos não-infectados e pacientes CARD. Além disso, maior frequência de células Treg foi associada a um melhor prognóstico clínico em pacientes com a forma clínica assintomática da doença de Chagas (De Araújo *et al.*, 2012). Esses dados demonstram que as células Treg são expressas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, entretanto sugerimos que essa subpopulação celular não seja eficiente na regulação da resposta imune em pacientes CARD, levando a uma inflamação exacerbada e desregulada nesses pacientes. Entretanto, em pacientes assintomáticos as células Treg conseguem controlar o processo inflamatório e assim evitar os danos teciduais.

A molécula co-estimuladora de CD86 é expressa constitutivamente em baixos níveis nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), enquanto a CD80 é regulada posteriormente somente após a ativação (Hathcock *et al.*, 1994; Sigal *et al.*, 1998; Sharpe,

2002). Embora o receptor CD28 seja constitutivamente expresso nas células T e mostre baixa avidéz para as moléculas CD80 e CD86, a expressão de CTLA-4 é rapidamente aumentada somente após a ativação das células T (Linsley *et al.*, 1994, 1996; Sharpe, 2002). Por serem expressos precocemente, CD86 pode mediar a resposta imune inicial interagindo com o receptor CD28 enquanto CD80 pode desempenhar função na inflamação tardia (Sigal *et al.*, 1998; Sharpe, 2002). Interessantemente, nossos resultados demonstraram redução na frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ em cultura com bloqueio para CD86 apenas em pacientes IND. Além disso, através da análise proporção foi observado que a presença de anticorpo anti-CD80 condiciona aumento da frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ no grupo IND e redução no grupo CARD. Por outro lado, a presença de anticorpo anti-CD86 reduziu a frequência de linfócitos Treg CTLA-4⁺ no grupo IND e aumentou no grupo CARD. Observamos também maior frequência de linfócitos Treg IL-10 em pacientes CARD apenas na cultura com bloqueio anti-CD86. Linsley e colaboradores (1994) observaram maior afinidade do receptor CD86 por CTLA-4 quando comparado ao CD28. Além disso, um estudo concluiu que o aumento da afinidade de CTLA-4 por CD86 resultou na inibição da resposta das células T quando comparado a CD80 (Xu *et al.*, 2012). Assim, sugerimos que os diferentes bloqueios podem atuar de maneiras opostas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, modulando a inflamação. Propusemos que com bloqueio de CD80, CD86 pode interagir com o receptor CTLA-4 em células Treg. Além disso, propomos que com bloqueio de CD86, células Treg de pacientes CARD podem ser ativadas de forma alternativa via interação entre os receptores CD80/CTLA-4. Entretanto essa interação sugere não possuir uma função supressora, contribuindo para a resposta inflamatória exacerbada e incontida apenas nos pacientes CARD.

Observamos por análise de proporção que o bloqueio de CD80 leva ao aumento da frequência de linfócitos Treg apenas em pacientes IND e redução no grupo CARD. Por outro lado, o bloqueio de CD86 direciona redução da frequência de Treg também apenas em pacientes IND após estímulo *in vitro* com *T. cruzi*. Além disso, demonstramos maior frequência na expressão de CTLA-4 em linfócitos Treg quando comparado as outras subpopulações independente do bloqueio para CD80 e CD86. 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 apresentação antigênica em monócitos de pacientes IND (Gomes *et al.*, 2012). Assim, corroborando com os resultados anteriores presentes nesse capítulo, CD86 contribui para ativação de linfócitos Treg apenas em indivíduos IND, levando assim a modulação da resposta imune em pacientes assintomáticos.

Interessantemente, demonstramos que o bloqueio de CD86 pode estar relacionada com a expressão de CTLA-4 em linfócitos Th2 e Th17. Entretanto, o bloqueio de CD86 apresenta correlação negativa apenas com o receptor CTLA-4 expresso por células Treg de indivíduos IND. Estudos ainda demonstraram que a expressão de CD80 nas APCs induz a diferenciação de linfócitos Th1 em diferentes contextos patológicos (Slavik *et al.*, 1999; Balkhi *et al.*, 2004; Asai-Tajiri *et al.*, 2016; Said *et al.*, 2016). Assim, na doença de Chagas, sugerimos que com bloqueio de CD86, CD80 possa atuar na interação com CTLA-4 contribuindo para ativação dos linfócitos Th1, Th2 e Th17 e, CD86 seja a única molécula que possua a capacidade de interagir com CTLA-4 e que ative células Treg, contribuindo para regulação da resposta imune apenas em pacientes IND.

O segundo capítulo da presente tese sugere que a ativação de linfócitos Th1 é mediada pelos receptores CD80/CD28, enquanto Treg é ativado pela interação ente CD80/CTLA-4 em pacientes CARD. Por outro lado, linfócitos Th2 e Th17 podem ser ativados através da interação de CD80/CTLA-4, e Treg por CD86/CTLA-4 apenas em pacientes assintomáticos.

Os linfócitos T CD8⁺ desempenham papel crucial durante a fase aguda e crônica da doença de Chagas (Brener & Gazzinelli, 1997; Higuchi *et al.*, 2003; Lasso *et al.*, 2019). As células T CD8⁺ podem controlar a infecção por vários mecanismos, incluindo a secreção de citocinas, como IFN- γ que induzem atividade microbicida pelas células hospedeiras, principalmente por macrófagos, assim como através da atividade lítica via perforina/granzima (Lasso *et al.*, 2019). Estudos com fragmentos de biópsia de tecido cardíaco provenientes de pacientes com cardiomiopatia chagásica demonstraram que o infiltrado inflamatório era composto por células T, principalmente por linfócitos T CD8⁺ (Higuchi *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1993). Assim, devido o papel dessa população celular e sua ativação também ser dependente da participação das moléculas CD80 e CD86, o terceiro e último capítulo da presente tese compreende a atuação das moléculas CD80 e CD86 expressas por monócitos totais e de suas subpopulações com seus ligantes CD28 e CTLA-4 no desenvolvimento da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ e T CD8⁺ reguladores após bloqueio dos receptores CD80 ou CD86. Demonstramos maior frequência de linfócitos T CD8⁺ CD25⁺ em pacientes com doença de Chagas, entretanto, maior expressão de CD28 em linfócitos T CD8⁺ foi evidenciada principalmente em pacientes CARD independente do bloqueio para CD80 e CD86. Esses resultados sugerem que pacientes com a doença de Chagas apresentam capacidade de proliferação linfocitária, entretanto pacientes CARD apresentam maior capacidade de ativação de linfócitos T CD8⁺ contribuindo para a formação do processo inflamatório.

Nossos dados demonstraram maior frequência de linfócitos CD8⁺ Treg CD28⁺ em pacientes CARD, por outro lado, foi evidenciado maior frequência de CD8⁺ reguladores, CD8⁺ Treg IL-10⁺ e CD8⁺ Treg CTLA-4⁺ no grupo IND. Estudo recente demonstrou níveis mais altos da expressão de CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺ de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* no 10º dia após a infecção (dpi) do que em camundongos não-infectados e camundongos infectados no 30º ou 100º dpi, sugerindo que a infecção aguda por *T. cruzi* induziu a expressão de CTLA-4 (Mateus *et al.*, 2019). Martins e colaboradores (2004) verificaram aumento de CTLA-4 em células cultivadas com antígenos vivos de *T. cruzi* até as primeiras 48hs, restaurando aos níveis normais em 72hs. O bloqueio de CTLA-4 levou ao aumento de produção de NO após a infecção por *T. cruzi* e reduziu a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2004). No entanto estudos demonstraram maior frequência de CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺ de pacientes sintomáticos quando comparado pacientes assintomáticos (Lasso *et al.*, 2015, Mateus *et al.*, 2015). Em contrapartida, Souza e colaboradores (2007) detectaram maior frequência de linfócitos CD8⁺ CTLA-4⁺ em pacientes assintomáticos quando comparado ao grupo saudável e com cardiopatia chagásica. Dessa forma, sugerimos que durante a infecção inicial por *T. cruzi*, a ativação de CD28 seja decisiva para o controle da infecção, e a alta expressão de CTLA-4 por linfócitos T CD8⁺ condicione células ativas a se tornarem menos responsivas favorecendo assim na persistência da infecção. Por outro lado, com a cronicidade da patologia chagásica, pacientes assintomáticos iniciam a expressão de CTLA-4 para modular a resposta imune evitando complicações teciduais e a progressão da doença. Aliado a isso, propomos que a maior expressão de CTLA-4 em linfócitos CD8⁺ Treg no grupo IND com o bloqueio de CD80, assim como observado no capítulo 2, condiciona na ativação das células reguladoras e na modulação da resposta imune apenas em pacientes assintomáticos.

Posteriormente, avaliamos a relação entre as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 expressas em monócitos e suas subpopulações com os receptores CD28 e CTLA-4 expressos pelos linfócitos T CD8⁺ totais e reguladores. Demonstramos correlação negativa entre CD28 expresso por células Treg com monócitos inflamatórios em cultura com anticorpo anti-CD80. Por outro lado, em cultura com anticorpo anti-CD86 observamos correlação negativa entre CTLA-4 expressos em células Treg com monócitos patrulhadores. Assim, semelhante aos resultados obtidos com linfócitos T CD4⁺, sugerimos que CD86 possua relação com o receptor CTLA-4, e não com CD28, expresso nas células CD8⁺ Treg, sendo essa interação importante para ativação dessa subpopulação celular.

Os principais resultados encontrados na presente tese se encontram sumarizados na figura 28.

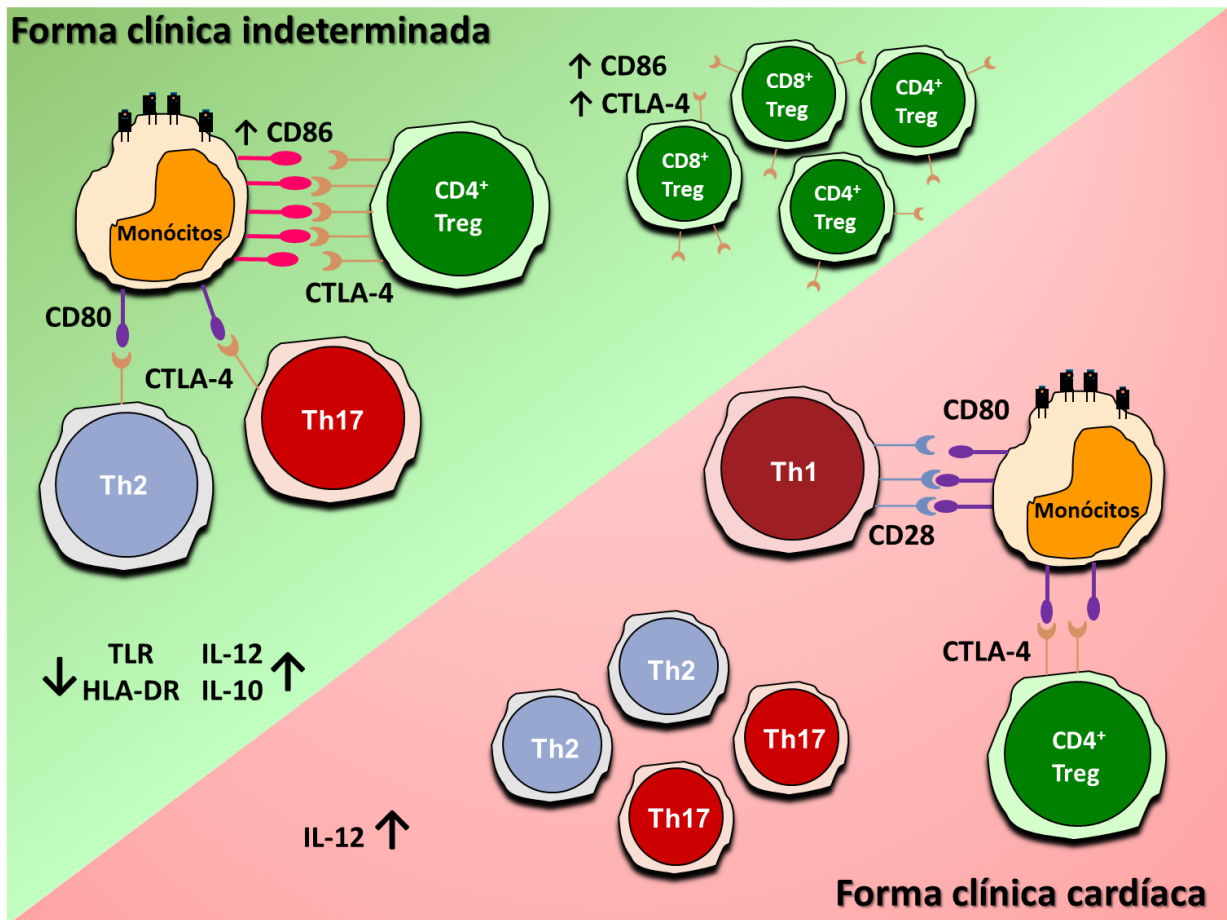


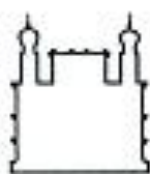
Figura 28. Resumo geral dos principais resultados encontrados na tese. CD86 interage diretamente com receptor CTLA-4 em células CD4⁺ e CD8⁺ Treg levando à ativação dessa subpopulação celular em pacientes IND. Enquanto CD80 interage com CTLA-4 apenas em células Th2 e Th17 nesses pacientes. CD80 interage com CD28 em células Th1 e com CTLA-4 em células Treg em pacientes CARD. Esses pacientes também apresentam maior frequência de linfócitos Th2 e Th17. Além disso, pacientes IND apresentam redução na expressão de TLR e HLA-DR e equilíbrio na produção de IL-12 e IL-10 por monócitos. Por outro lado, pacientes CARD apresentam alta expressão de IL-12.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta a caracterização das subpopulações de monócitos em pacientes com a doença de Chagas e sua associação com as diferentes subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg. Concluimos que os linfócitos Th2 e Th17 podem ser ativados através da interação entre os receptores CD80/CTLA-4 em pacientes assintomáticos. Por outro lado, sugerimos que linfócitos Th1 são ativados por meio da interação entre os receptores CD80/CD28 em pacientes CARD. Além disso, propusemos que o receptor CD86 possa estar envolvido na imunorregulação pela sua associação com CTLA-4, sendo decisivo na ativação de linfócitos Treg apenas em pacientes assintomáticos. Todavia, células Treg de pacientes CARD podem ser ativadas de forma alternativa, via interação entre os receptores CD80/CTLA-4.

Concluimos que CD86 é uma molécula chave na interação com CTLA-4 e ativação dos linfócitos reguladores principalmente em pacientes assintomáticos, podendo representar uma nova estratégia para controlar a inflamação e os danos teciduais em pacientes com doença de Chagas.

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética do IRR



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

Artigos completos publicados derivados da tese

PINTO, BF; MEDEIROS, NI; TEIXEIRA-CARVALHO A; ELOI-SANTOS SM; FONTES-CAL TCM; ROCHA DA; DUTRA WO; CORREA-OLIVEIRA R; GOMES JAS. CD86 expression by monocytes influences an immunomodulatory profile in asymptomatic patients with chronic Chagas disease (2018). *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. 494. doi:10.3389/fimmu.2018.00454.

PINTO, BF; MEDEIROS, NI; FONTES-CAL TCM; NAZIAZENO IM; CORREA-OLIVEIRA R; DUTRA WO; GOMES JAS. The role of co-stimulatory molecules in Chagas disease (2018). *Cells*, v. 7, n. 11. doi: 10.3390/cells7110200.

Artigos em colaborações durante o doutoramento

Artigos completos publicados em colaborações durante o doutoramento

MEDEIROS, NI; **PINTO, BF**; ELOI-SANTOS SM; TEIXEIRA-CARVALHO A; MAGALHÃES, LMD; DUTRA WO; CORREA-OLIVEIRA R; GOMES JAS. Evidences of different IL-1 β activation pathways in innate immune cells from indeterminate and cardiac patients with chronic Chagas disease (2019). *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. 800. doi: 10.3389/fimmu.2019.00800.

PINTO, BF; **PINTO, BF**; DIAS, EHF. Efeitos sistêmicos da mobilização precoce em pacientes adultos internados na unidade de terapia intensiva: revisão atualizada (2018). *Fisioterapia Brasil*, v,19, n. 06. doi: 10.33233/fb.v19i6.2118.

COTA, GF; DE SOUSA, MR; DE ASSIS, TSM; **PINTO, BF**; RABELLO, A. Exploring prognosis in chronic relapsing visceral leishmaniasis among HIV-infected patients: circulating Leishmania DNA (2017). *Acta Tropica*, v. 11, p. 1. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.011.

Artigos submetidos em colaborações durante o doutoramento

QUEIROZ, EA; MEDEIROS, NI; MATTOS, RT; **PINTO, BF**; CARVALHO APM; DUTRA, WO; FELIX-LANA FC; CORREA-OLIVEIRA, R; GOMES, JAS. CCL2 and IFN- γ serum levels as biomarker for subclinical infection in household contacts of leprosy patients. Submetido em 2020 na revista *Cytokine*.

Demais artigos publicados

COTA, GF; DE SOUSA, MR; DE FREITAS NOGUEIRA, BM; GOMES, LI; OLIVEIRA, E; DE ASSIS, TSM; DE MENDONCA, ALP; **PINTO, BF**; SALIBA, JW; RABELLO, A. Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral Leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study (2013). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 1, p. 1. doi: 10.4269/ajtmh.13-0239.

COTA, GF; GOMES, LI; **PINTO, BF**; SANTOS-OLIVEIRA, JR; DA-CRUZ, AM; PEDROSA, MS; TAFURI, WL; RABELLO, A. Dyarrheal syndrome in a patient co-infected with *Leishmania infantum* and *Schistosoma mansoni* (2012). *Case Reports in Medicine*, v. 2012, p. 1-4. doi: 10.1155/2012/240512.

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- γ 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.

Almeida MS, Lorena VMB, Medeiros CA, Junior WO, Cavalcanti MDGAM, Martins SM, de Moraes CNL. Alternative Th17 and CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. Scand J Immunol. 87(4). 2017.

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. Asai-Tajiri Y, Matsumoto K, Fukuyama S, Kan-O K, Nakano T, Tonai K, Ohno T, Azuma M, Inoue H, Nakanishi Y. Smallinterfering RNA against CD86 during allergen challenge blocks experimental allergic asthma. Respir Res. 15:132. 2014.

Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, Pereira DB, Teixeira-Carvalho A, Golenbock DT, Gonçalves R, Gazzinelli RT. The CD14⁺CD16⁺ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute *Plasmodium vivax* Malaria. PLoS Pathogens. 10(9). 2014.

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⁺CD25^{high} regulatory T cell function. J. Immunol. 169:6210-6217. 2002.

Báfica 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.

Balkhi MY, Latchumanan VK, Singh B, Sharma P, Natarajan K. Cross-regulation of CD86 by CD80 differentially regulates T helper responses from Mycobacterium tuberculosis secretory antigen-activated dendritic cell subsets. Journal of Leukocyte Biology. 75:874-883. 2004.

Banchereau J&Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 19;392(6673):245-52. 1998.

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.* 3:1–10. 2013.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews.* 7: 875-888. 2007.

Bestetti RB, Dellalibera-Joviliano R, Lopes GS, Faria-Jr M, Furlan-Daniel R, Lopes KC, Batista DR. Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg cytokine profile in patients with chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension. *Heart and Vessels.* 34: 123–133. 2019.

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⁺ 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.

Cai CW, Blasé JR, Zhang X, Eickhoff CS, Hoft DF. Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoSPathog* 12(10):1-23. 2016.

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 tripanozomíase 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.

Costa MC, Rocha BD, Paixão CS, de Oliveira M, da Mota LMH, de Carvalho LP. Monocyte subpopulations study in patients with plaque psoriasis. *Med Hypotheses*. 104:101–3. 2017.

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.

Croft M & Dubey C. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol*. 17, 89–118. 1997.

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^{dim} 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.

Da Costa TA, Silva MV, Mendes MT, Carvalho-Costa TM, Batista LR, Lages-Silva E, Rodrigues V, Oliveira CJ, Ramirez LE. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. *J. Immunol. Res.* 1–12. 2014.

Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 31(3):252-6. 2008.

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- γ 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⁺CD25^{high}CD4⁺ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *PLoS One.* 217(8): 768–777. 2012.

de Araújo FF, Silveira ABM, Correa-Oliveira R, Adad SJ, Fiuza JA. Characterization of the presence of Foxp3⁺ T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *HumanPathology.* 42, 299–302. 2011.

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, Haridoim 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. PlosOne. 1-18. 2015.

Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Scand J Immunol. 45:74–80. 1996.

Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. Parasite Immunol. 36(8): 377–38. 2014.

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.

Flörcken A, Johannsen M, Nguyen-Hoai T, Gerhardt A, Miller K, Dörken B, Pezzutto A, Westermann J, Jöhrens K. Immunomodulatory molecules in renal cell cancer: CD80 and CD86 are expressed on tumor cells. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 10:1443–1454. 2017.

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.

Gardner D, Jeffery LE, Sansom DM. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. *Am. J. Transplant.* 14:1985–1991. 2014.

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.

Grad E, Zolotarevsky K, Danenberg HD, Nordling-David MM, Gutman D, Golomb G. The role of monocyte subpopulations in vascular injury following partial and transient depletion. *Drug Deliv Transl Res.* 1–9. 2017.

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.

Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA, Thompson CB. Absence of B7-dependent responses in CD-28 deficient mice. *Immunity*. 1: 501–508. 1994.

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.

Guedes PMM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *PlosNeglected*. 4(2): 1- 11. 2010.

Guedes PMM, Veloso VM, Afonso LCC, Caliarri 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- γ , TNF- α , 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.

Hall HTL, Petrovic J and Höglund P. Reduced antigen concentration and costimulatory blockade increase IFN- γ secretion in naive CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol*. 34: 3091–3101. 2004.

Hashemi BB, Penkala JE, Vens C, Huls H, Cabbage M, Sams CF. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in space flight. 13: 2071-2082. 1999.

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.

Higuchi ML, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*. 60: 96–107. 2003.

Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 423:157-160. 1993.

Iniciativa de Salud del Cono Sur, Incosur. XIV Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de *Triatoma Infestans* y la Interrupción de la Transmisión de la Tripanosomiasis Transfusional y Curso de Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de Enfermedad de Chagas; OPS/MSF: Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 2005.

Jenkins MK & Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 165, 302–319. 1987.

June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today*. 11, 211–216. 1990.

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.

Lang TJ, Nguyen P, Peach R, Gause WC, Via CS. *In vivo* CD86 blockade inhibits CD4⁺ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8⁺ T cell activation and CTL effector function. *J Immunol*. 15;168(8). 2002.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas disease-a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956.

Lasso P, Mateus J, González JM, Cuéllar A, Puerta C. CD8⁺ T Cell Response to *Trypanosoma cruzi* Antigens during Chronic Chagas Disease. 1995. 349-361. 2019.

Lasso P, Mateus J, Pavía P, Rosas F, Roa N, Thomas MC, Loópez MC, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. Inhibitory Receptor Expression on CD8⁺ T Cells Is Linked to Functional

Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. *The Journal of Immunology*. 195: 3748–3758. 2015.

Lenschow DJ, Su GH, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11054–11058. 1993.

Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 4, 535–543. 1996.

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.

Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*. 11:191–212. 1993.

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

Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 34(6): 753–770. 2012.

Machado FS, Soutoa JT, Rossia MA, Esper L, Tanowitzd HB, Alibertic J, Silvaa JS. Nitric Oxide Synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect*. 10(14-15): 1558–1566. 2008.

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*. PlosNeglected 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. 2015a.

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

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS. The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. MicrobesInfect. 10(7):825-33. 2008.

Marinho CRF, Lima MRI, Marcos G. Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. Infection and Immunity. 67(1): 308-318. 1999.

Martins GA, Campanelli AP, Silva RB, Tadokoro CE, Russo M, Cunha FQ, Rizzo LV, Silva JS. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 6:1133–1144. 2004.

Martin D & Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol Rev 201:304–317. 2004.

Mateus J, Guerrero P, Lasso P, Cuervo C, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. Frontiers in Immunology.10(918): 1-17. 2019.

Mateus J, Lasso P, Pavia P, Rosas F, Roa N, Valencia-Hernández CA, González JM, Puerta CJ, Cuéllar A. Low Frequency of Circulating CD8⁺ T Stem Cell Memory Cells in Chronic Chagasic Patients with Severe Forms of the Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1). 2015.

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

Melo AS, Lorena VMB, Braz SCM, Docenab C, Gomes YM. IL-10 and IFN- γ 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: 20 de janeiro de 2020.

Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura K, Yagita H, Aoki T. Critical contribution of CD28–CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun*. 71:3131–3137. 2003.

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*. 185:1150-1157. 2010.

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.

Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol*. 130: 338–46. 2008.

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.

Mukherjee R, Barman PK, Thatoi PK, Tripathy R, Das BK, Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic Lupus erythematosus. *Nat Sci Rep*. 5:14. 2015.

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- γ 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.

Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D, Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets

in steady state and systemic inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. 214(7). 2017.

Pérez-Molina JA & Molina I. Chagas disease. Seminar. 2017.

Pillai MR, Collison LW, Wang X, Finkelstein D, Rehg JE, Boyd K, Szymczak-Workman AL, Doggett T, Griffith TS, Ferguson TA, Vignali DAA. The Plasticity of Regulatory T Cell Function. *The Journal of Immunology*. 187: 4987–4997. 2011.

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

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 29, 600–603. 2011.

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

Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterisation of inflammatory infiltrate in chronic myocardial lesions. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am J TropMedHyg*. 48(5):637-44. 1993.

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. p.325-392. 2004

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. 2012a.

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*. 2012b.

Said EA, Al-Reesi I, Al-Riyami M, Al-Naamani K, Al-Sinawi S, Al-Balushi MS, Koh CY, Al-Busaidi JZ, Idris MA, Al-Jabri AA. Increased CD86 but Not CD80 and PD-L1 Expression on Liver CD68⁺ Cells during Chronic HBV Infection. *PLoS One*. 11(6). 2016.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155(3): 1151-64. 1995.

Salgame P, Convit J, Bloom BR. Immunological suppression by human CD8⁺ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:2598–602. 1991.

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.

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

Serbina NV & Pamer EG. Monocytes emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nature Immunology. 7(3). 2006.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. The Journal of Experimental Medicine. 201(5): 723–735. 2005
Sharpe, A.R. Mechanisms of costimulation. Immunol. Rev. 229, 5–11. 2009.

Sigal LJ, Reiser H, Rock KL. The role of B7-1 and B7-2 costimulation for the generation of CTL responses *in vivo*. J. Immunol. 161, 2740–2745. 1998.

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

Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families—Signaling and function. Immunologic Research. 19:1–24. 1999.

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⁺HLA-DR⁺ 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.

Sousa GR, Gomes JAS, Damasio MPS, Nunes MCP, Costa HS, Medeiros NI, Fares RCG, Chaves AT, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC. The role of interleukin 17-mediated immune

response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. PLoSOne. 12(3): 1-14. 2017.

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.

Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. Infect Immun 62(5):1820–1829 7. 1994.

Tarleton RL. Depletion of CD8⁺Tcells increases susceptibility and reverses vaccineinduced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol 144(2):717–724. 1990.

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, Gilja B, Wojta J, Speidl WS. Differential *in vivo* activation of monocyte subsets during lowgrade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Nature*. 2016.

Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, Marcovecchio P, Taylor AM, McSkimming C, Nguyen AT, McNamara CA, Hedrick CC. Human blood monocyte subsets a new gating strategy defined using cell surface markers identified by mass cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017.

Triplet TA, Curti BD, Bonafede PR, Miller WL, Walker EB, Weinberg AD. Defining a functionally distinct subset of human memory CD4⁺ T cells that are CD25^{POS} and FOXP3^{NEG}. *Eur. J. Immunol*. 42: 1893–1905. 2012.

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.

Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol. Rev*. 153, 47–83. 1996.
Van Gool SW, Vermeiren J, Rafiq K, Lorr K, de Boer M, Ceuppens JL. Blocking CD40–CD154 and CD80/CD86–CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. *Eur. J. Immunol*. 29, 2367–2375. 1999.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, Pascoaly VPM, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Eloi-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease have High Frequencies of Circulating CD3⁺CD16⁻CD56⁺ Natural Killer T Cells and CD4⁺CD25^{High} Regulatory T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 62, 297–308. 2005.

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.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee K.P, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science.* 270, 985–988. 1995.

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, Zerneck A. Increased intermediate CD14⁺⁺CD16⁺⁺ monocyte subset levels associate with restenosis after peripheral percutaneous transluminal angioplasty. *Atherosclerosis.* 253: 128-134. 2016.

Wong KL, Jing-Yi Tai J, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 118(5). 2011.

Wong KL, Tai JJY, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 118:15–30. 2011.

Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DAA. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2603–2622. 2009.

World Health Organization (WHO). Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Diseases 2015; World Health Organization: Geneva, Switzerland. 1–211. 2015.

World Health Organization, WHO. Disponível em: www.who.int/chagas/disease/en/. Acessado em: 30 de janeiro de 2020.

Xu Z, Juan V, Ivanov A, Ma Z, Polakoff D, Powers DB, DuBridge RB, Wilson K, Akamatsu Y. Affinity and Cross-Reactivity Engineering of CTLA4-Ig To Modulate T Cell Costimulation. *The Journal of Immunology*. 189:4470-4477. 2015.

Yamagata Y& Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv. Parasitol*. 61,129–165. 2006.

Yu X, Fournier S, Allison JP, Sharpe AH, Hodes RJ. The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J. Immunol*. 164, 3543–3553. 2000.

Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol*. 172:2778–84. 2004.

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. 2010.