

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Teresiama Velikkakam

Caracterização fenotípica e funcional de monócitos e sua associação com diferentes subpopulações de células T CD4⁺CD8⁻ nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas

Belo Horizonte – MG
2022

Teresiama Velikkakam

Caracterização fenotípica e funcional de monócitos e sua associação com diferentes subpopulações de células T CD4⁺CD8⁻ nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Área de concentração: Imunologia das doenças infecciosas e tropicais.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Belo Horizonte – MG
2022

V437c Velikkakam, Teresiama.
Caracterização fenotípica e funcional de monócitos e sua associação com diferentes subpopulações de células T CD4-CD8- nas formas clínicas indeterminada e cardíaca da Doença de Chagas [recursos eletrônicos]. / Teresiama Velikkakam. - - Belo Horizonte: 2022.
119f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Walderez Ornelas Dutra.
Coorientador (a): Maria do Carmo Pereira Nunes.
Área de concentração: Imunologia das Doenças Infecciosas e Tropicais.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Antígenos HLA. 2. Antígenos CD1. 3. Antígenos CD4. 4. Antígenos CD8. 5. Monócitos. 6. Doença de Chagas. 7. Dissertação Acadêmica. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Nunes, Maria do Carmo Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 705

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

"CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MONÓCITOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T CD4-CD8- NAS FORMAS CLÍNICAS INDETERMINADA E CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS"

TERESIAMA VELIKKAKAM

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 13 de julho de 2022, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

PROF. PAULO EDUARDO ALENCAR DE SOUZA

PUC-MG

PROFA. LIVIA SILVA ARAUJO PASSOS

KITE BIOTECHNOLOGIES

PROFA. CAROLINA CATTONI KOH

UFMG

PROF. RICARDO TOSHIO FUJIWARA

UFMG

PROFA. WALDEREZ ORNELAS DUTRA - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 13 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 13/07/2022, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cattoni Koh, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 13/07/2022, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Eduardo Alencar de Souza, Usuário Externo**, em 13/07/2022, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walderez Ornelas Dutra, Professora do Magistério Superior**, em 14/07/2022, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia Silva Araujo Passos, Usuário Externo**, em 15/07/2022, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1570174** e o código CRC **79ED3112**.

À minha família por todo suporte, incentivo e amor; em especial ao Samir, por ser minha esperança de um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento é o ato de reconhecer alguém que lhe trouxe algum benefício.

Faço aqui então meu reconhecimento às pessoas que contribuíram com esse trabalho: Walderez, orientadora; Maria do Carmo, co-orientadora e colaboradora; Carolina e Eula, pares de laboratório, e demais alunos do LBIC.

Aos professores, agradeço o exemplo e os conhecimentos. À banca, agradeço pelas correções e considerações. Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde e às agências de financiamento, agradeço a oportunidade de realizar um sonho.

Além disso, reconheço a inestimável contribuição dos pacientes do Hospital das Clínicas, que se propuseram tão generosamente a colaborar com esta pesquisa. Em especial, agradeço ao querido senhor Manoel (*in memoriam*).

Não caberiam aqui meus agradecimentos à minha mãe, ao meu marido, à minha irmã, ao Samir (amor da minha vida), aos meus amigos, ao meu pai, e aos meus terapeutas e médicos, por tantas orações, vibrações positivas, palavras amigas e conforto, quando muitas, e muitas vezes se fizeram necessárias. Não tão menos importante, agradecer a Deus por me conceder a força, a resiliência e o perdão necessários.

Agradeço também a mim, por não desistir. Não só deste doutorado, mas também não desistir de acreditar em mim mesma e na minha trajetória.

Finalmente, conseguir agradecer à vida pelas lições de o que levar e de o que deixar.

*[...] Ainda que muito esteja perdido, muito nos resta; e ainda que perdida a força dos
velhos dias em que movíamos céus e terras;
somos o que somos;
uma coragem única nos corações heroicos, débeis pelo tempo e pelo destino, mas
persistentes em lutar, achar, buscar e jamais render-se.*

Alfred Tennyson

RESUMO

As células imunes desempenham um papel importante na inflamação observada na doença de Chagas (DC) e, entre elas, identificamos as células T CD4⁻CD8⁻ (duplamente negativas – DN) como uma importante fonte de citocinas. As células T DN são preferencialmente ativadas por moléculas da família CD1, que são expressas por células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos. A membrana do *Trypanosoma cruzi* é rica em antígenos lipídicos e gliconjugados, que são imunogênicos e potencialmente ativam células T DN. Este trabalho visa caracterizar fenotipicamente e funcionalmente monócitos de pacientes com as diferentes formas clínicas de DC, determinando a expressão de moléculas da família CD1, citocinas e seus receptores, correlacionando essas características com a ativação de células T DN. Para tanto, obtivemos células mononucleares de sangue periférico de 13 pacientes CARD e 8 IND, cultivadas *in vitro* na presença de antígenos tripomastigotas (TRP) ou meios, e analisamos por citometria de fluxo. Observamos que os monócitos CARD apresentam perfil inflamatório com alta expressão de TNF- α em relação ao grupo IND. TRP aumenta a frequência de moléculas reguladoras como Fas-L e PDL-1 em monócitos CARD. Monócitos CARD com TRP tiveram aumento de monócitos clássicos e intermediários, relacionados a uma pior função cardíaca. Além disso, a distribuição das isoformas CD1 nas subpopulações de monócitos é diferente entre as formas clínicas IND e CARD: há maior expressão de CD1a, b e d em monócitos CARD e maior frequência de CD1c⁺ e CD1d⁺ em monócitos IND. Monócitos CD1d⁺ de pacientes com CARD, com ou sem estimulação, exibiram perfil inflamatório com alta expressão de TNF- α , comparados ao grupo IND; e foram fortemente correlacionados com células T DN TNF- α ⁺, apenas no grupo CARD. No geral, nossos dados mostraram que os monócitos de pacientes da forma clínica IND e CARD apresentam consideráveis diferenças fenotípicas e funcionais; e os monócitos CARD parecem mais reativos à estimulação com o antígeno de *T. cruzi* do que os monócitos IND, o que pode ter implicações importantes no desfecho clínico desses pacientes.

Palavras-chave: apresentação de antígenos não-clássica. Família CD1. Células T duplamente negativas.

ABSTRACT

Immune cells play important role in the inflammation observed in Chagas diseases (CD), and among them, we have identified double negative T cells (CD4-CD8-) as an important source of cytokines. DN T cells are preferentially activated by molecules of the CD1 family, which are expressed by antigen-presenting cells, including monocytes. *Trypanosoma cruzi*'s membrane is rich in lipid and glyconjugate antigens, which are immunogenic and potentially activate DN T-cells. This work aims to characterize phenotypically and functionally monocytes from patients with the different clinical forms of CD, determining the expression of molecules from the CD1 family, cytokines and their receptors, correlating these characteristics with the activation of DN T-cells. To do so, we obtained peripheral blood mononuclear cells from 13 CARD and 8 IND patients, cultured *in vitro* in the presence of trypomastigote antigens (TRP) or media, and we analyze by flow cytometry. We observed that CARD monocytes have an inflammatory profile with high TNF expression compared to the IND group. TRP increases the frequency of regulatory molecules such as Fas-L and PDL-1 in CARD monocytes. CARD monocytes with TRP had an increase in classical and intermediate monocytes, related to a worse cardiac function. Furthermore, the distribution of CD1 isoforms in monocyte subpopulations is different between the clinical forms IND and CARD: there is a higher expression of CD1a, b and d in CARD monocytes, and a higher frequency of CD1c⁺ and CD1d⁺ in IND monocytes. CD1d⁺ monocytes from CARD patients, with or without stimulation, exhibited an inflammatory profile with high TNF- α expression, compared to the IND group; and were strongly correlated with DN TNF- α ⁺ T cells, only in the CARD group. Overall, our data have shown that monocytes from patients of the clinical form IND and CARD have large phenotypic and functional differences, and CARD monocytes seem more reactive to stimulation with *T. cruzi* antigen than IND monocytes, which may have important implications in the clinical outcome of these patients.

Key words: Non-conventional antigen presentation. CD1 family. Double negative T cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2: Estrutura dos glicolipoconjugados GPI, GIPL e mucinas presentes na membrana do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 3: Apresentação de antígenos pelas moléculas da família CD1, grupos 1 e 2.....	30
Figura 4: Frequência e distribuição dos subconjuntos de monócitos TNF ⁺ e IL-10 ⁺ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas	43
Figura 5: Frequência e distribuição de monócitos TNF ⁺ e CD120 ⁺ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	45
Figura 6: Frequência e distribuição de monócitos Fas-L ⁺ e PDL-1 ⁺ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	46
Figura 7: Correlações entre as frequência de monócitos Fas-L ⁺ e monócitos inflamatórios (TNF ⁺), com ou sem estímulo, em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas.	47
Figura 8: Frequência e distribuição dos subconjuntos de monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas	49
Figura 9: Frequência e distribuição dos subconjuntos de monócitos HLA-DR ⁺ nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.....	50
Figura 10: Distribuição de monócitos expressando diferentes moléculas CD1 nas subpopulações de monócitos	52
Figura 11: Avaliação da frequência e expressão das diferentes isoformas de CD1 na subpopulação de monócitos clássicos de pacientes das diferentes formas clínicas da doença de Chagas	53
Figura 12: Avaliação da frequência e expressão das diferentes isoformas de CD1 na subpopulação de monócitos intermediários de pacientes das diferentes formas clínicas da doença de Chagas	54
Figura 13 Avaliação da frequência e expressão das diferentes isoformas de CD1 na subpopulação de monócitos não-clássicos de pacientes das diferentes formas clínicas da doença de Chagas	55
Figura 14: Correlações entre monócitos CD1d ⁺ , com ou sem estímulo, e células T DN αβTCR ⁺ ou γδTCR ⁺ , nas formas clínicas da doença de Chagas.....	56
Figura 15: Avaliação da frequência e ou expressão monócitos CD1d ⁺ ; monócitos HLA-DR ⁺ CD1d ⁺ ; moléculas regulatórias (PDL-1, Fas-L e IL-10); e monócitos TNF ⁺ CD1d ⁺ ou TNF ⁺ CD120 ⁺ CD1d ⁺ , do sangue periférico de pacientes CARD ou IND.....	59

Figura 16: Correlação entre monócitos CD1d ⁺ Fas-L ⁺ e células T DN αβTCR ⁺ TNF ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas.....	60
Figura 17: Correlação entre monócitos CD1d ⁺ regulatórios e células T DN TNF ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas.....	60
Figura 18: Correlação entre monócitos CD1d ⁺ TNF ⁺ ou CD1d ⁺ TNF ⁺ CD120 ⁺ e células T DN αβTCR ⁺ TNF ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas	61
Figura 19: Comparação entre monócitos TNF ⁺ , CD69 ⁺ , e CD69 ⁺ TNF ⁺ de indivíduos saudáveis e das formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	63
Figura 20: Comparação entre a frequência de monócitos TNF ⁺ , CD69 ⁺ , e CD69 ⁺ TNF ⁺ de indivíduos saudáveis e das formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	64
Figura 21: Correlação entre frequência de células T DN αβTCR IL-10 ⁺ ou γδTCR ⁺ IL-10 ⁺ e a frequência de monócitos CD69 ⁺ , de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	65
Figura 22: Correlação entre a frequência de monócitos TNF ⁺ e as subpopulações de células T DN TNF ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	66
Figura 23: Correlação entre a frequência de monócitos TNF ⁺ e as subpopulações de células T DN IL-10 ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	67
Figura 24: Correlação entre a frequência de monócitos TNF ⁺ e as subpopulações de células T DN CD69 ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas expostas a diferentes frações de <i>T.cruzi</i>	68
Figura 25: Correlação entre os parâmetros clínicos a frequência de monócitos CD69 ⁺ , TNF ⁺ ou CD69 ⁺ TNF ⁺ de pacientes CARD ou IND da doença de Chagas.....	69
Figura 26: Novo esquema de ligação CD1a-Lipídio-TCR proposto por Cotton e colegas (2021).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação fenotípica e funcional de células T duplo negativas	32
Tabela 2: Descrição dos anticorpos usados nas marcações para ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- α -Gal-Cer - alfa-Galactosilceramida
- ANOVA - Análise de Variância
- APC – Células apresentadoras de antígenos
- APC – Alofococianina (apenas na tabela de fluorocromos para citometria de fluxo)
- BSA - Albumina de soro bovino
- BV421 – Violeta brilhante 421
- CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CARD - Grupo com cardiopatia chagásica crônica
- C.C.C – Cardiopatia chagásica crônica
- CD – Cluster de diferenciação
- CDC - Centro para Controle e Prevenção de Doenças
- COEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- DC – Doença de Chagas
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DN – Duplo negativa
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- Fas - proteína transmembranar que pertence à família de fatores de necrose tumoral.
- Fas-L - Ligante de Fas
- FITC - Isotiocianato de fluoresceína
- HLA-DR – “*Human Leucocyte Antigen*” - Receptor de superfície celular MHC classe II
- HC – Hospital das Clínicas
- GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- GIPLs – Glicoinositolfosfolípidios
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- ICB - Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- γ - Interferon gama
- IND – Grupo com a forma indeterminada da doença de Chagas
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- LBIC - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

LPG – Lipofosfoglicanos
LPS – Lipopolissacarídeos
MFI - Intensidade de fluorescência média
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
NF- β K - Factor nuclear kappa beta
NK – Natural Killer
NKT - Células T natural killer
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico
PBS - Tampão fosfato-salino
PD-1 - Programmed cell death 1
PDL-1 - Ligante de morte programada 1
PE – Ficoeritrina
PeCy7 – Ficoeritrina Cyanine7
PerCP Cy 5.5 - PerCP -Cyanina 5.5
pH - Escala numérica adimensional utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução aquosa
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute* - Meio para cultura de células desenvolvido no instituto
SFB - Soro fetal bovino
T.A. - Temperatura ambiente
TCLE – Termo de consentimento livre esclarecido
TCR – Receptor de células T
TLR – Toll-like receptor
TGF- β - Fator de crescimento transformador beta
Th - Células T auxiliares
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TNFR – Receptor de fator de necrose tumoral alfa
Treg - Células T reguladoras
TRP – Estímulo de antígeno bruto de *Trypanosoma cruzi*
tSNE - t-Distributed Stochastic Neighbor
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UMAP - Aproximação e Projeção de Variedade Uniforme para Redução de Dimensão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2 A doença de Chagas	22
2.3 Aspectos imunológicos das formas clínicas da DC humana	24
2.3.1 O envolvimento de monócitos na DC.....	25
2.3.1.1 Apresentadores de antígenos lipídicos: a família CD1	27
2.3.2 Linfócitos na CD humana.....	31
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral.	34
4.2 Objetivos Específicos.	34
5. PACIENTES, MATERIAS E MÉTODOS.....	35
5.1 Pacientes e amostras de sangue	35
5.2 Processamento das amostras.....	36
5.3 Extrato bruto de <i>T. cruzi</i>	36
5.4 Obtenção das frações de <i>T. cruzi</i>	37
5.4.1 Estímulo <i>in vitro</i> com diferentes frações de <i>T. cruzi</i>	38
5.5 Citometria de fluxo	39
5.6 Análises estatísticas	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Monócitos de pacientes CARD apresentam perfil inflamatório enquanto monócitos de pacientes IND tem perfil anti-inflamatório	42
6.2 Pacientes CARD e IND têm diferenças na distribuição de subpopulações de monócitos	47
6.3 As moléculas CD1c e CD1d são as moléculas da família CD1 mais expressas nas subpopulações de monócitos de pacientes CARD e IND.....	51

6.4	Caracterização funcional de monócitos CD1d+	57
6.4.1	O estímulo com TRP aumenta a frequência de monócitos CD1d+ que expressam moléculas modulatórias e também inflamatórias, em pacientes CARD	57
6.5	Estímulo com fração rica em lipídios derivados de <i>T.cruzi</i> aumenta a frequência de monócitos inflamatórios em pacientes com C.C.C.....	62
6.6	Monócitos de pacientes CARS são mais responsivos aos estímulos com frações derivadas de <i>T.cruzi</i>	64
6.7	Monócitos CD69+ de pacientes IND correlacionam-se negativamente com células T DN $\alpha\beta$ TCR regulatórias (IL-10+), quando estimulados por fração rica em carboidratos	65
6.8	Monócitos TNF+ de pacientes IND ativados por frações de <i>T.cruzi</i> estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR inflamatórias.....	66
6.9	A ativação de monócitos inflamatórios por fração rica em proteínas de <i>T.cruzi</i> está negativamente correlacionada com células T DN $\gamma\delta$ TCR regulatórias em pacientes CARD	67
6.10	Monócitos inflamatórios (TNF+) de pacientes com ambas as formas clínicas de DC estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR ativadas (CD69+).....	68
6.11	Maiores frequências de monócitos inflamatórios estão relacionadas a piores parâmetros clínicos de função cardíaca	69
7.	DISCUSSÃO	70
8.	CONCLUSÕES.....	86
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
10.	REFERÊNCIAS	89
11.	ANEXO.....	102
11.1	Anexo I - Artigo publicado: “Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression”	102

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária negligenciada, de notificação obrigatória, e que representa um problema de saúde pública (WHO). Devido aos processos de migração e globalização, a doença alcançou ampla distribuição mundial, mas ainda é mais prevalente em países em desenvolvimento na América Latina, dentre eles o Brasil. A DC está associadas a uma baixa taxa mortalidade, mas alta morbidade, o que leva a gastos com aposentadorias compulsórias, e demais procedimentos terapêuticos (NUNES; DONES; MORILLO; ENCINA *et al.*, 2013).

O agente etiológico da DC é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Cujo o ciclo de vida foi caracterizado no ano de 1909 pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas. Na ocasião, além do agente etiológico, causador da doença; descreveu-se a forma de transmissão vetorial do protozoário parasita, pelos insetor hematófagos do gênero Reduviidae (barbeiros); e outros reservatórios naturais do parasito, além do ser humano, como tatus, e outros mamíferos silvestres (KROPF; SÁ, 2009). Aqui no Brasil, na década de 40 houve grande esforço para a erradicação do inseto vetor, e que resultou no controle do *Triatoma infestans*, o principal vetor do parasito no país. Contudo, existem outras espécies dos gêneros Panstrongylus, Triatoma e Rhodnius que ainda se encontram amplamente distribuídos na América Latina e que podem veicular a doença, sendo atualmente considerados importantes para a manutenção da vigilância epidemiológica no país (DIAS; RAMOS; GONTIJO; LUQUETTI *et al.*, 2016; J; M; CHANDA, 2021).

Além da clássica transmissão vetorial, a infecção pelo *T.cruzi* também pode ocorrer por outras vias como pela transfusão de sangue e transplante de órgãos, acidentes de laboratório, via placenta (transmissão vertical) e até mesmo de forma oral, pela ingestão de alimentos contaminados com o barbeiro ou suas fezes. Atualmente, a forma de infecção pela via oral tem ganhado notoriedade epidemiológica na América Latina, onde registrou-se nos últimos anos um aumento considerável de casos a partir dessa forma de infecção (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

Nos últimos anos, devido à chegada da DC em países como Estados Unidos e alguns países na Europa, o interesse pelo estudo da DC tem se ampliado. No entanto, o investimento em técnicas de prevenção e tratamento da doença ainda são escassos, principalmente no que se refere ao tratamento da fase crônica da infecção e a vacina disponível (GUARNER, 2019). Mecanismos imunológicos que mantêm ativas as respostas imunológicas inata e adquirida contra o parasita, apesar de basicamente elucidados, ainda não são suficientes para esclarecer

o motivo pela qual a imunidade do hospedeiro não consegue eliminar completamente todos os parasitos do tecido, bem como para se determinar novos alvos terapêuticos para manejo da doença (revisto por (J; M; CHANDA, 2021). Assim, pesquisas relacionadas a infecção por *T. cruzi* no contexto da resposta imunológica e fisiopatológica do hospedeiro merecem serem atualizados e ampliados, para possibilitar o entendimento completo dos mecanismos utilizados pelo parasito para evadir da resposta imunológica desencadeada pela interação parasito/hospedeiro.

Diante desses fatos, tendo na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, o programa de pós-graduação em Ciências da Saúde com ênfase em Infectologia e Medicina Tropical, e dentre suas linhas de pesquisa “Doença de Chagas - patogênese geral, imunopatogênese, clínica, morbidade, tratamento e prognóstico” este trabalho teve como proposta contribuir com o entendimento da persistência da inflamação e, a patologia progressiva vista na doença de Chagas. E avaliar como diferentes células do sistema imunológico contribuem com manutenção da imunopatologia das diferentes formas clínicas relacionadas à doença.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC), do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob a orientação da professora Dra. Walderez Ornelas Dutra, e da co-orientação da Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes, que também foi colaboradora, permitindo o acesso ao ambulatório de Cardiologia Bias Fortes, do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG. O trabalho contou também com a colaboração da Dra. Silvana de Araújo Silva, cardiologista no ambulatório de doença de Chagas do HC-UFMG, Belo Horizonte, MG.

Além disso, outra motivação na escolha do tema foi a ampla experiência com estudo da doença de Chagas acumulado pela coordenadora desta pesquisa, Dra. Walderez, e suas colaborações com cardiologistas responsáveis por dois ambulatórios hospitalares, referências no atendimento ao pacientes acometidos pela doença, e suas complicações cardiológicas.

Neste estudo, utilizou-se de amostras de sangue de pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas, e extrato bruto do parasita *T. cruzi*, e diferentes frações oriundas do mesmo, como estímulos.

Ao longo deste doutorado, foram realizadas outras colaborações com projetos paralelos envolvendo a imunopatologia da doença de Chagas, que renderam duas co-autorias de artigo; e a publicação do artigo de revisão “Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression”, anexado ao final deste documento.

A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

Esta tese soma-se a outras pesquisas básicas que visam ampliar o entendimento de parte da resposta imunológica sem estímulo e frente à exposição com antígenos do parasita. De forma a contribuir com informações que possam, futuramente, resultar no desenvolvimento de novas formas de prevenção, e tratamento da doença.

À luz dessa finalidade, foram realizados experimentos com amostras de sangue de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, a partir das quais foram extraídas células monocleares (monócitos e linfócitos). Essas células foram caracterizadas tanto quanto ao seu fenótipo e funcionalidade, como também foram avaliadas as correlações entre elas, para investigarmos sua possível associação durante a resposta imunológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito hemoflagelado membro da família Trypanosomatidae, da ordem Kinetoplastida. Este protozoário tem um ciclo de vida heteroxênico, dividido entre: um hospedeiro invertebrado da subfamília Triatominae, e um hospedeiro vertebrado que pode ser, dentre várias espécies de mamíferos, a espécie humana (**Figura 1** mostra o ciclo heteroxênico e os estágios evolutivos do parasito).

Além do ciclo de vida, a manutenção da infecção em seus hospedeiros vertebrados também é bastante complexa e adaptada, o que implica em muitas lacunas sobre o entendimento da doença causada em humanos.

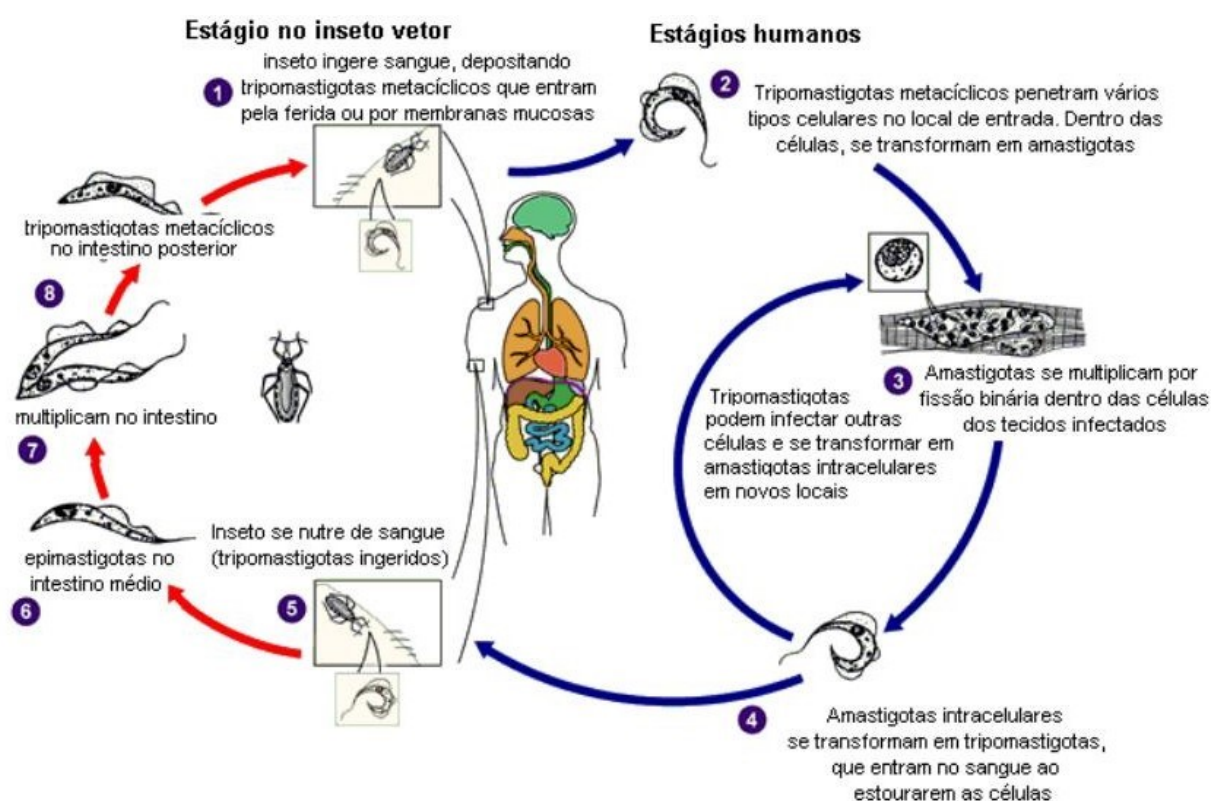


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

No que diz respeito ao estudo do protozoário, o estudo da composição do revestimento da membrana plasmática rica em moléculas glicídicas e lipídicas, denominado glicocálice, se faz importante devido à sua capacidade imunogênica, reconhecimento pelo hospedeiro, e

mecanismos de evasão da resposta imunológica (BUSCAGLIA; CAMPO; DI NOIA; TORRECILHAS *et al.*, 2004).

É sabido que a superfície externa da membrana do *T. cruzi* é revestida por um glicocálice denso e multiforme, que varia de acordo com o estágio de vida do parasito. Em sua fase tripomastigota, infectiva para humanos, tem como composição principal mucinas e glicoinositolfosfolípídeos livres (GIPLs). Essas glicoproteínas e glicolípídeos, assim como outras proteínas do *T. cruzi*, são ancoradas à membrana plasmática por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ALMEIDA; FERGUSON; SCHENKMAN; TRAVASSOS, 1994; GIORGI; DE LEDERKREMER, 2011).

Outra característica peculiar acerca do glicocálice desse parasito, é que as mucinas, GPI e GIPLs (**Figura 2**), devido sua natureza glicolípídica, podem ser apresentadas para linfócitos de maneira não-clássica, se ligando à moléculas da família *toll-like receptor* (TLR) (BAFICA; SANTIAGO; GOLDSZMID; ROPERT *et al.*, 2006) ou moléculas apresentadoras de antígenos da família CD1 (PORCELLI; MODLIN, 1999; TEYTON, 2018), que são o alvo deste estudo e discutiremos mais adiante.

As GPIs são moléculas presentes também em outros organismos, como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* e *Paracoccidioides* spp, e tem se mostrado importantes na ativação do sistema imune inato e como possíveis alvos imunoterpêuticos (GONÇALES; SALAMANCA; JÚNIOR; E SILVA *et al.*, 2021). Nas infecções humanas por *Plasmodium falciparum*, por exemplo, as moléculas de GPI ativam as vias de transdução de sinal, que resultam na secreção de TNF- α (SCHOFIELD; MCCONVILLE; HANSEN; CAMPBELL *et al.*, 1999). Já os lipofosfoglicanos (LPG) presentes em *Leishmania* são capazes de “desativar” monócitos humanos, e suprimir a capacidade de realizar explosão respiratória, importante mecanismo contra os parasitos intracelulares (DESCOTEAUX; TURCO; SACKS; MATLASHEWSKI, 1991).

Estudos com GIPLs de *T. cruzi* se mostraram importantes moduladores negativos de resposta de células T murinas, devido ao domínio ceramida (GOMES; PREVIATO; ZINGALES; MENDONÇA-PREVIATO *et al.*, 1996), e ativador de células B e secreção de imunoglobulinas devido à cadeia glicana (BARRY; VERSTEEG; WANG; POLLET *et al.*, 2019; BENTO; MELO; PREVIATO; MENDONÇA-PREVIATO *et al.*, 1996).

Através de estudos com modelos murinos, percebeu-se que os GIPLs e as GPIs são moléculas imunogênicas, com potencial para ativar ou suprimir a função de células imunológicas. No entanto, até o momento poucas são as pesquisas que mostram os efeitos de tais moléculas sobre no sistema imunológico humano, no contexto da DC. No entanto, alguns

estudos como o de Brodskyn e colaboradores (2002) que demonstraram que GIPL purificado da superfície de *T. cruzi* exerce atividade supressora sobre macrófagos humanos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (BRODSKYN; PATRICIO; OLIVEIRA; LOBO *et al.*, 2002). Estudos como de Gazinelli e Almeida (2001) tem dado indicativos acerca da capacidade estimulatória dessas moléculas também em humanos, o que traz à tona novas lacunas sobre seu papel na biologia da imunorregulação da resposta frente ao parasito (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001; ROPERT; GAZZINELLI, 2000).

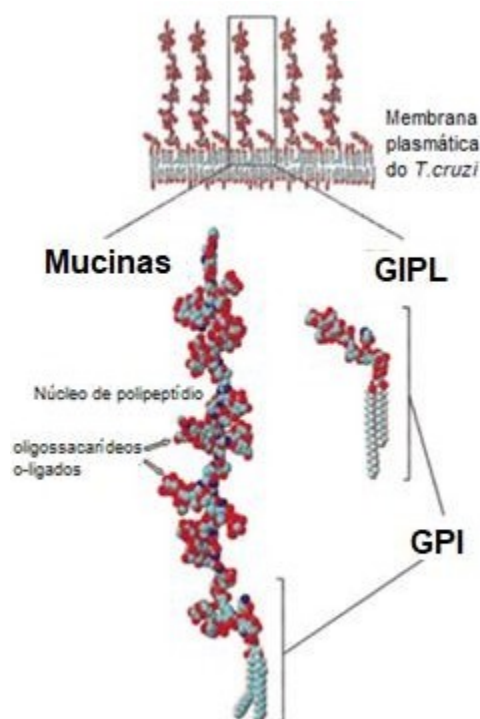


Figura 2: Estrutura glicolipoconjugados GPI, GIPL e mucinas presentes na membrana do *T. cruzi* (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001).

2.2 A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma complexa doença causada pelo protozoário *T. cruzi*. Descrita em 1909 pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas, a DC ainda é um importante problema de saúde pública, em pelo menos 21 países, especialmente na América Latina (KROPF; SÁ, 2009). No globo, atualmente, estima-se que

tenha aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas, e outras 100 milhões sob risco de infecção (WHO, 2021). No Brasil, a grande maioria dos casos prevalentes são crônicos, e afetam aproximadamente três milhões de pessoas (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A transmissão do protozoário é principalmente vetorial, podendo ocorrer também pela transfusão de sangue, transplante de órgãos, em acidentes laboratoriais, por via congênita ou ainda pela ingestão de alimentos com fezes ou barbeiros contaminados (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

Uma vez infectados, em humanos, a DC evolui em duas fases consecutivas: a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda, observa-se alto número de parasitos que podem ser encontrados no sangue e, por análises histológicas, em quase todos os órgãos, e no interior de vários tipos celulares (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015; GUARNER; BARTLETT; ZAKI; COLLEY *et al.*, 2001). A fase aguda desenvolve-se, majoritariamente, com sinais inespecíficos da infecção, o que dificulta um diagnóstico conclusivo e, portanto, uma intervenção terapêutica adequada. Cerca de 5% dos indivíduos infectados desenvolvem formas graves ainda na fase aguda que incluem miocardite e meningo-encefalite (COURA, 2007; CRUZ; MACHADO; ROPERT; ROMAN-CAMPOS, 2017; TEIXEIRA; NITZ; GUIMARO; GOMES *et al.*, 2006). A maioria dos achados sobre a resposta imunológica durante a fase aguda provém de modelos experimentais, dada a raridade ao acesso a esses casos na DC humana. Todavia, estudos com murinos demonstraram que, durante a fase aguda, a resposta inata tem um papel determinante na eliminação do patógeno através da promoção de um ambiente altamente inflamatório, ativação de células fagocíticas e secreção de citocinas como TNF- α e IL-12, que irão estimular células natural killer (NK) a produzir interferon- γ (IFN- γ) (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015).

Já a fase crônica, que se estabelece semanas após a fase aguda, é marcada por baixa parasitemia, resultado do desenvolvimento da resposta adaptativa específica contra antígenos do parasito, com a produção de anticorpos e ativação de linfócitos citotóxicos (GIORDANENGO; GUIÑAZÚ; STEMPIN; FRETES *et al.*, 2002; GUARNER, 2019).

O processamento dos parasitos internalizados, com posterior apresentação pelas células apresentadoras de antígenos, se dá pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, que ativarão respectivamente as células T CD8⁺ e T CD4⁺, ativando assim a linhagem adaptativa. Neste ponto, além da ativação de células da resposta inata e de linfócitos T e B, há a produção anticorpos com atividade lítica ao parasito, sendo considerados protetores (CORDEIRO; MARTINS-FILHO; DA COSTA ROCHA; ADAD *et al.*, 2001). A resposta imunológica na fase aguda é extremamente eficiente em controlar a

parasitemia, eliminando grande parte, mas não todos, os focos de infecção, o que faz com que a infecção torne-se crônica.

Cerca de 70% dos pacientes com DC crônica persistem sem apresentar sintomas e mantem exames, como eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax e abdômen, normais (RIBEIRO; NUNES; TEIXEIRA; ROCHA, 2012). Esses pacientes são classificados como portadores da forma clínica indeterminada, devido a um estado de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; ROSSI, 1991). Em contrapartida, por fatores ainda não esclarecidos que quebram esse delicado equilíbrio imunológico, cerca de 30% dos pacientes evoluem com complicações cardíacas e/ou gastrointestinais (megaesôfago e megacólon), características das formas cardíacas, digestiva ou ambas (NUNES; DONES; MORILLO; ENCINA *et al.*, 2013).

Dentre as manifestações clínicas mais graves está a cardiopatia chagásica crônica (C.C.C.), alvo principal desta pesquisa. No contexto da C.C.C., é sabido que a instalação do parasita dentro das células cardíacas, e ação do sistema imunológico para eliminá-lo, levam a lesões teciduais, e conseqüentemente alterações cardíacas significativas e progressivas, que causam disfunção miocárdica e podem levar à morte. Uma vez estabelecida a cardiopatia, a progressão da doença é inevitável.

O mecanismo pelo qual os indivíduos passam da forma indeterminada para essa forma cardíaca grave não está estabelecido. Porém, como veremos a seguir, uma resposta imunológica equilibrada, dentre outros fatores, tem um papel essencial na manutenção da forma indeterminada, e na progressão para a forma cardíaca (MENEZES; COSTA; GOLLOB; DUTRA, 2011).

2.3 Aspectos imunológicos das formas clínicas da DC humana

As duas formas clínicas vista da DC se diferem, além das alterações clínicas, também pelo perfil de citocinas predominante nos pacientes. Um perfil predominantemente inflamatório está associado a pacientes CARD, com alta expressão de TNF- α e de IFN- γ (GOMES; BAHIA-OLIVEIRA; ROCHA; MARTINS-FILHO *et al.*, 2003). Ambas as citocinas relacionam-se com pior quadro clínico, sendo TNF- α associado com pior função cardíaca, e IFN- γ com frequente progressão para quadros mais graves de cardiomiopatia (BESTETTI; DELLALIBERA-JOVILIANO; LOPES; FARIA-JR *et al.*, 2019; TALVANI; TEIXEIRA, 2011). Por outro lado, em pacientes IND, observa-se maior expressão das interleucinas 10 (IL-10) e 17 (IL-17), que está positivamente associada a melhor função

cardíaca (COSTA; DA COSTA ROCHA; MOREIRA; MENEZES *et al.*, 2009; GUEDES; GUTIERREZ; SILVA; DELLALIBERA-JOVILIANO *et al.*, 2012; MAGALHÃES; VILLANI; NUNES; GOLLOB *et al.*, 2013).

Apesar da infiltração cardíaca por leucócitos e a secreção de TNF- α serem fundamentais para controle do parasito e evitarem a reagudização da doença, tal fenômeno relaciona-se também com maiores deposições de fibrose no coração, levando às disfunções cardíacas, e contribuindo assim com a instauração da forma grave da doença (HIGUCHI; BENVENUTI; MARTINS REIS; METZGER, 2003; PISSETTI; CORREIA; DE OLIVEIRA; LLAGUNO *et al.*, 2011).

Os motivos pelos quais o TNF- α e seu receptor (TNFR) medeiam a resposta imunológica, passando por ajudar a controlar a parasitemia e, posteriormente, conduzindo à uma resposta inflamatória exacerbada, que leva à cardiomiopatia, não está bem esclarecido. Mas o controle da regulação dessa citocina parece estar relacionado com menores lesões teciduais, e conseqüentemente com melhor prognóstico do paciente (GIBALDI; VILAR-PEREIRA; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2020; KROLL-PALHARES; SILVÉRIO; SILVA; MICHAILOWSKY *et al.*, 2008).

Estudos histológicos estabeleceram que o infiltrado inflamatório presente nas lesões chagásicas cardíacas é composto principalmente por células mononucleares: linfócitos e macrófagos. Interessantemente, o infiltrado inflamatório cardíaco não está diretamente relacionado à escassez de parasitos nos órgãos, mas sim à formação de miocardite e fibrose, que levam a C.C.C. (REIS; JONES; TOSTES; LOPES *et al.*, 1993).

Como monócitos e linfócitos, majoritariamente, contribuem para as lesões cardíacas estudaremos mais a fundo a contribuição de cada tipo celular na doença.

2.3.1 O envolvimento de monócitos na DC

Os monócitos são células da resposta inata, heterogêneas e multifuncionais que podem ser classificados em clássicos (CD14⁺⁺, CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14^{low}CD16⁺), com base na sua expressão de CD14 e CD16 (VILLALTA; KIERSZENBAUM, 1984)

Quanto à função, parece não haver um consenso sobre os papéis definidos de cada subconjunto, podendo variar com a doença em estudo. No entanto, trabalhos recentes mostraram, paralelamente, que monócitos clássicos estão relacionados na produção de IL-10, fagocitose e estão envolvidos na reparação de tecidos. Monócitos intermediários participam

da angiogênese, exibem alta expressão de MHC de classe II e secretam maiores quantidades de TNF quando cultivados com células T pré-ativadas, sendo relacionadas como principais fontes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, dentre os subconjuntos. Já monócitos não-clássicos caracterizam-se por sua atividade de patrulhamento (revisto por (SANMARCO; EBERHARDT; PONCE; CANO *et al.*, 2017).

Apesar da heterogeneidade dos monócitos, e sua plasticidade em diversos contextos patológicos, vários estudos apóiam o papel central dos mesmos na inflamação e nos danos teciduais visto em cardiomiopatias e na progressão da insuficiência cardíaca congestiva (revisto por (WRIGLEY; LIP; SHANTSILA, 2011).

Além disso, os monócitos desempenham um papel importante na apresentação de antígenos, e ativação de células T. De fato, a indução de respostas imunológicas depende diretamente da ativação por células apresentadoras de antígenos (APCs), dentre elas monócitos. A ativação das células T requer a interação entre o receptor de células T (TCR) e a molécula apresentadora ligada ao antígeno. Desta forma, a depender da mensagem que foi transduzida e das moléculas acessórias que participaram da apresentação do antígeno, pode ocorrer a ativação ou a regulação negativa dos linfócitos. Inclusive, nessa etapa, microorganismos podem subverter o sistema imunológico através da regulação negativa de moléculas críticas para as APCs, como HLA-DR (VELGE; KUSNIERZ; OUAISSI; MARTY *et al.*, 1991).

No contexto da DC, os estágios iniciais da infecção, que antecedem a resposta adaptativa, são tidos com fundamentais para determinação da resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção. Sendo assim, o *T.cruzi* desencadeia em monócitos importantes alterações funcionais que incluem produção de altos níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, dentre elas IL-12, que estimulará a síntese de IFN- γ por células NK, e favorecerá a diferenciação de linfócitos para uma perfil inflamatório Th1 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; CARDILLO; DE PINHO; ANTAS; MENGEL, 2015; SILVA; VESPA; CARDOSO; ALIBERTI *et al.*, 1995). Paralelamente, monócitos ativados iniciam a síntese de espécies reativas de oxigênio e secreção de TNF- α , fenômenos essenciais para a controle da parasitemia no sangue e, conseqüentemente, resistência à infecção. Os parasitos fagocitados são processados no compartimento lisossomal, e seus antígenos apresentados via MHC-I para ativação de linfócitos T CD8⁺; via MCH-II para linfócitos T CD4⁺; ou via CD1 que ativa não só esses linfócitos, mas principalmente outra categoria menos frequente denominada T duplo negativo (T DN) (CAO; SUGITA; VAN

DER WEL; LAI *et al.*, 2002), dada a ausência das moléculas CD4 e CD8, e que abordaremos adiante.

Nos últimos anos, tem surgido estudos que vem caracterizando moléculas do parasito que medeiam, estimulam e regulam as funções celulares nos diferentes estágios da infecção. Como já mencionado, evidências experimentais sugerem que glicolipoconjugados derivados de *T. cruzi* desempenham um papel importante na ativação do sistema imune inato durante a infecção pelo protozoário. Dentre as propriedades biológicas desses glicolipoconjugados estão sua capacidade de induzir a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, geração de intermediários reativos de nitrogênio, bem como a expressão de moléculas de adesão por macrófagos hospedeiros e células endoteliais. Estudos tem demonstrado que os GPIs e os GIPLs isolados de tripomastigostas são potentes indutores de citocinas inflamatórias e síntese de óxido nítrico, tal como LPS (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001). Assim, essas moléculas abundantes do glicocálix do parasito são fundamentais para ativação de monócitos e desencadeiam intensa secreção de TNF- α e outras citocinas.

Neste contexto é importante ressaltar que apesar dessas moléculas exibirem propriedades de ativação precoce da resposta inata, elas podem concomitantemente participar de mecanismos de evasão do parasito ao sistema imunológico, através da modulação negativa de citocinas e moléculas apresentadoras de antígenos (CARDILLO; DE PINHO; ANTAS; MENGEL, 2015; FLÁVIA NARDY; FREIRE-DE-LIMA; MORROT, 2015). Portanto esse primeiro estágio, define uma etapa essencial para a permanência ou não do parasito. Além disso, em uma parcela dos casos, as atividades do sistema imunológico não são suficientes para eliminar o parasito dos tecidos do hospedeiro (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001).

Todavia, é inegável que a etapa de apresentação de antígenos é fundamental para ativação da resposta adaptativa. Essa etapa é também importante para definir-se uma resposta protetora, ou até mesmo contribuir para a manutenção de uma resposta inflamatória irresoluta, que conduz a lesões teciduais (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). Assim, compreender os mecanismos envolvidos na apresentação de antígenos é imprescindível para compreender os seus processos e suas consequências na resposta imunológica como um todo.

2.3.1.1 Apresentadores de antígenos lipídicos: família CD1

Identificadas pela primeira em 1979 por McMichael e colaboradores, as moléculas de CD1 são uma família de moléculas apresentadoras de antígenos de natureza glicolipídica ou lipopeptídica, sejam eles estranhos ou mesmo autolipídeos (MCMICHAEL; PILCH;

GALFRÉ; MASON *et al.*, 1979; PORCELLI; MODLIN, 1999; VINCENT; XIONG; GRANT; PENG *et al.*, 2005). Essa família exibe características semelhantes às moléculas MHC classe II, mas principalmente MHC classe I, tais como serem glicoproteínas de superfície celular heterodímeras, com uma cadeia pesada de 45 kD não covalentemente ligada a uma cadeia leve de 14 kD (DASCHER; BRENNER, 2003).

Quatro dentre os cinco genes *CD1* humanos codificam glicoproteínas de superfície celular que tem a capacidade única de se ligar a antígenos lipídicos e apresentá-los às células T (MAÎTRE; ANGÉNIEUX; SALAMERO; HANAU *et al.*, 2008). Esses genes codificam para 5 isoformas que são agrupadas em 3 grupos, com base em sua organização genômica, homologia de sequência e funções celulares:

- *Grupo 1*: 3 isoformas (CD1a, CD1b e CD1c) que exibem um padrão diferente de tráfego subcelular através do sistema endossômico. Expressas na superfície de uma ampla variedade de células hematopoéticas, e em vários tecidos linfóides e não linfóides, tornando-os aptos para apresentação de antígenos às células T. Nesse contexto é importante mencionar que monócitos derivados de sangue periférico expressam pouca ou nenhuma proteína CD1 do grupo 1. No entanto, é descrito que o tratamento com GM-CSF e IL-4 regula positivamente a expressão CD1 do grupo 1 (DASCHER; BRENNER, 2003). **CD1a**: o tráfego se dá por meio de endossomos de reciclagem precoce; **CD1b** tráfego por meio de endossomos tardios que colocalizam com lisossomas da molécula MHC de classe II; **CD1c** trafega amplamente através o sistema endocítico da célula (SUGITA; GRANT; VAN DONSELAAR; HSU *et al.*, 1999).
- *Grupo 2*: formado pela isoforma **CD1d**, principal molécula do estudo. A molécula de CD1d é expressa constitutivamente, em baixos níveis, em monócitos de sangue humano (PORCELLI; MODLIN, 1999)e, segundo Spada *et al.* não parece estar regulado positivamente após a ativação com GM-CSF e IL-4, mas ainda sim com expressão suficiente para a reestimulação *in vitro*, de células T restritas a CD1d (SPADA; BORRIELLO; SUGITA; WATTS *et al.*, 2000). A isoforma CD1d também é expressa em aproximadamente metade de todas as células B do sangue periférico, mas ausente em células T não ativadas (EXLEY; GARCIA; WILSON; SPADA *et al.*, 2000). As células CD1d+ apresentam lipoantígenos às células NKT invariáveis, um subconjunto que responde, após o estímulo, rapidamente e em massa, sendo um potente efetor da imunidade inata (YUE; SHAULOV; WANG; BALK *et al.*, 2005).

Resumindo, pode-se dizer que as isoformas de CD1 do grupo 1 e do grupo 2 diferem na distribuição na frequência e nos diferentes tecidos, o que sugere que esses dois grupos podem ter papéis distintos na apresentação de antígenos. Mas juntos aumentam a capacidade de amostrar amplamente o ambiente intracelular, no cenário de apresentação de antígenos lipídios derivados de patógenos às células T (DASCHER; BRENNER, 2003).

- *Grupo 3*: composto pela isoforma **CD1e**. Está fora da classificação padrão do grupo 1 ou 2 por ser a única isoforma de CD1 que não é expressa na superfície de APCs. Em células dendríticas imaturas, CD1e está localizado principalmente no aparelho de Golgi e em células dendríticas maduras, é detectado em endossomos tardios, onde é clivado em uma forma solúvel funcional. Acredita-se que CD1e facilite o processamento e apresentação de certos antígenos lipídicos apresentados por CD1b (BARRAL; BRENNER, 2007).

Diante dessas informações, é importante ressaltar ainda que a isoforma onde o lipídeo será ligado está intimamente relacionado ao padrão de tráfego de cada tipo de CD1. E tanto a proximidade quanto via transferência facilitada através de moléculas chaperonas lipídicas interferem na apresentação. A depender dessas características, bem como de parâmetros bioquímicos como o pH (devido à acidificação diferencial dos compartimentos endossômicos) e grupamentos químicos do antígeno, efeitos profundos na carga de lipídios e na estabilidade da molécula serão tidos. Assim, diferentes isoformas de CD1 serão expostas a um repertório diferente de antígenos lipídicos, dependendo desses fatores e de como são trafegados (ADAMS, 2013) (**Figura 3**).

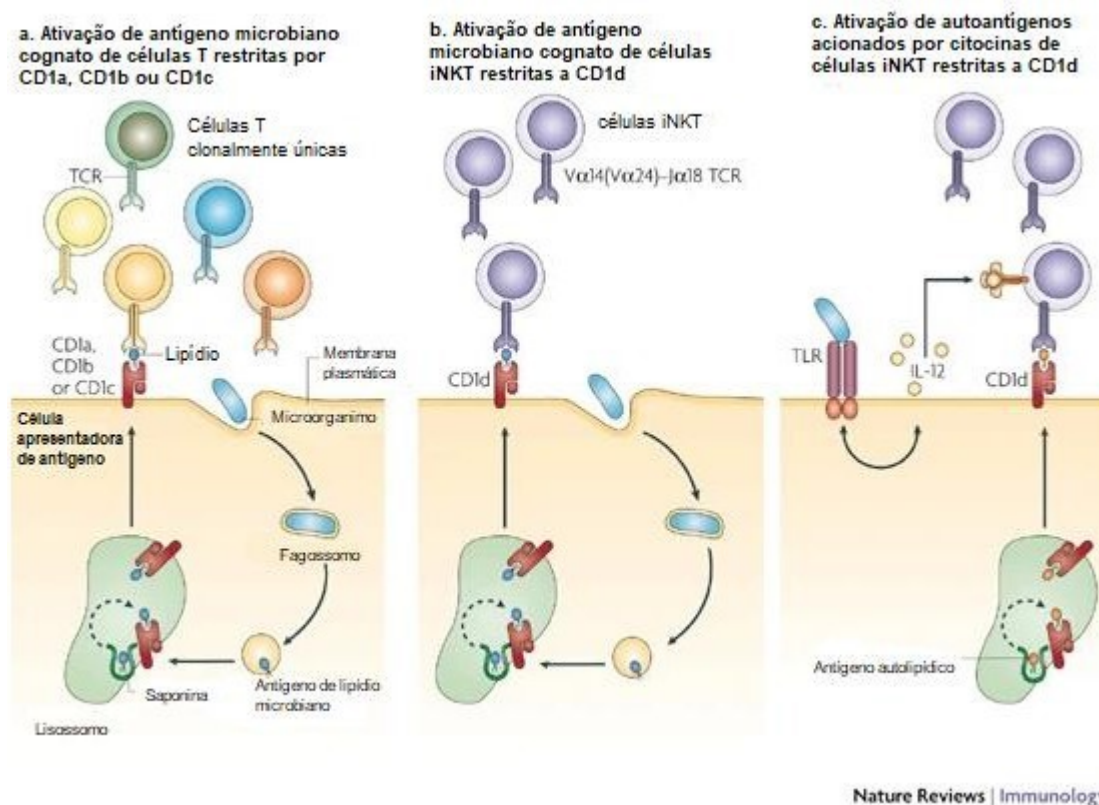


Figura 3: Apresentação de antígenos pelas moléculas da família CD1, grupos 1 e 2. (Adaptada de Adams, 2013).

As diferenças entre a família HLA e CD1, tem-se que as moléculas da família CD1 apresentam distintas propriedades na apresentação de antígenos devido às estruturas em seus locais de ligação ao antígeno e por suas vias celulares. (MAÎTRE; ANGÉNIEUX; SALAMERO; HANAU *et al.*, 2008). As proteínas CD1a, CD1b, CD1c e CD1d se associam à microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$), e essa associação é necessária para a expressão da superfície celular das três primeiras dessas proteínas, similarmente às moléculas de HLA classe I (ANGÉNIEUX; FRAISIER; MAÎTRE; RACINE *et al.*, 2005).

Além disso, diferentemente do complexo polimórfico de histocompatibilidade principal (MHC), a família de moléculas CD1 são consideradas apresentadoras de antígenos monomórficos, e podem ativar populações conservadas de células T respondentes, que não se associam à herança genética do doador e podem exibir TCR altamente conservados na espécie humana (GRAS; VAN RHIJN; SHAHINE; CHENG *et al.*, 2016). Um exemplo típico corresponde às células T Natural Killer (NKT) tipo I, que normalmente expressam TCR que reconhecem CD1d (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007), no entanto existem outras

subpopulações de linfócitos T com o TCR conservado e menos diverso, e que são ativados por essa família, como veremos a seguir.

2.3.2 Linfócitos T na DC humana

Já foi demonstrado que linfócitos T são importantes produtores de citocinas nos pacientes com doença de Chagas. Neste contexto, os linfócitos T CD4⁺ tem papel fundamental neste processo, embora linfócitos T CD8⁺ possam também produzir citocinas (revisto por (MENEZES; COSTA; GOLLOB; DUTRA, 2011)).

Todavia, estudos recentes do nosso grupo demonstraram que uma subpopulação de células T que não expressa os co-receptores CD4 e CD8 e, portanto, denominadas duplo-negativas (DN), são importantes produtoras de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias na doença de Chagas (VILLANI; ROCHA; NUNES; ANTONELLI *et al.*, 2010).

De fato, o fenótipo negativo para as moléculas CD4 e CD8 agrupam um grupo de células heterogêneo, com características, marcadores e funções distintas. Além disso, durante os estudos dessas células T DN, produzimos um artigo de revisão que traz informações detalhadas e atualizadas sobre o papel das células T DN em diversas doenças, inclusive na DC. A tabela 1, incluída na revisão publicada, caracteriza as principais subpopulações de células T DN.

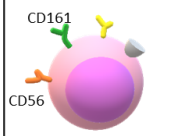
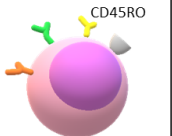
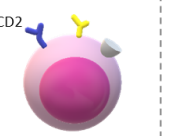
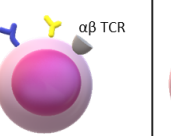
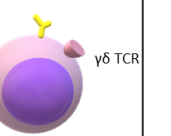
Resumidamente, para entendimento deste trabalho, de forma geral, temos que os linfócitos T DN são inicialmente subdivididos de acordo com o tipo do TCR que expressam, seja $\alpha\beta$ TCR (alfa-beta) ou $\gamma\delta$ TCR (gama-delta) (FISHER; ROSENBERG; STRAUS; DALE *et al.*, 1995). Além da não expressão de CD4 e CD8, se durante a ontogenia das células T, o TCR dessas células apresentarem repertório conservado e pouco variado, sendo inapto ao reconhecimento peptídico, esses linfócitos então, seja TCR alfa-beta ou gama-delta, irão reconhecer preferencialmente lipídeos e glicolipídeos de maneira não clássica, apresentados via moléculas da família CD1, por APCs (CARDING; EGAN, 2002; PORCELLI; MORITA; BRENNER, 1992).

Estudando-se as células T DN na DC, nosso grupo demonstrou que estas células proliferam perante o estímulo com antígenos derivados do *T. cruzi*, especialmente glicoproteínas (PASSOS; MAGALHÃES; SOARES; MARQUES *et al.*, 2017). Demonstrou-se, ainda, que, bloqueando-se a ativação dessas células em pacientes chagásicos cardiopatas, houve diminuição da expressão de IFN- γ e alteração de citocinas produzidas para um perfil antiinflamatório, sem, contudo, afetar a ativação dos demais linfócitos CD4⁺ e CD8⁺

(PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016). Estes dados já apontam as células T DN como um potencial alvo imunoterapêutico.

Uma vez que o glicolipídeos, altamente expressos na membrana de *T.cruzi*, são apresentados pelos monócitos via família CD1 para linfócitos com T DN, fica claro a importância de se estudar com profundidade as etapas de ativação dos monócitos, apresentação desses antígenos e a partir daí os desdobramentos da resposta imunológica nas células T DN, para que se trace uma estratégia precisa de intervenção imunológica, que impedirá ou reduzirá a inflamação, e conseqüentemente prevenirá maiores lesões nos pacientes com C.C.C.

Tabela 1: Classificação fenotípica e funcional da células T duplo negativas (Velikkakam, *et al.*, 2021).

	NKT-I	NKT-II	DN T (Inflamatório)	DN T (Regulatório)	$\gamma\delta$ DN
					
TCR	Invariante $\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$		$\gamma\delta$
Ontogenia	Tímica - CD1d	Tímica	Tímica/Extra-Tímica		Tímica/Extra-Tímica
Fenótipo	CD45RO, CD56, CD161, alta ativação de marcadores		CD45RO, Eomes high, CD2 low, ativação de marcadores		CD45RO, ativação de marcadores
Restrição	CD1d α -GalCer	CD1d	MHC I, II, & CD1 moléculas		MHC I, II, & CD1 moléculas
Repertório	Oligoclonal conservada	Policlonal	Policlonal		Oligoclonal/ Policlonal
Função	Atividades citolíticas inflamatórias ou supressivas, dependendo do sistema estudado		Atividades citolíticas inflamatórias: IFN- γ , TNF, Granz.	Atividades Supressivas : IL-10	Atividades citolíticas inflamatórias ou supressivas, dependendo do sistema estudado

3. JUSTIFICATIVA

Apesar da DC ter sido descrita há mais de um século, por ser uma doença mais presente em países em desenvolvimento e relacionada a piores condições socioeconômicas, portanto classificada como uma doença negligenciada (HOTEZ; MOLYNEUX; FENWICK; KUMARESAN *et al.*, 2007), a doença conta com um tratamento quimioterápico limitado a duas drogas nitro-heterocíclicas: a benznidazol (droga de primeira escolha na América Latina) e nifurtimox (LAURIA-PIRES; BRAGA; VEXENAT; NITZ *et al.*, 2000). Ambas as drogas apesar de eficazes na cura parasitológica na fase aguda, durante a fase crônica e mais prevalente da doença apresentam baixa eficácia e causam ainda graves efeitos adversos (ROMANHA; CASTRO; SOEIRO; LANNES-VIEIRA *et al.*, 2010). Consensualmente, assume-se que o tratamento com essas drogas, apesar de depurar os tripanossomas no sangue, é apenas paliativo. E fato é que, aproximadamente, 20% dos pacientes com C.C.C. morrerão dentro de cinco anos após o diagnóstico cardíaco, representando uma mortalidade considerável associada à doença (MORILLO; MARIN-NETO; AVEZUM; SOSA-ESTANI *et al.*, 2015; RASSI; MARIN, 2017).

Além disso, a DC configura ainda um grande problema de saúde pública devido aos alto índice de morbidade. Estima-se que gastos com aposentadorias, afastamentos, e agravamentos com co-morbididades custem aos sistemas públicos de saúde mais de 7 bilhões de dólares anuais (LEE; BACON; BOTTAZZI; HOTEZ, 2013).

Finalmente, não existe ainda vacina ou qualquer outro método profilático para prevenção da doença de Chagas, nem tem pouco tratamento curativo para a fase mais prevalente, e potencialmente mortal, da doença. Além disso, uma vez estabelecida a cardiopatia chagásica não é possível parar a progressão da doença, tampouco reverter os danos teciduais cumulativos. Sendo assim fazem-se necessários esforços para descobrir-se formas alternativas tratamento da doença que impessam a deteriorização da saúde do paciente. (CRUZ; MACHADO; ROPERT; ROMAN-CAMPOS, 2017). Na ausência de vacinas e drogas terapêuticas eficazes para a fase crônica, a abordagem do nosso grupo de pesquisa é tentar manipular a resposta imunológica do hospedeiro para inibir a progressão da imunopatologia, evitando, assim, o desenvolvimento da cardiopatia

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis mecanismos de ativação, características funcionais e moleculares dos monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas, avaliando suas características com a ativação das células T DN.

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Determinar o envolvimento de monócitos na ativação de células T DN por avaliação:

- Do perfil de expressão de moléculas da família CD1 em subpopulações de monócitos;
- Das características funcionais dos monócitos CD1d⁺;
- Da associação da expressão de CD1d e a ativação de células T DN;
- Dos antígenos derivados do parasita que estimulam monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas de doença de Chagas;
- Da correlação com os parâmetros clínicos do paciente e características funcionais dos monócitos.
- Da correlação dos dados da caracterização funcional dos monócitos com as características de ativação das células T DN em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

5. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes e amostras de sangue

Foram incluídos no estudo, pacientes com doença de Chagas de áreas endêmicas de Minas Gerais, acompanhados em ambulatórios do Hospital das Clínicas (HC), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este projeto está de acordo com as diretrizes recomendadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), cujo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) se encontra registrado sob o número 93968218.7.0000.5149.

Os pacientes com cardiopatia chagásica crônica incluídos neste estudo são acompanhados pela cardiologista Maria do Carmo Pereira Nunes, no ambulatório Bias Fortes, da UFMG. Já os pacientes com a forma clínica indeterminada são acompanhados pela cardiologista Silvana de Araújo Silva, no ambulatório de doença de Chagas do HC-UFMG. A classificação e inclusão dos pacientes nos grupos clínicos Indeterminado (IND) ou Cardiopatia Chagásica Crônica (C.C.C. - CARD) se deu pelos seguintes critérios clínicos e exames:

- forma clínica indeterminada: ausência de manifestações clínicas, ou ausência de alterações ao eletrocardiograma e estudos radiológico do tórax e trato gastrointestinal;
- forma clínica cardíaca: alterações eletrocardiográficas, disfunção ventricular esquerda global ou segmentar e manifestações clínicas de insuficiência cardíaca. Neste grupo, os pacientes foram subdivididos em cardiopatia grau B1, B2, C e D, conforme a classificação dos estágios de desenvolvimento da insuficiência cardíaca, adaptado para doença de Chagas (ANDRADE; MARIN NETO; PAOLA; VILAS-BOAS *et al.*, 2011).

Todos os pacientes incluídos, tem sorologia positiva para *T. cruzi*. Foram excluídos deste estudo, pacientes com comorbidades como HIV, diabetes, doenças autoimunes e demais doenças infectocontagiosas no momento da coleta de sangue. Todas as pessoas incluídas receberam instruções sobre sua participação voluntária no projeto, bem como os cuidados clínicos necessários. Esse projeto tem aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº do parecer 2.809.859) e está de acordo com a Declaração de Helsinque. Ademais, todos os pacientes tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e consentiram a participação.

5.2 Processamento da amostra

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) foram recolhidas de sangue total seguindo protocolo rotineiramente usado no laboratório de Interações Celulares (SOUZA; ROCHA; ROCHA-VIEIRA; MENEZES *et al.*, 2004). Brevemente: as amostras de sangue foram coletadas em tubo com heparina sódica (BD®), e acondicionados em temperatura ambiente (T.A) até a retirada do plasma. Após centrifugação de 10 minutos, a 600G, o plasma foi separado da fração celular do sangue. Em seguida, o sangue foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS – Gibco®), e adicionado sobre o reagente Ficoll-Paque (GE - HealthCare®), para separação das PBMC.

Após centrifugação de 40 minutos, T.A., o anel de PBMC foi coletado, e lavado três vezes com PBS, a 4°C. As PBMC obtidas foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, Rockville, MD, EUA) suplementado com: 5% de soro humano inativado por calor (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), antibióticos (penicilina, 200 U/ml e estreptomicina, 01 mg/ml) e L-glutamina (1 mM) (Sigma, Aldrich) a uma concentração de 1×10^7 células/ml. Um total de 3×10^6 células por *well* de cada voluntário foram colocadas, em placas de 96 poços (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY) em culturas de 200 μ L sob as condições: apenas meio, ou estimuladas com extrato bruto de *T.cruzi*. Após 14 horas de incubação, foi adicionada Brefeldina A (10 μ g/mL) (BioLegend) à cultura para impedir a secreção de citocinas. Após 18 horas totais em cultura, as células foram lavadas com PBS e executou-se o protocolo de marcação para citometria de fluxo.

5.3 Extrato bruto de *T.cruzi*

Para a preparação extrato bruto de antígeno de parasitos (TRP), tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em linhagens de células Vero ou L929 (CERÁVOLO; CHAVES; BONJARDIM; SIBLEY *et al.*, 1999). Brevemente: as células foram infectadas com 10 tripomastigotas/célula, lavadas com meio de cultura para remoção das tripomastigotas livres, e finalmente mantidas por aproximadamente 5 dias em RPMI enriquecido com 1% de soro bovino e antibiótico (penicilina a 500 U / ml e estreptomicina em 0,5 mg / ml). Após esse período em cultura, as tripomastigotas livres foram coletadas do sobrenadante. A presença estimada de formas amastigotas foi sempre inferior a 3%. A partir dos parasitas obtidos, o extrato bruto foi preparado por homogeneização de parasitas em um sonicador na presença de solução inibidora de protease a 1% (1 mM EDTA, 2 μ g de aprotinina/ml, 2 μ g de

leupeptina/ml, 50 µg de N α-p-tosil-l-lisina clorometil cetona [TLCK]/ml, 100 µg de fluoreto de fenilmetilsulfonil/ml). Após três ciclos de ruptura, a mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000g e 4°C, e o sobrenadante foi coletado. O conteúdo de proteína foi determinado usando o método de Bradford. Uma concentração final de 20µg/ml do antígeno de tripomastigota foi usada em parte dos experimentos indicado como estímulo TRP (MORATO; BRENER; CANÇADO; NUNES *et al.*, 1986).

5.4 Obtenção das frações de *T. cruzi*

Um extrato bruto de antígeno de *T. cruzi* foi processado de forma a separar diferentes classes de moléculas antigênicas em frações, sendo essas rica em: carboidratos (CHO), lipídios (LIP) ou proteínas (PRO). As frações foram preparadas pela Dra. Livia Silva Araújo Passos e utilizadas em experimentos para avaliação de ativação de células T DN (ALMEIDA; CAMARGO; PROCÓPIO; SILVA *et al.*, 2000; PASSOS; MAGALHÃES; SOARES; MARQUES *et al.*, 2017). Foram utilizadas as formas tripomastigotas do *T. cruzi* do clone CL Brener, obtidas do sobrenadante das culturas de células VERO infectadas com 1×10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* (proporção 10 parasitos por célula). Ao final, um total de 2×10^9 que foram recuperadas e armazenados na forma de pellet seco em freezer – 80°C.

Frações de formas tripomastigotas foram obtidas utilizando-se a metodologia publicada por Almeida e colaboradores, 2000. Resumidamente, os pellets obtidos foram ressuspensos em 1,6 mL de água ultrapura e transferidos para tubos de vidro. Foram adicionados a cada tubo clorofórmio e metanol de forma a se obter um proporção de 1:2:0.8 (v/v/v) clorofórmio/metanol/água. As amostras foram vigorosamente homogeneizadas em vórtex, e posteriormente centrifugadas por 15 minutos 1.800g a temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por três vezes. Foi adicionado ao *pellet* remanescente novamente solução extratora contendo clorofórmio e metanol (2:1 v/v) e amostra homogeneizada no vórtex por 2 minutos e então centrifugada por 15 minutos 1.800g a temperatura ambiente. O material insolúvel dos tripomastigotas foi armazenado em freezer –80°C para extração posterior de proteínas. Ao final de cada etapa de extração, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos de vidro, colocadas em liofilizador, e em seguida, foi realizada a partição de Folch's (Folch's *et al.*, 1957).

Que consiste em novamente, dissolver as amostras em clorofórmio, metanol e água na proporção de 4:2:1,5 (v/v/v) e então agitá-las vigorosamente em vórtex por 5 minutos e posteriormente centrigrar por 15 minutos 1.800g a temperatura ambiente. Após a

centrifugação, foram obtidas a fase inferior (fase orgânica) contendo lipídios neutros e a fase superior (aquosa) contendo os glicolipídios. Por fim, as amostras foram novamente liofilizadas. A fração lipídica (LIP), contendo principalmente lipídios de membrana foi ressuspensa em 1,0 mL de dimetilsulfóxido- DMSO (Merck®) e a fração glicolipídica (CHO), foi ressuspensa em 1,0 mL de água ultrapura e armazenadas em freezer -80 °C até o uso.

Para a extração de proteínas, foi utilizado o material insolúvel das formas tripomastigotas obtido após extração dos lipídios e glicolipídios. Para esse fim, foram realizadas três extrações com solução de butanol 9% por 4 horas na proporção de 10:1 sob agitação e à temperatura ambiente. Os extratos foram colocados em liofilizador. A fração de proteínas (PRO) foi ressuspensa em 1,0 mL de água ultrapura e armazenada em freezer -80°C até o uso.

5.4.1 Estímulo *in vitro* com diferentes frações de *T. cruzi*

As PBMCs de pacientes com doença de Chagas foram processadas conforme protocolo seguido no laboratório (e descrito na seção 6.3 deste volume). As suspensões celulares dos pacientes foram incubadas em placas de 96 poços de fundo em U (Costar, Corning Incorporated, Corning NY) em volume final de 200ul sob as condições: Meio de cultura RPMI apenas suplementado (5% soro humano, 1,6% de L-glutamina, 3,0% de antibiótico penicilina/estreptomicina), 20 ug/mL de CHO ou LIP (equivalente a 5 parasitos) e PRO (equivalente a 10 a parasitos) por um período de 18. A Brefeldina A foi adicionada nas últimas 4 horas de cultura.

Essas células foram então marcadas com anticorpos de superfície e intracelulares. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACScanto II), com uma média de 100.000 eventos no *gate* de linfócitos (PASSOS; MAGALHÃES; SOARES; MARQUES *et al.*, 2017). Os dados de tais experimentos foram reanalisados no presente estudo, com foco na ativação de monócitos de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

5.5 Citometria de fluxo

Para as comparações imunofenotípicas entre as PBMCs de pacientes de diferentes formas clínicas, estimuladas ou não com TRP, foram feitas análises multiparamétricas por citometria de fluxo, a fim de se caracterizar fenotipo e funcionalmente as subpopulações de monócitos.

O protocolo para execução da citometria de fluxo, seguiu protocolo adotado no laboratório de Biologia das Interações Celulares (SOUZA; ROCHA; ROCHA-VIEIRA; MENEZES *et al.*, 2004). Brevemente: após processamento prévio, foi executado o procedimento para bloqueio das porções Fc de imunoglobulinas, para reduzir a marcações inespecíficas. O bloqueio utilizou a solução Human BD® FC Block (Clone Fc1.3216 - RUO), antes das marcações conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, às PBMC foram adicionadas anticorpos para marcação de superfície, conforme descrito na tabela abaixo, com as concentrações previamente determinadas pela titulação dos anticorpos.

Tabela 2: Descrição dos anticorpos usados nas marcações para ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo:

Molécula	Fluorocromo	Clone	Lote	Volume*	Marca
Marcação Superfície					
HLA-DR	APC Cy7	L243	B272895	1,2µl	BioLegend
CD14	BV510	63D3	B308954	2,4µl	BioLegend
CD16	APC	3G8	B213523	2,4µl	BioLegend
CD120	APC	3G7A02	B282324	3µl	BioLegend
CD1a	BV421	Hi149	B270835	4,8µl	BioLegend
CD1b	PE	SN13	B267105	2,4µl	BioLegend
CD1c	PeCy7	L161	B256006	1,2µl	BioLegend
CD1d	PercpCy5.5	51.1	B253502	2,4µl	BioLegend
Fas-L	BV421	NOK-1	B280577	3,6µl	BioLegend
PDL-1	FITC	MIH2	B273379	1,2µl	BioLegend
Marcação Intracelular					
IL-10	PeCy7	JES3-9D7	B257737	4,8µl	BioLegend
TNF-alfa	PE	-	86482 (B)	4,8µl	BD Bioscience

*Volume determinado pela titulação prévia dos anticorpos. Volume utilizado para marcação de 3×10^5 células, com solução estoque dos anticorpos na concentração de 0,5mg/ml.

Após 30 minutos de incubação, protegidas da luz, as células foram lavadas e fixadas com solução de formaldeído a 2%. Após 3 lavagens em PBS, foi feita a marcação intracelular. Para tanto, as células foram incubadas com solução com saponina a 0,5%. Após 15 minutos, anticorpos anti-citocinas foram adicionados, e as células foram incubadas por mais 20 minutos, a T.A.

Após três lavagens (duas com solução de saponina 0,5% e uma com PBS), as células foram adquiridas no citometro de fluxo FACs Canto II (BD Bioscience®). As compensações necessárias, e posteriores análises foram feitas pelo software FACsDiva® e FlowJo®.

5.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos após a leitura no citometro de fluxo foram inicialmente analisadas de forma não-supervisionada, onde o recurso de *Machine Learnig*, do *software* FlowJo® foi utilizado para apontar as principais diferenças entre as formas clínicas. Para essas análises um total de 20 pacientes, sendo 10 pacientes CARD e 10 pacientes IND foram incluídos. Além disso, para a normalização dos dados, além do mesmo n entre os grupos, também igualou-se o número de eventos analisados dentro da população de monócitos, de cada paciente para não enviesar a análise.

Posteriormente, foram feitas análises supervisionadas, ainda no FlowJo®, para obtenção de dados quantitativos. Foram incluídas nessas análises 13 pacientes CARD e 8 pacientes IND.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o GraphPrism® 8.0.2. (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente, para verificar as diferenças entre as formas clínicas ou entre as condições foi feito teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Pela heterogeneidade e n diminuo, os dados foram tratados como não-paramétricos e aplicados os testes de Wiconxon para as comparações pareadas, e o teste de Mann-Whitney em comparações não pareadas. Foram considerados estatisticamente significativas diferenças com valores de $p < 0,005$.

As correlações foram feitas utilizando o T pareado para determinar as diferenças estatísticas, e usando coeficiente de Pearson (dados paramétricos) e correções de Spearman (dados não-paramétricos). Todos os dados de correlação foram tratados com regressões lineares. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Monócitos de pacientes CARD apresentam perfil inflamatório enquanto monócitos de pacientes IND tem perfil anti-inflamatório

Inicialmente, propusemo-nos a caracterizar os monócitos de pacientes das formas clínicas cardíaca (CARD) e indeterminada (IND) da DC. Para isso, foram combinados os marcadores CD14⁺ e HLA-DR⁺ para definirmos a população de monócitos ativados, e a partir dessa, também analisamos as subpopulações de monócitos que expressam os marcadores: CD120 (inflamação), PDL-1 (ligante de morte programado 1), Fas-L (ligante de antígeno 1 da apoptose), e as citocinas IL-10 (modulação regulatória) e TNF- α (pró-inflamatória).

As análises não supervisionadas revelaram uma distribuição relativamente homogênea de monócitos TNF⁺ em ambas as formas clínicas, e um acúmulo de monócitos IL-10⁺ nas regiões correspondentes a IND (com ou sem estímulo), mas também em CARD TRP (**Figuras 4A-B**). Analisando-se os dados de análises supervisionadas de citometria de fluxo, e aplicando-se os devidos testes estatísticos, pudemos observar que o estímulo TRP aumentou significativamente a frequência de monócitos TNF- α ⁺ em pacientes CARD, quando comparados aos monócitos IND sob a mesma condição. Por outro lado, em pacientes IND observamos, na condição *sem estímulo*, uma maior frequência de monócitos IL-10⁺ quando comparado ao grupo CARD meio. Interessantemente, o estímulo com TRP aumentou a frequência de monócitos IL-10⁺ no grupo CARD, e diminuiu a frequência no grupo IND (**Figura 4C**).

A fim de traçar e comparar o perfil funcional de monócitos entre as diferentes formas clínicas da DC, bem como essa população se comporta frente ao estímulo com TRP, realizamos uma razão entre a frequência de monócitos TNF- α ⁺ e monócitos IL-10⁺. A razão TNF/IL-10 também indicou uma maior razão na expressão de TNF- α , com ou sem estímulo, em monócitos de pacientes CARD (**Figura 4D**). O que demonstra claramente um perfil majoritariamente mais inflamatório nos monócitos dos pacientes CARD quando comparados aos pacientes IND.

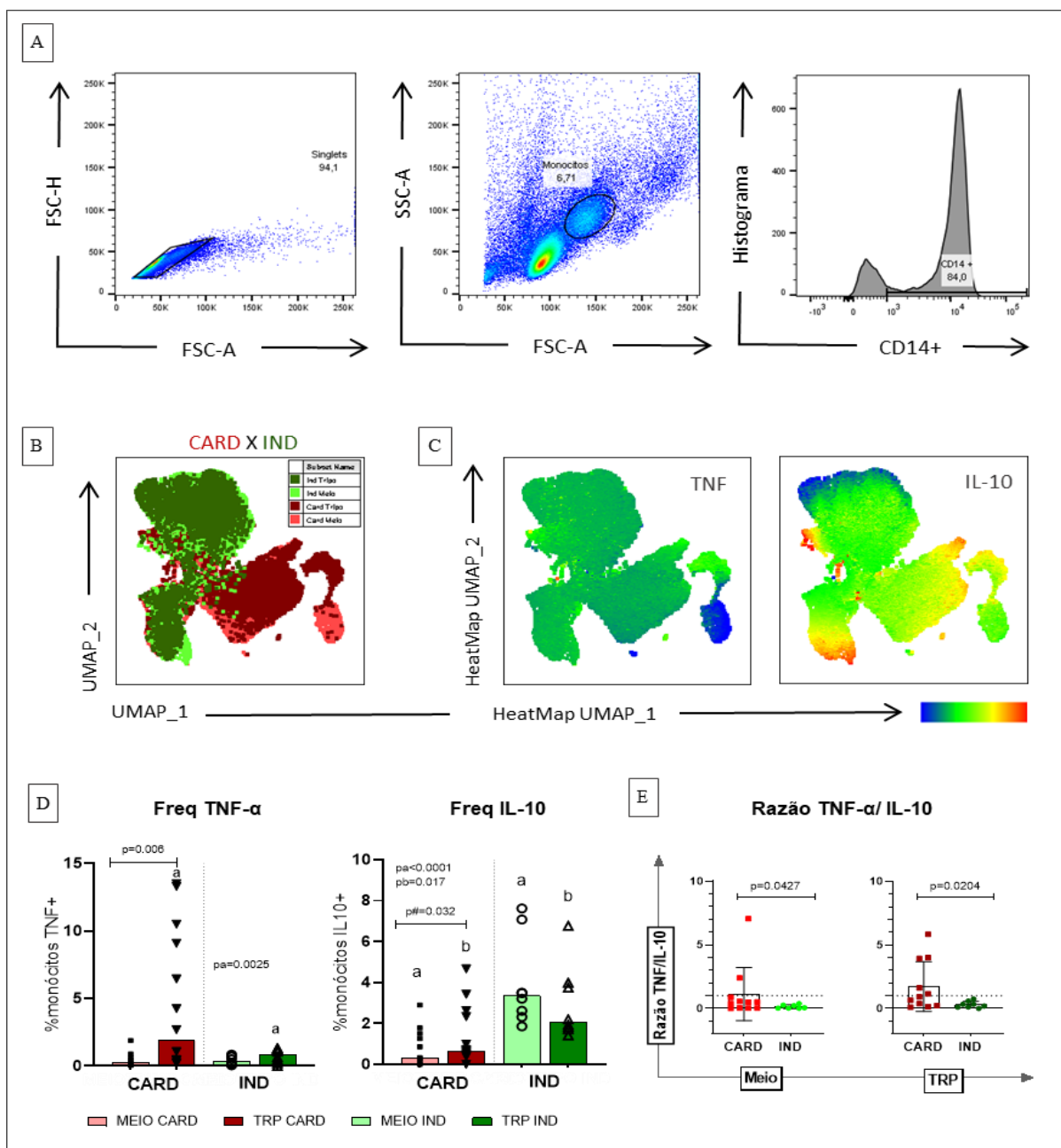


Figura 4: Frequência e distribuição das subpopulações de monócitos $TNF-\alpha^+$ e $IL-10^+$ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. (A) Estratégia de gate usada para delimitar a população de monócitos totais utilizando o marcador CD14. (B) Análise não supervisionada, guiada por UMAP, da distribuição por similaridade de monócitos de pacientes com as formas clínicas cardíaca (CARD) e indeterminada (IND) da doença de Chagas, com ou sem estímulo. A análise UMAP foi realizada usando os marcadores CD14, HLA-DR, $TNF-\alpha$, IL-10, Fas-L, PDL-1 e CD120. As populações definidas seguem o padrão representativo de cores atribuídas: monócitos de pacientes CARD sem estímulo em vermelho claro, monócitos de pacientes CARD com estímulo TRP, em vermelho escuro, monócitos de pacientes IND sem estímulo em verde claro e monócitos de pacientes IND com estímulo TRP, em verde escuro. (C) Mapa de calor da frequência de monócitos $TNF-\alpha^+$ ou $IL-10^+$ projetados sobre o espaço UMAP. (D) Avaliação da frequência de monócitos $TNF-\alpha^+$ e $IL-10^+$ em células mononucleares do sangue periférico de pacientes CARD ou IND. As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos de pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. (E) Razão entre a frequência de monócitos $TNF-\alpha^+$ / $IL-10^+$. O símbolo # indica as comparações pareadas, com $p < 0,05$. As letras a e b indicam as significâncias estatísticas entre as formas clínicas sob as diferentes condições, e indicam $p < 0,05$.

Em sequência, a fim de entender se o TNF- α produzido por monócitos ativados (CD14⁺HLA-DR⁺) tinha ação nessas mesmas células, possivelmente atuando em uma retroalimentação positiva para a manutenção de monócitos inflamatórios, analisamos a expressão do receptor 1 de TNF- α (CD120a) nessa população de monócitos. Por análises não supervisionadas, percebeu-se, que apesar de IND ter ampla distribuição de CD120 (indicado pela frequência) e ativação (indicada por intensidade média de fluorescência - *MFI*), a área onde há a co-expressão de TNF e CD120 corresponde ao grupo CARD (**Figura 5A-B**).

Os nossos dados quantitativos demonstraram que apesar de *sem estímulo* os grupos CARD e IND não apresentarem diferenças estatísticas na frequência de monócitos CD120⁺, a frequência de monócitos CD120⁺ de pacientes CARD aumentou significativamente com o estímulo TRP quando comparado ao grupo IND TRP. Em paralelo, no grupo IND, o estímulo TRP diminuiu a frequência e a expressão de monócitos CD120⁺ (**Figura 5C**). No que diz respeito à expressão desse receptor, nossos dados indicaram que o grupo CARD com ou sem estímulo apresenta maior expressão de CD120 quando comparado ao grupo IND. Além da frequência, o estímulo TRP diminuiu também a expressão de CD120 em monócitos do grupo IND (**Figura 5C**).

Avaliamos ainda a co-expressão de TNF- α e seu receptor, e pudemos corroborar, que como observado no gráfico de calor aplicado sobre o UMAP de MFI de TNF- α e CD120, as análises quantitativas mostraram que pacientes CARD estimulados com TRP apresentaram maior frequência de monócitos TNF⁺CD120⁺, com ou sem estímulo de TRP, quando comparado com o grupo IND. Essas análises indicaram ainda que em ambos os grupos, o estímulo TRP aumentou a frequência de monócitos que co-expressam TNF- α e seu receptor, o que pode sugerir uma ação autócrina dessa citocina (**Figura 5D**).

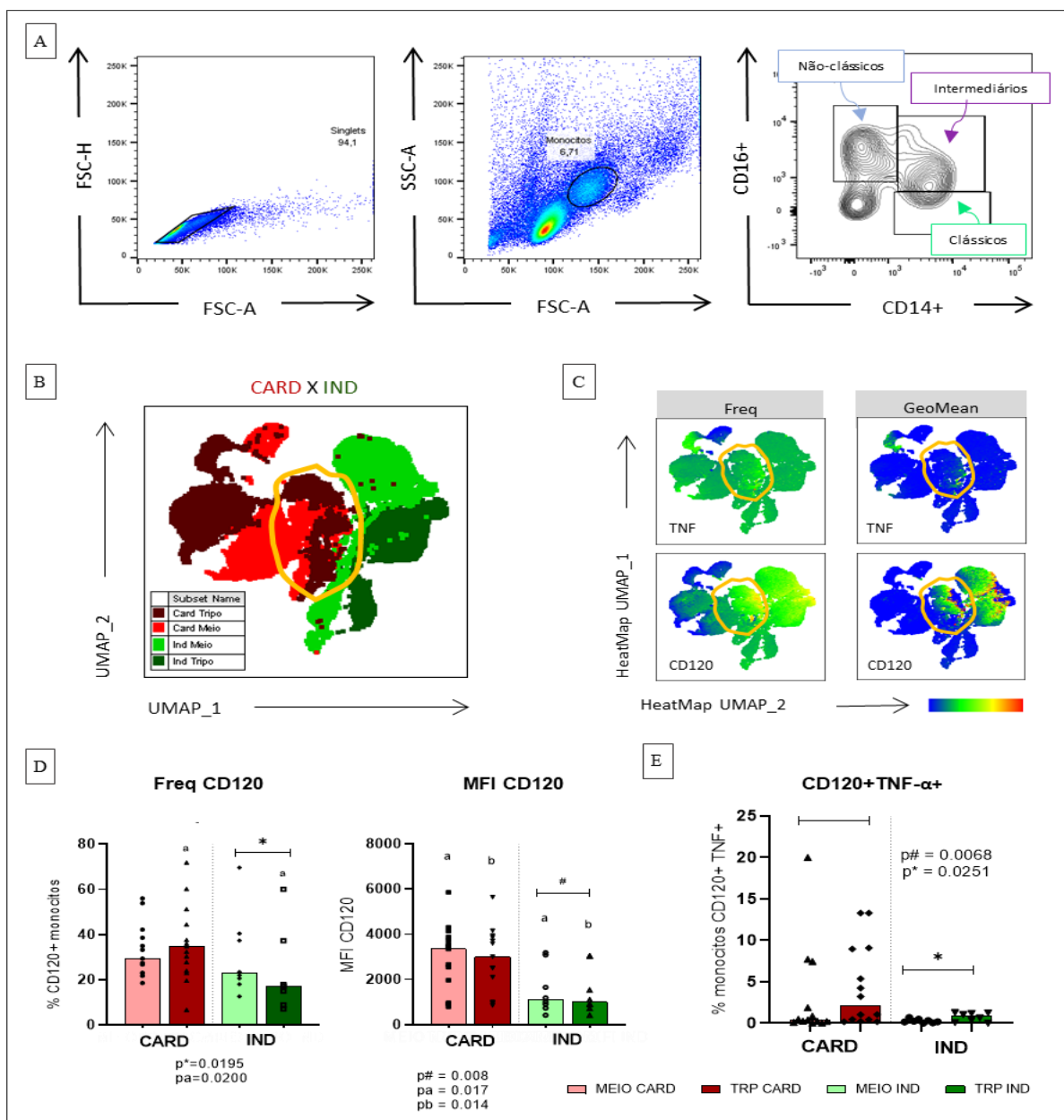
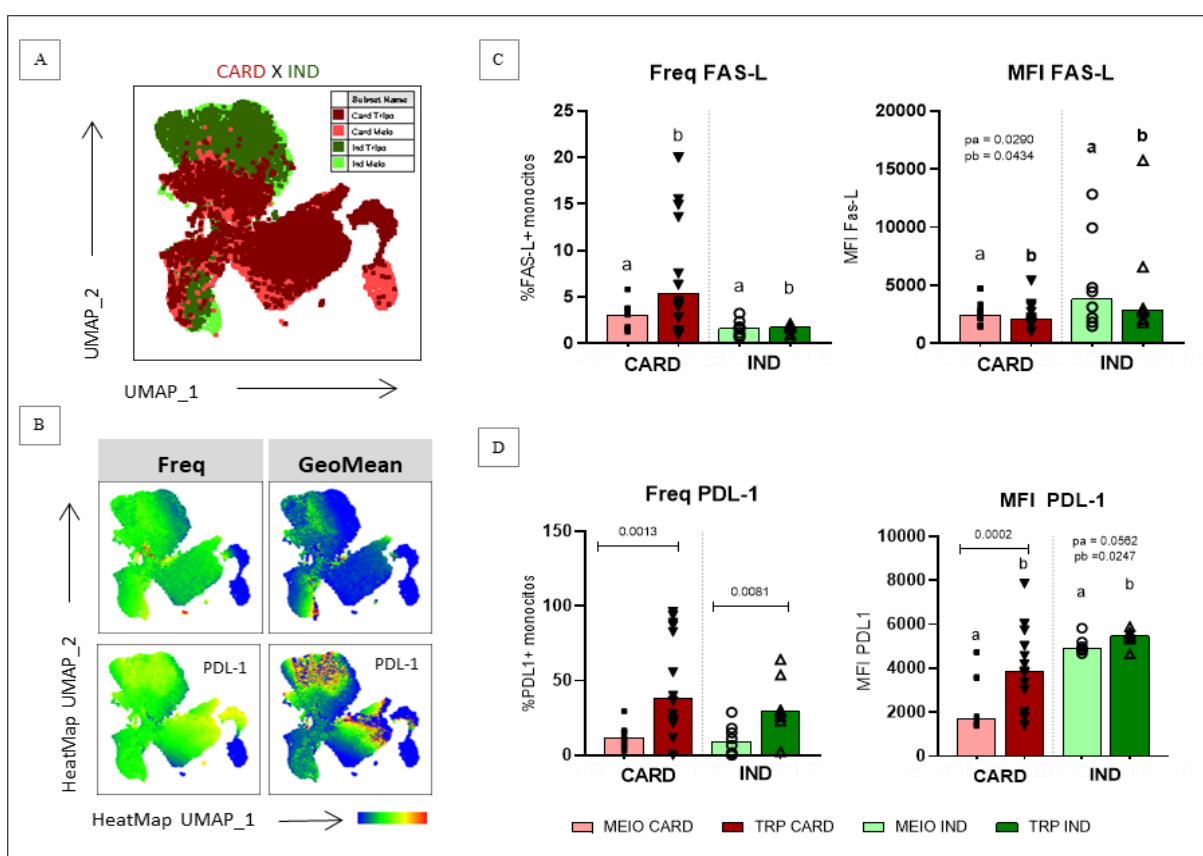


Figura 5: Frequência e distribuição de monócitos TNF- α ⁺ e CD120⁺ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. (A) Estratégia de *gate* usada para delimitar a população de monócitos totais e suas subpopulações utilizando os marcadores CD14 e CD16. **(B)** Análise não supervisionada guiada por UMAP da distribuição por similaridade de monócitos de pacientes com as formas clínicas cardíaca (CARD) e indeterminada (IND) da doença de Chagas, com ou sem estímulo. A análise UMAP foi realizada usando os marcadores CD14, HLA-DR, TNF, IL-10, Fas-L, PDL-1 e CD120. As populações definidas seguem o padrão representativo de cores atribuídas: Monócitos de pacientes CARD sem estímulo em vermelho claro, monócitos de pacientes CARD com estímulo TRP, em vermelho escuro, monócitos de pacientes IND sem estímulo em verde claro e monócitos de pacientes IND com estímulo TRP, em verde escuro. A área em amarelo chama a atenção para o local onde há a colocalização da expressão de monócitos TNF- α ⁺ e CD120⁺. **(C)** Mapa de calor da frequência de monócitos TNF- α ⁺ ou CD120⁺ projetados sobre o espaço UMAP. A área em amarelo chama a atenção para o local onde há a colocalização da expressão de monócitos TNF- α ⁺ e CD120⁺. **(D)** Avaliação da frequência (Freq) e expressão (MFI) de monócitos CD120⁺; e da **(E)** coexpressão de TNF- α e CD120 em células mononucleares de do sangue periférico de pacientes com a forma crônica da cardiopatia chagásica (CARD) ou indeterminada (IND). As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (MEIO) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos de pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. Os símbolos # e * indicam as comparações pareadas, com $p < 0,05$. As letras a e b indicam as significâncias estatísticas entre as formas clínicas sob as diferentes condições, e indicam $p < 0,05$.

No que diz respeito às moléculas regulatórias Fas-L e PDL-1, pelas análises não supervisionadas, observou-se uma alta expressão de Fas-L em áreas correspondentes a IND (**Figura 6B MIF**), e uma ampla distribuição e expressão de PDL-1 em áreas de IND TRP e CARD TRP (**Figura 6A-B**). Com os dados quantitativos, foram observadas maiores frequências de monócitos Fas-L⁺, com e sem estímulo de TRP, em monócitos de pacientes CARD quando comparado ao grupo IND (**Figura 6C**). Nesse conjunto de dados, também foi observado que o estímulo com TRP aumentou a frequência e expressão de PDL-1 em monócitos CARD, e apenas a frequência em monócitos IND (**Figura 6D**).



Uma vez que o TNF- α também pode estar implicado na via de apoptose, correlacionamos a frequência de monócitos Fas-L⁺ com monócitos TNF⁺, com ou sem estímulo TRP. Nossos dados mostram uma forte correlação positiva ($r \geq 0,06$) e estatisticamente significativa entre a frequência de monócitos expressando essas moléculas em pacientes CARD (Figura 7A) após estímulo com TRP, mas não em pacientes IND, sugerindo que o perfil inflamatório associa-se à expressão de Fas-L.

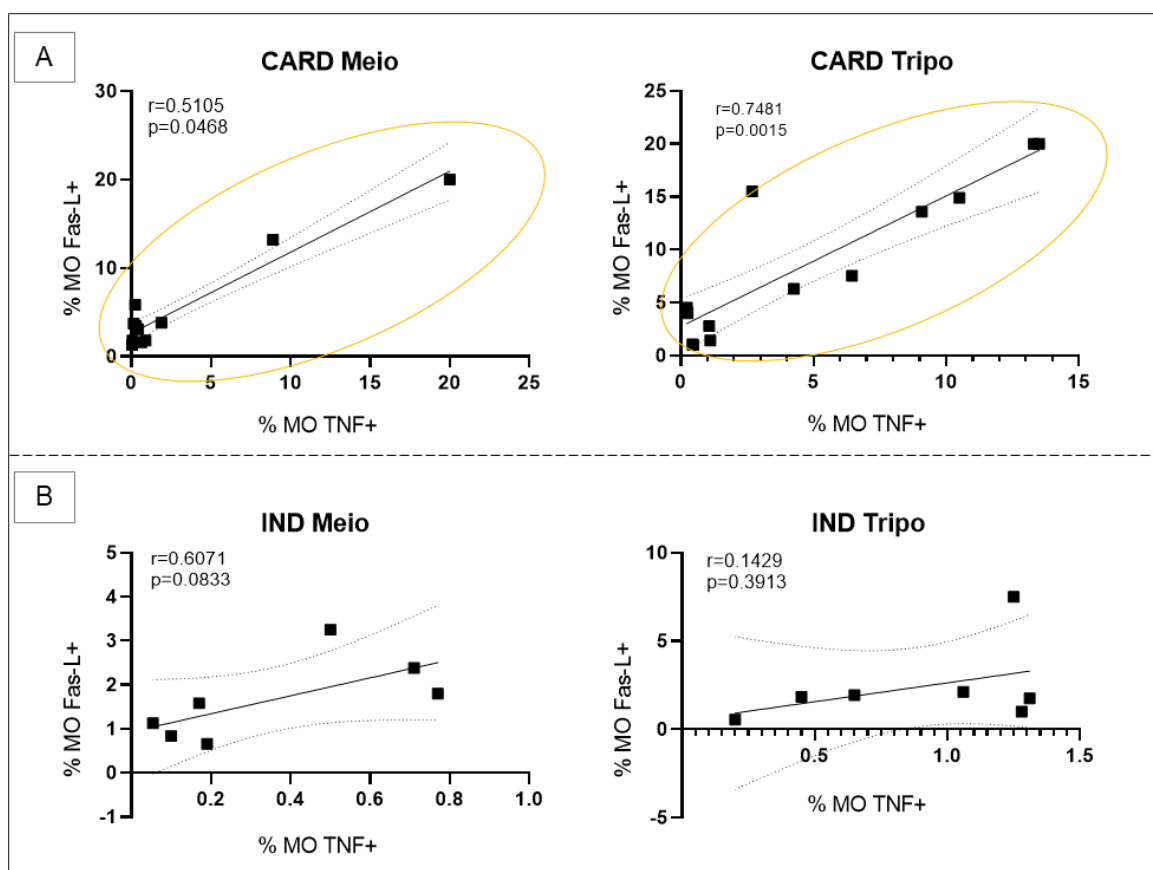


Figura 7: Correlações entre as frequências de monócitos Fas-L⁺ e monócitos inflamatórios (TNF- α ⁺), com ou sem estímulo, em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Foram considerados valores estatisticamente significativo com $p < 0,05$.

6.2 Pacientes CARD e IND têm diferenças na distribuição de subpopulações de monócitos

Pelo estudo de monócitos, é sabido que essas células, a depender o estímulo sob a qual foram submetidas, assumem diferentes perfis funcionais e adquirem diferentes fenótipos, caracterizando diferentes subpopulações. Assim, adotamos a estratégia de análise para a

caracterização das subpopulações de monócitos baseada na expressão de CD14 e CD16 (BARISIONE; GARIBALDI; GHIGLIOTTI; FABBI *et al.*, 2010), como mostra a **Figura 8A**. Sendo os monócitos clássicos CD14^{high} CD16⁻, monócitos intermediários CD14^{high} CD16⁺ e monócitos não-clássicos CD14^{low} CD16^{high}.

A fim de compreender as diferenças nas distribuições das subpopulações de monócitos, bem como como o estímulo com extrato bruto de *T. cruzi* afeta a distribuição dessas subpopulações celulares, comparamos por gráfico de dispersão de pontos, realizado em amostras concatenadas, a distribuição das subpopulações entre os grupos Meio e TRP, bem como entre as formas clínicas CARD e IND. Através dessas análises não supervisionadas, percebe-se nos gráficos de dispersão um aumento na população de monócitos intermediários tanto em CARD como IND, tratados com TRP, representado pelo deslocamento dos eventos (**Figura 8B**). Quando plotamos os subconjuntos de monócitos sobre o espaço UMAP, observamos uma sobreposição de monócitos intermediários e clássicos nas regiões correspondentes à IND, mas principalmente CARD, tratados com TRP (**Figura 8C**).

Os dados semi-quantitativos relativos às frequências dos subconjuntos, mostraram que pacientes CARD tem maiores populações de monócitos clássicos e intermediários, enquanto pacientes IND tem maiores populações de intermediários. Ademais, o estímulo TRP aumentou a população de monócitos intermediários tanto em pacientes CARD quanto em IND (**Figura 8D**).

Finalmente, pela análise quantitativa, essas diferenças entre a distribuição dos subconjuntos se mostraram estatisticamente significativas, sendo elas: maior frequência de monócitos intermediários no grupo IND Meio quando comparado ao grupo CARD Meio, havendo uma redução dessa subpopulação no grupo IND estimulado, e um aumento no grupo CARD sob a mesma condição; além disso observamos também que sem estímulo, o grupo IND tem maior frequência de monócitos não-clássicos quando comparado ao grupo CARD sob a mesma condição, mas que em ambas as formas clínicas, a frequência de monócitos não-clássicos aumentou significativamente com o estímulo TRP (**Figura 8E**).

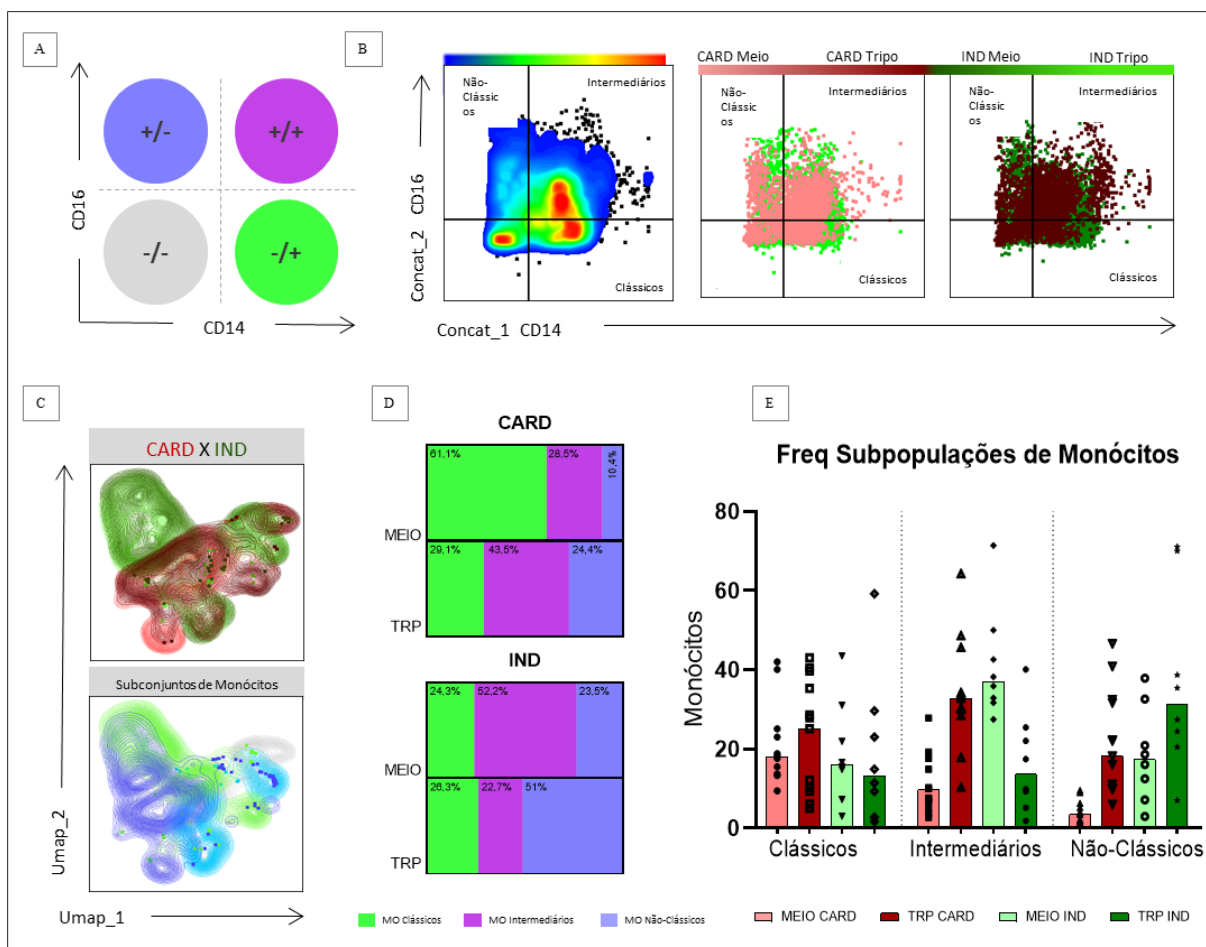


Figura 8: Frequência e distribuição das subpopulações de monócitos em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. (A) Estratégia de seleção usada para identificar subpopulações de monócitos, baseadas na expressão de CD14 e CD16: CD14⁺CD16⁻ (monócitos clássicos, em verde), CD14⁺CD16⁺ (monócitos intermediários, em roxo), CD14⁻CD16⁺ (monócitos não-clássicos, em azul); (B) Gráficos representativos de citometria de fluxo, nas amostras concatenadas (Concat), mostrando padrão de expressão CD14 e CD16 nos monócitos, e identificando os diferentes subconjuntos. Os gráficos de dispersão de pontos mostram a distribuição das subpopulações de monócitos entre pacientes com as formas cardíaca (CARD) ou indeterminada (IND), com e sem estímulo. Em vermelho: claro, monócitos CARD sem estímulo; escuro: monócitos CARD com estímulo TRP. Em verde: claro, monócitos IND sem estímulo; escuro: monócitos IND com estímulo TRP. (C) O primeiro gráfico de contorno mostra a distribuição das populações de monócitos de pacientes CARD e IND, com e sem estímulo, projetados sobre o espaço UMAP. O segundo gráfico de contorno mostra a distribuição dos subconjuntos de monócitos sobre o espaço UMAP. (D) Distribuição qualitativa das subpopulações de monócitos CARD e IND, com e sem estímulo. (E) As frequências das subpopulações de monócitos foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos de pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND. Sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP.

Como o HLA-DR é uma importante molécula de apresentação de antígenos peptídicos, e por conseguinte um indicativo de ativação celular, avaliamos a frequência e a expressão dessa molécula nas subpopulações de monócitos (Figura 9). Para as análises não supervisionadas de HLA-DR, usamos a mesma estratégia de seleção da população como

ilustrado na figura 6A. Em sequência, sobreposemos o gráfico de calor da frequência de monócitos HLA-DR⁺ sobre o gráfico dispersão pontual das subpopulações (**Figura 9A**); e no próximo gráfico, também sobreposemos os histogramas de frequência de monócitos HLA-DR⁺ das amostras concatenadas (**Figura 9B**). Essas análises revelaram que, em geral, há uma maior quantidade de monócitos intermediários HLA-DR⁺.

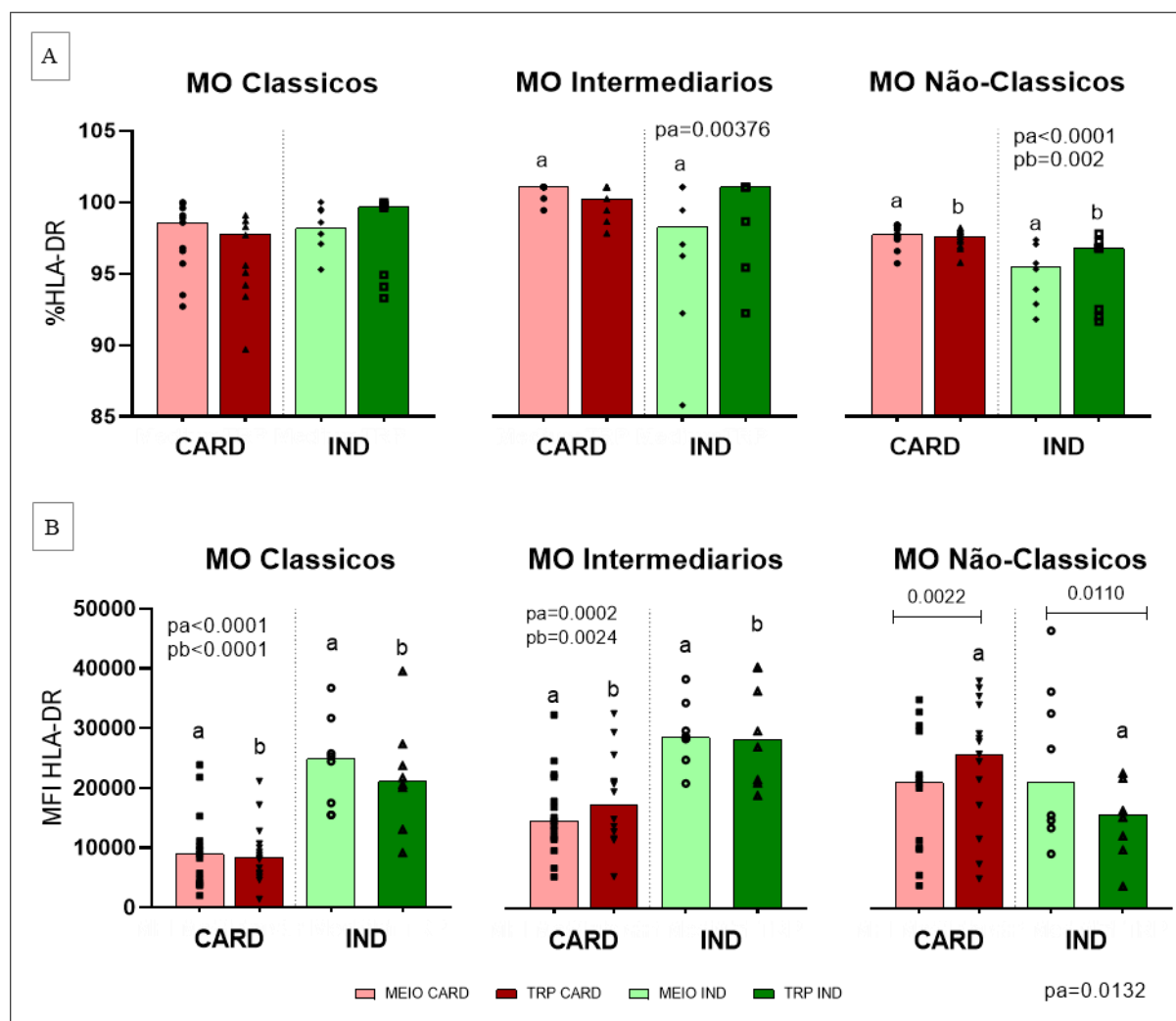


Figura 9: Frequência e distribuição de monócitos HLA-DR⁺ em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. (A) Gráficos quantitativos com a frequência e (B) expressão (MFI) de HLA-DR nos subconjuntos de monócitos do sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca (CARD) ou forma indeterminada (IND). As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos de pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND. Sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. As barras cinzas representam as médias \pm o desvio padrão.

Já com as análises supervisionadas, tem-se que todas as subpopulações apresentaram as mesmas frequências, exceto as populações de monócitos intermediários HLA-DR⁺ que foram maiores em CARD Meio quando comparado a IND Meio; monócitos não-clássicos que

apresentaram menores frequências sem estímulo e com estímulo de TRP, no grupo IND quando comparado ao grupo CARD sob as mesmas condições (**Figura 9C**).

No entanto, no que diz respeito à MFI, que indica a indução da expressão da molécula e, portanto, sua ativação, observou-se que as subpopulações de monócitos clássicos e intermediários de pacientes IND, com e sem estímulo, estavam mais ativadas do que de pacientes CARD. O estímulo com TRP aumentou a expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos não-clássicos, em pacientes CARD em comparação ao grupo IND estimulado. Em contrapartida, em pacientes IND, o estímulo com TRP diminuiu a ativação de monócitos não-clássicos, se comparado ao grupo IND Meio (**Figura 9D**).

6.3 As moléculas CD1c e CD1d são as moléculas da família CD1 mais expressas nas subpopulações de monócitos de pacientes CARD e IND

Pouco se sabe sobre a distribuição e frequência das moléculas da família CD1 em monócitos nas diferentes formas clínicas da DC. Dentro desse contexto, propusemo-nos a fazer a caracterização fenotípica, usando os marcadores de superfície CD1a, CD1b, CD1c e CD1d, dentro das subpopulações de monócitos dos grupos CARD e IND (**Figura 10**).

Para análises não supervisionadas das moléculas da família CD1, usando a mesma estratégia de agrupamento mostrada na figura 6A, plotamos a frequência das diferentes isoformas de CD1 em monócitos sobre o gráfico de dispersão pontual. Com essas análises percebeu-se uma diferença na distribuição nas subpopulações de monócitos, sendo que, em geral, observou-se que monócitos CD1a⁺ e CD1b⁺ são os menos frequentes, e monócitos CD1c⁺ e CD1d⁺ são os mais frequentes em todos os subconjuntos (**Figura 10A**). Ainda com os recursos de análises não supervisionadas, extraiu-se populações de diferentes perfis com base nos parâmetros dos marcadores CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, HLA-DR e CD14, utilizando a ferramenta automática X-Shift, do FlowJo. Com base nesta separação, podemos co-localizar populações com diferentes perfis de expressão, com as áreas que correspondem às macropopulações representativas das formas clínicas CARD e IND, com e sem estímulo (**Figura 10B**). Finalmente, com o recurso ClusterExplorer, podemos mais uma vez identificar essas populações e observar com um mapa de calor a expressão dos marcadores, nas populações selecionadas pelo X-Shift (**Figura 10C**).

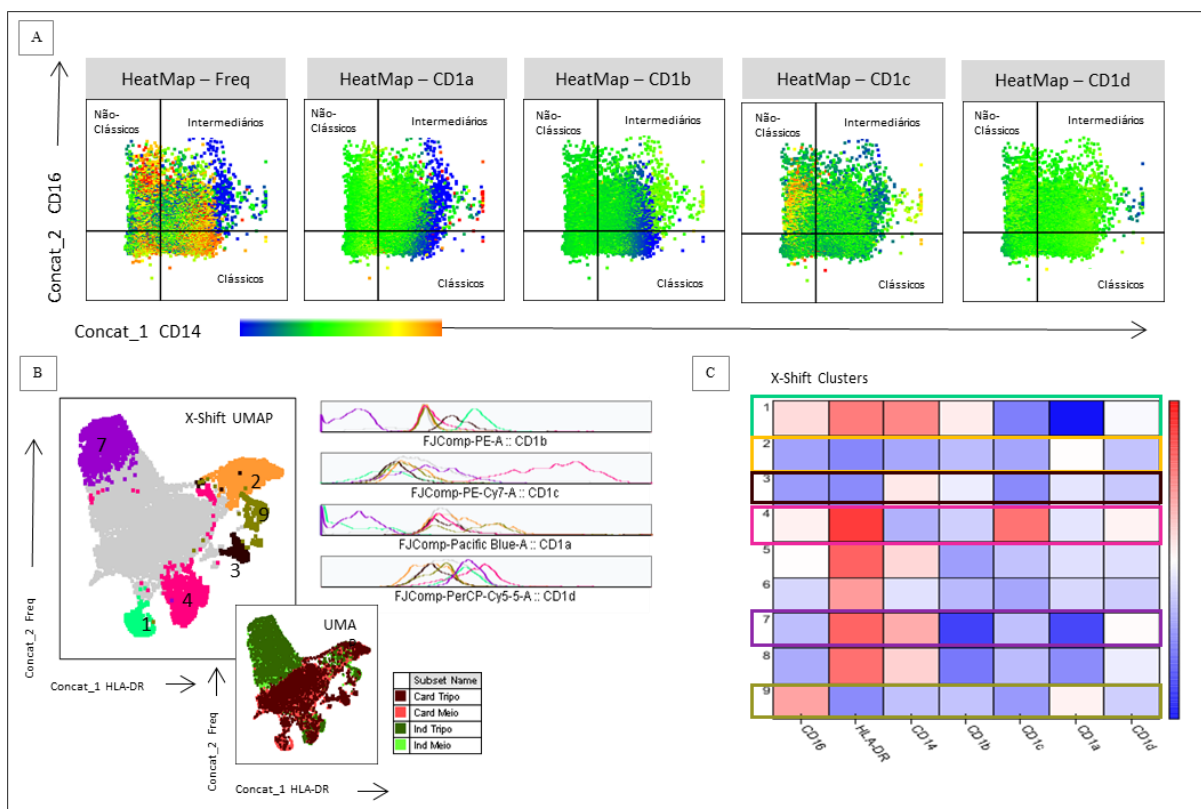


Figura 10: Distribuição de monócitos expressando diferentes moléculas CD1 nas subpopulações de monócitos. (A) Mapa de calor (*Heatmap*) com a distribuição de monócitos expressando moléculas da família CD1 nos diferentes subconjuntos de monócitos. **(B)** Distribuição das populações de monócitos com alta similaridade, sobre o espaço UMAP. O agrupamento nestas populações também foi realizado utilizando análises não-supervisionadas com a ferramenta X-Shift, disponível no FlowJo. O painel de UMAP no canto à direita para observação de em qual forma clínica a população destacada se co-localiza. O gráfico de histogramas mostra as respectivas expressões de CD1a, CD1b, CD1c e CD1d, das populações destacadas. **(C)** *Heatmap* com a discriminação das moléculas CD1a, CD1b, CD1c e CD1d, e CD14 e HLA-DR expressas nas respectivas populações com enumeração: 1, verde-água; 2, amarelo; 3, magenta; 4, rosa; 7, roxo e 9, ocre.

As análises quantitativas confirmaram os diferentes perfis de expressão e de frequência das moléculas da família CD1 dentro das subpopulações de monócitos (**Figuras 11, 12 e 13**).

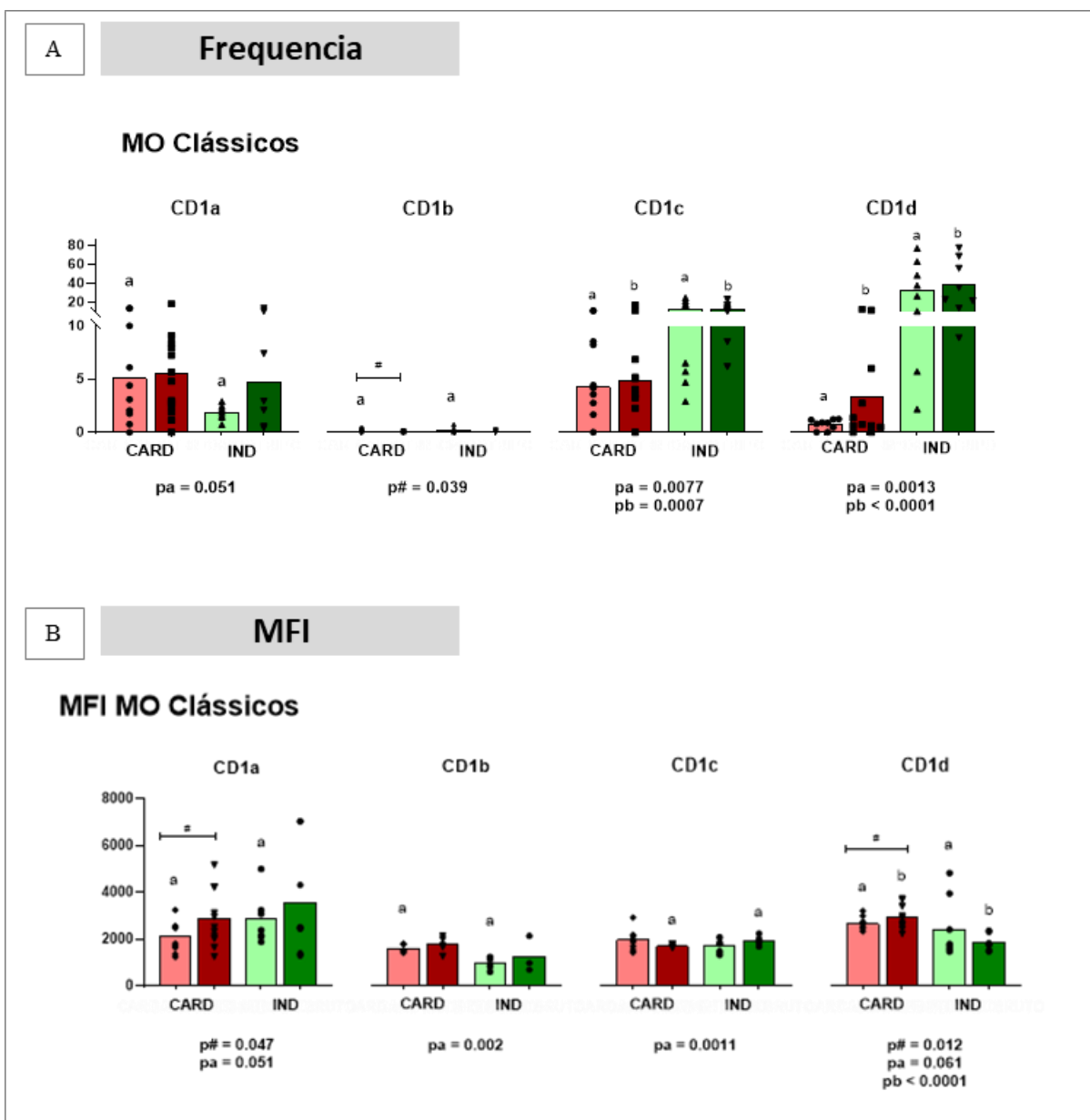


Figura 11: (A) Avaliação da frequência e (B) expressão (MFI) das diferentes isoformas de CD1 nas subpopulações de monócitos clássicos, do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. Os símbolos # e * indicam as comparações pareadas, com $p < 0,05$. As letras *a* e *b* indicam as significâncias estatísticas entre as formas clínicas sob as diferentes condições, e indicam $p < 0,05$.

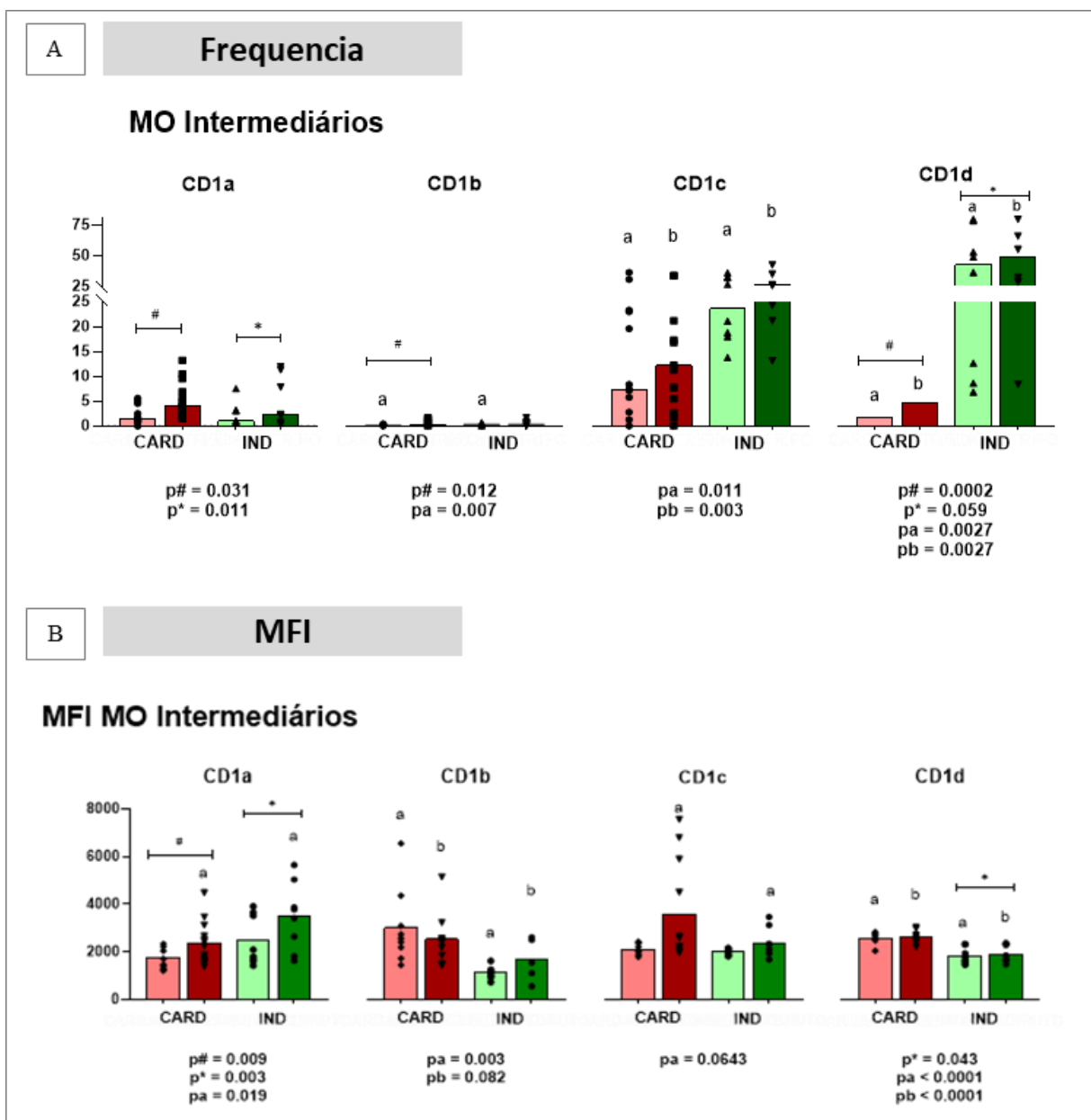


Figura 12: (A) Avaliação da frequência e (B) expressão (MFI) das diferentes isoformas de CD1 nas subpopulações de monócitos intermediários, do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. Os símbolos # e * indicam as comparações pareadas, com $p < 0,05$. As letras *a* e *b* indicam as significâncias estatísticas entre as formas clínicas sob as diferentes condições, e indicam $p < 0,05$.

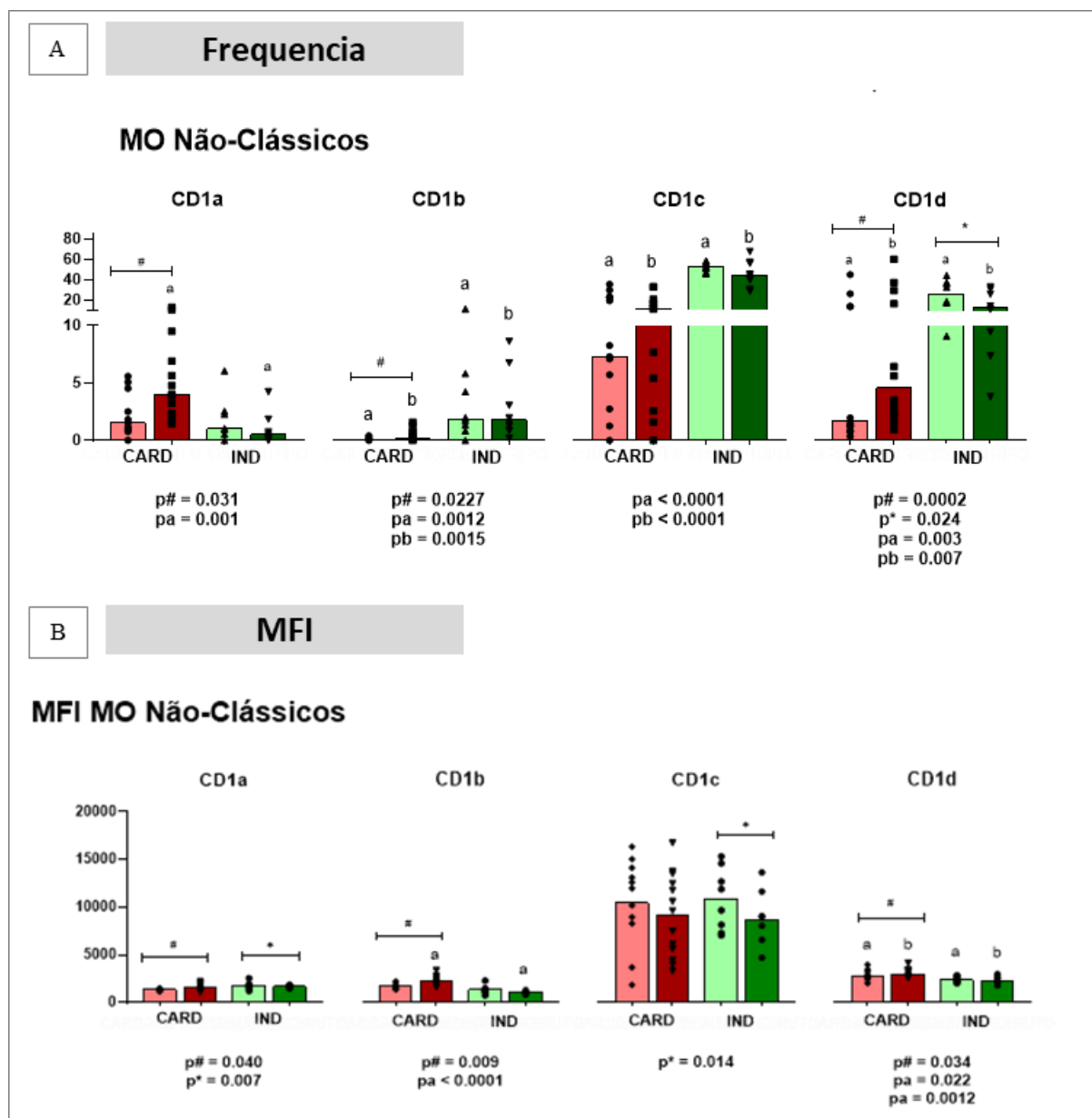


Figura 13: (A) Avaliação da frequência e (B) expressão (MFI) das diferentes isoformas de CD1 nas subpopulações de monócitos não-clássicos, do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. As frequências foram avaliadas em monócitos sem estímulo (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. Os símbolos # e * indicam as comparações pareadas, com $p < 0,05$. As letras *a* e *b* indicam as significâncias estatísticas entre as formas clínicas sob as diferentes condições, e indicam $p < 0,05$.

CD1a: O estímulo de TRP aumentou a frequência CD1a em monócitos intermediários e não-clássicos (Figura 12 e 13, respectivamente), em monócitos CARD, e aumentou a expressão dessa molécula em todas as subpopulações de monócitos, em pacientes CARD (Figuras 11,

12 e 13); e nas subpopulações de monócitos intermediários e não-clássicos, em pacientes IND (Figuras 11 e 12, respectivamente).

CD1b: a frequência de monócitos CD1b⁺ aumentou em todas as subpopulações, em pacientes CARD (Figuras 11, 12 e 13).

CD1c: pacientes IND tem maiores frequências de monócitos CD1c⁺ em todas as subpopulações de monócitos, com ou sem estímulo de TRP (Figuras 11, 12 e 13).

CD1d: pacientes IND tem maiores frequências de monócitos CD1d⁺ em todas as subpopulações de monócitos, com ou sem estímulo de TRP (Figuras 11, 12 e 13).

Em relação à expressão, em monócitos clássicos, e não-clássicos o estímulo com TRP aumentou a expressão de CD1d⁺, em CARD (Figuras 11 e 13). Relacionando esses dados com a descrição funcional encontrada na literatura, podemos sugestivamente correlacionar o estímulo TRP a um aumento da patrulha e fagocitose em pacientes CARD.

Interessante, o estímulo TRP aumenta a frequência de CD1d⁺ em monócitos não-clássicos (patrulhadores), em pacientes CARD e diminui em pacientes IND. Visto que, teoricamente, monócitos CD1d⁺ estão relacionados à ativação de células iNKT, altamente inflamatórias e de rápida expansão, tal evento poderia contribuir com o aumento da inflamação. De fato, apesar da menor frequência de monócitos CD1d⁺ em todas as subpopulações de monócitos, essas células só estão positivamente associadas às células T DN inflamatórias em pacientes CARD (Figura 14). O que pode indicar uma associação desses monócitos com ativação de células T DN TNF⁺ inflamatórias.

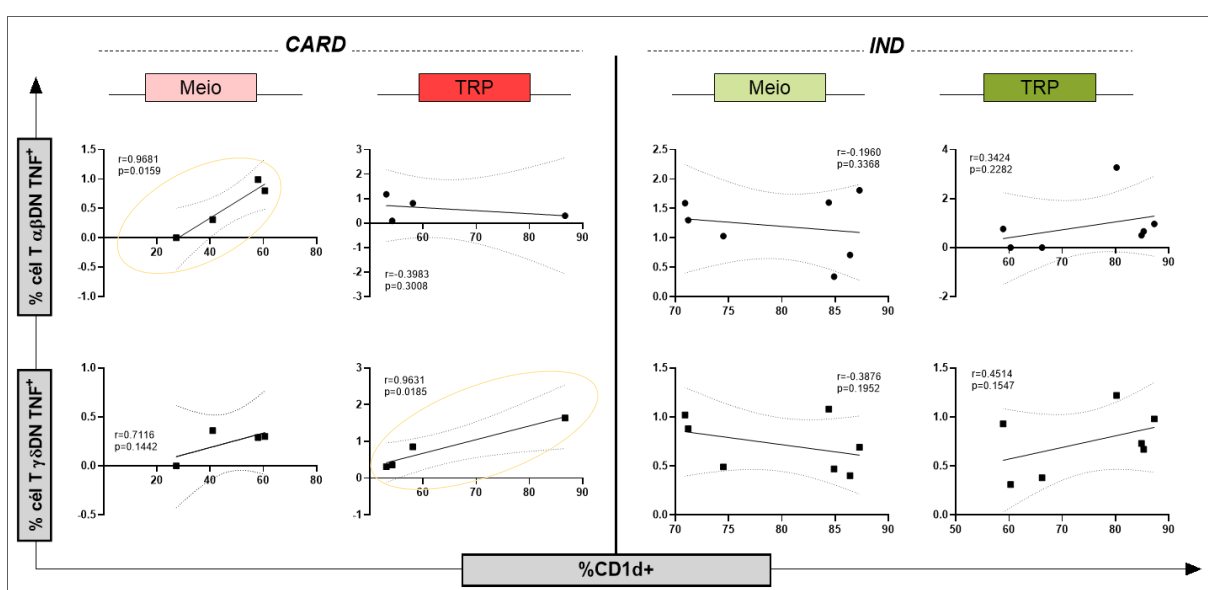


Figura 14: Correlações entre monócitos CD1d⁺, com ou sem estímulo, e células T αβTCR⁺ e γδTCR⁺, de pacientes com as formas clínicas cardíaca (CARD) ou indeterminada (IND) da doença de Chagas.

6.4 Caracterização funcional de monócitos CD1d⁺

6.4.1 O estímulo com TRP aumenta a frequência de monócitos CD1d⁺ que expressam moléculas modulatórias e também inflamatórias, em pacientes CARD

Dados de estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa indicaram uma correlação positiva entre a expressão da molécula de CD1d e resposta pró-inflamatória de linfócitos T DN $\gamma\delta$ TCR estimuladas *ex vivo*, e também a uma pior função cardíaca em pacientes CARD, apontando uma possível atuação dessas células no desenvolvimento de formas sintomáticas da DC (PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016).

Além disso, Passos *et al* (2016) ao realizar *in vitro* o bloqueio da molécula CD1d em monócitos de pacientes cardiopatas, verificou uma redução no estado de ativação, e por consequência, no perfil pró-inflamatório de linfócitos TDN $\gamma\delta$ TCR (PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016), o que reforçou ainda mais a hipótese de que esses linfócitos exerciam um papel importante na progressão da DC.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, propusemo-nos então a caracterizar funcionalmente monócitos CD1d⁺, a fim de compreender mais a fundo sua relação com a ativação de diferentes populações de linfócitos T duplo negativos.

Para tanto, inicialmente comparamos a frequência (freq) e a expressão (MFI) da isoforma CD1d em monócitos totais de pacientes CARD e IND, com ou sem estímulo TRP. Interessantemente, sem estímulo, temos que pacientes IND apresentaram uma maior frequência de monócitos CD1d⁺. Já a média de intensidade de fluorescência da molécula indicou que o estímulo de TRP aumentou a expressão da molécula apenas no grupo CARD, e exibiu uma tendência de maior expressão nesse grupo com ou sem estímulo, quando comparado ao grupo IND (**Figura 15A**).

Ao avaliarmos a expressão de HLA-DR, outra importante molécula de apresentação de antígenos, temos que com ou sem estímulo, a média de intensidade de fluorescência da molécula é maior no grupo IND, quando comparado ao grupo CARD. Os dados indicaram ainda que o estímulo com TRP diminuiu significativamente a expressão da molécula no grupo IND (**Figura 15B**).

Em seguida, passamos para a caracterização funcional dos monócitos CD1d⁺, usando os marcadores de superfície PDL-1, Fas-L, e das citocinas TNF- α e IL-10. Entre as formas clínicas CARD e IND sem estímulo, não houve diferença entre as frequências de monócitos CD1d⁺PDL-1⁺. O estímulo com TRP aumentou a frequência PDL-1 em monócitos CARD e

em IND, no entanto, esse aumento é significativamente maior em CARD TRP se comparado a IND TRP (**Figura 15C**).

Sem estímulo, o grupo CARD tem uma maior frequência de monócitos CD1d⁺Fas-L⁺ quando comparado ao IND Meio (**Figura 15C**). Observou-se ainda uma forte correlação positiva entre esses monócitos e as células T DN $\alpha\beta$ TCR inflamatórias (**Figura 16**).

Além disso, o estímulo com extrato bruto de *T.cruzi* aumentou a frequência de monócitos CD1d⁺IL-10⁺ em CARD, e diminuiu essa população em IND, mas ainda sim, essa população sem estímulo é significativamente maior no grupo IND quando comparado ao grupo CARD (**Figura 15C**).

Esses achados, podem ajudar a reforçar a hipótese que pacientes com C.C.C apresentam uma disfunção proliferativa de células T, devido à diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias, privação de citocinas estimulatórias, indução de apoptose e /ou aumento na expressão de receptores inibitórios como PD-1 (ARGÜELLO; ALBAREDA; ALVAREZ; BERTOCCHI *et al.*, 2012; CHAVES; DE ASSIS SILVA GOMES ESTANISLAU; FIUZA; CARVALHO *et al.*, 2016; DIAS; MEDINA; MENDES-JUNIOR; DANTAS *et al.*, 2013; GIRALDO; BOLAÑOS; CUELLAR; ROA *et al.*, 2013).

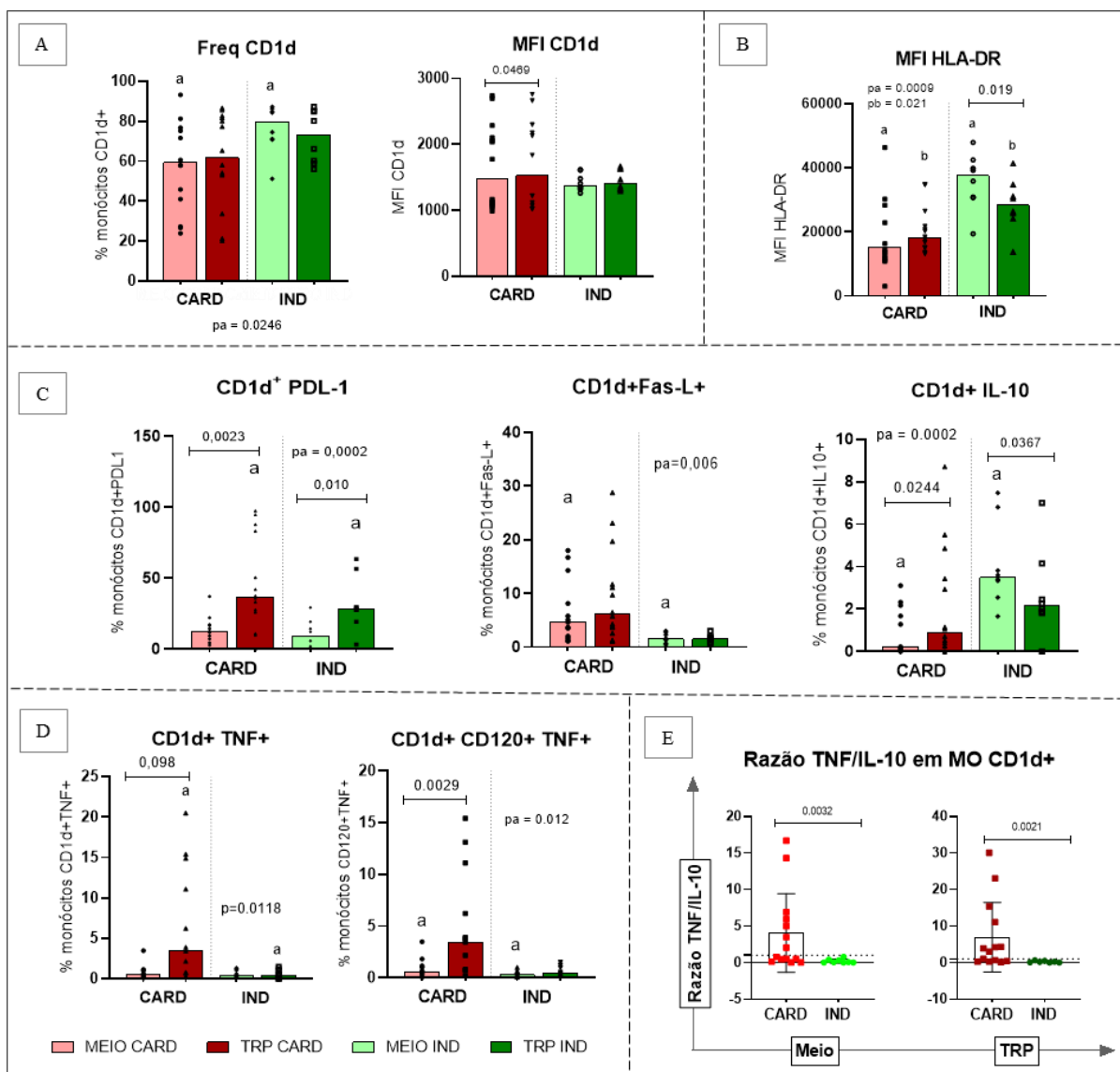


Figura 15: Avaliação da frequência (freq) e/ou expressão (MFI) de: (A) monócitos CD1d⁺; (B) monócitos HLA-DR⁺CD1d⁺ (C) moléculas regulatórias (PDL-1, Fas-L e IL10) CD1d⁺; (D) monócitos TNF- α ⁺CD1d⁺ ou TFN- α ⁺CD120⁺CD1d⁺, do sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca (CARD) ou forma indeterminada (IND). As frequências foram avaliadas em monócitos *sem estímulo* (Meio) ou estimulados com extrato bruto de *T. cruzi* (TRP). As barras vermelhas representam os monócitos pacientes CARD, e as barras verdes os monócitos de pacientes IND, sendo os tons mais claro de cada cor células não estimuladas, e tons escuros estimuladas com TRP. (E) Razão entre monócitos TNF- α ⁺CD1d⁺/ IL-10⁺CD1d⁺.

A fim de investigar como as células T DN inflamatórias (TNF- α ⁺) se correlacionavam com os monócitos CD1d⁺, fizemos as correções entre essas populações celulares de pacientes CARD e IND, com e sem estímulo. Nas figuras 17 e 18 estão representadas as correlações estatisticamente significativas. De forma interessante, células T DN $\alpha\beta$ TCR inflamatórias estão negativamente associadas com monócitos CD1d⁺PDL-1⁺, no grupo IND; e positivamente associadas com monócitos CD1d⁺PDL-1⁺ estimulados com TRP; e monócitos CD1d⁺IL-10⁺, sem estímulo (**Figura 17**).

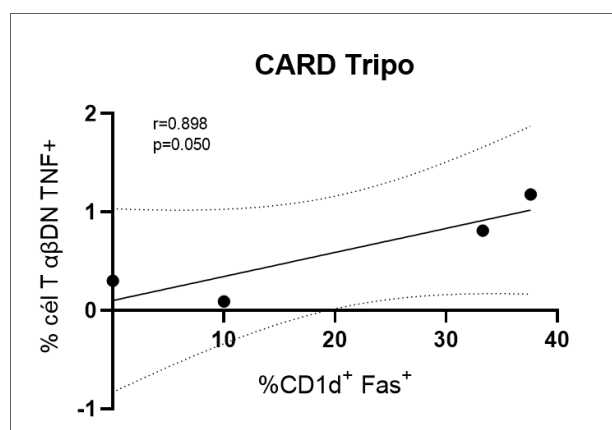


Figura 16: Correlação entre monócitos CD1d⁺ Fas-L⁺ e células T DN αβTCR TNF⁺ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

A análise da citocina inflamatória TNF-α e seu receptor (CD120) em monócitos CD1d⁺, indicou que monócitos de pacientes CARD, estimulados com TRP, tem uma maior frequência de monócitos CD1d⁺TNF⁺ comparado ao grupo IND TRP, bem como um maior número de CD1d⁺TNF-α⁺CD120⁺, sem estímulo. A frequência de monócitos CD1d⁺TNF-α⁺CD120⁺ é significativamente aumentada com o estímulo de TRP em CARD (**Figura 15D**).

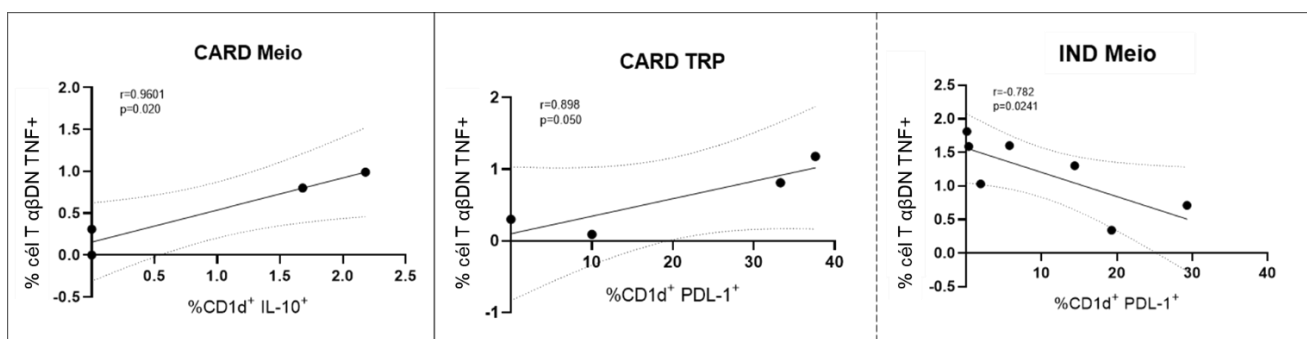


Figura 17: Correlação entre monócitos CD1d⁺ regulatórios e células T DN TNF-α⁺ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Curiosamente, maiores frequência de monócitos CD1d⁺TNF-α⁺CD120⁺, estimulados com TRP, apresentaram associações positivas com células T DN inflamatórias, apenas no grupo IND (**Figura 18**). Associando esse dado à informação que em pacientes IND também houve um aumento de monócitos intermediários CD1d⁺, potencialmente mais inflamatórios, podemos inferir de fato, a capacidade do antígeno de induzir respostas inflamatórias. Se pudermos extrapolar um pouco mais na interpretação, observando que em pacientes IND os monócitos CD1d⁺TNF-α⁺CD120⁺ se associam positivamente à células T DN apenas sob estímulo, poderíamos sugerir que o antígeno de TRP incitou uma quebra no perfil regulatório

desses pacientes, provocando a ativação de células apresentadoras inflamatórias ($CD14^+CD16^+CD1d^+$) e efectoras inflamatórias (T DN $\alpha\beta TCR TNF^+$), que poderiam potencialmente ajudar no controle da infecção.

Outra correlação interessante é, que sem estímulo, que os monócitos $CD1d^+TNF^+$ do grupo CARD estavam negativamente correlacionados à população de células T $\gamma\delta TCR TNF^+$ (Figura 18).

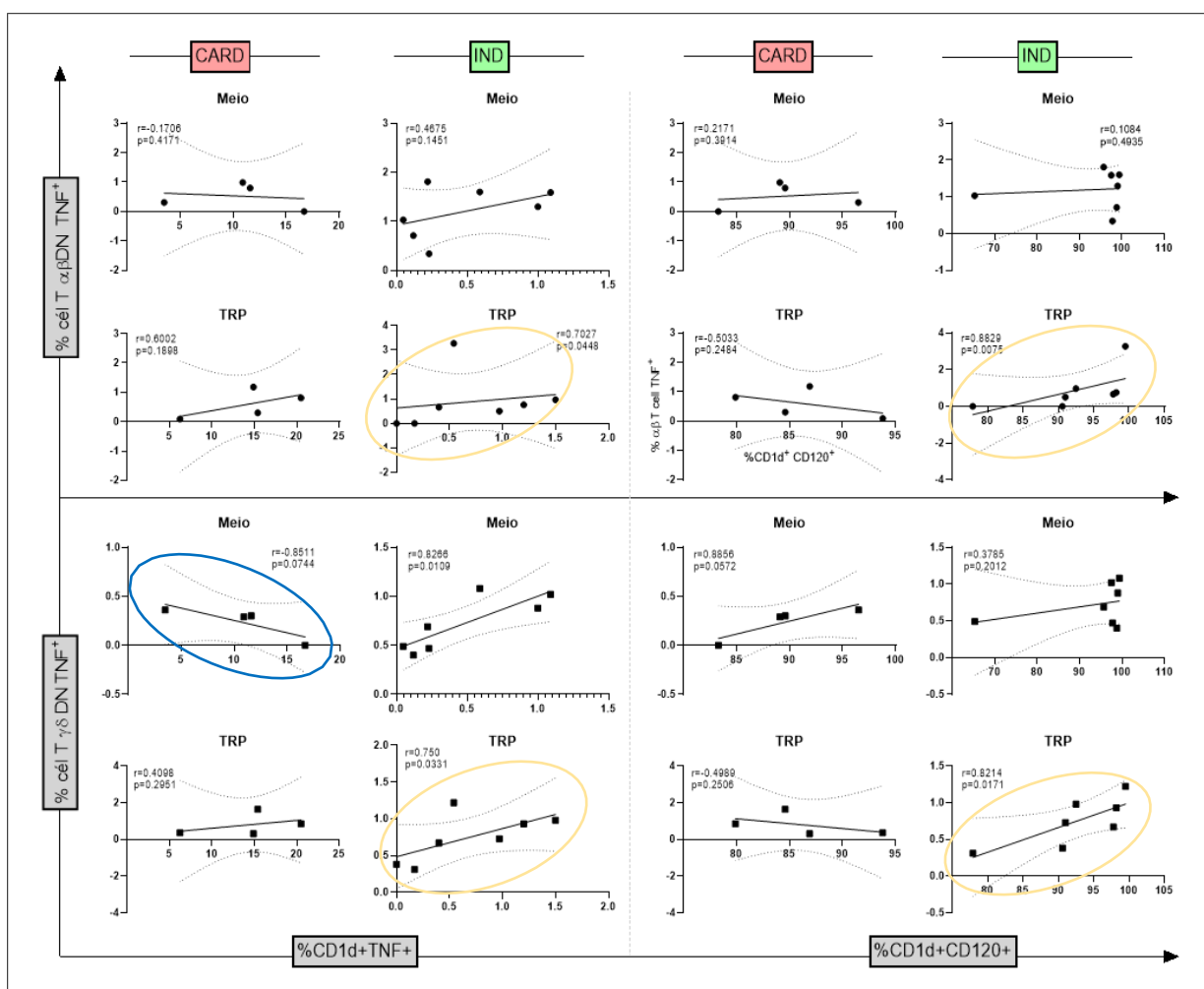


Figura 18: Correlação entre monócitos $CD1d^+ TNF-\alpha^+$ ou $CD1d^+ TNF-\alpha^+CD120^+$ e células T DN $\alpha\beta TCR TNF-\alpha^+$ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Finalmente, para descobrir qual o balanço final na produção de citocinas, e entender perfil funcional da população de monócitos $CD1d^+$, fizemos a razão entre as citocinas $TNF\alpha/IL-10$. Com isso pode-se observar que os monócitos $CD1d^+$, estimulados ou não,

exibiram característica funcional inflamatória, quando comparados aos monócitos IND (**Figura 15E**).

Dentro de tudo que viemos observando neste trabalho, isso pode ser particularmente problemático no contexto da DC, visto que potencialmente o *T. cruzi* estimularia mais essa população de monócitos, e que por sua vez, monócitos CD1d⁺ estavam associados à maiores frequências de células T DN, contribuindo, potencialmente, para uma maior inflamação.

6.5 Estímulo com fração rica em lipídios derivados de *T. cruzi* aumenta a frequência de monócitos inflamatórios (TNF- α +) em pacientes com C.C.C.

A fim de testar qual o componente do extrato bruto de *T. cruzi* (TRP) mais estimularia os monócitos, analisamos os dados em que PBMC de pacientes com a doença de Chagas foram estimulados com frações ricas em carboidratos (CHO), lipídios (LIP) e proteínas (PRO) derivadas de *T. cruzi* (PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016), focando nas características fenotípicas e funcionais dos monócitos. Comparamos a frequência de monócitos TNF- α ⁺, CD69⁺ e CD69⁺TNF- α ⁺ de sangue periféricos de pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND), cardíaca (CARD), e de indivíduos saudáveis (CTRL) expostos às diferentes frações do extrato bruto de *T. cruzi* (**Fig 19**). Observou-se que o estímulo com a fração lipídica (LIP) aumentou a frequência de monócitos inflamatórios TNF- α ⁺ e CD69⁺TNF- α ⁺ no grupo CARD (**Fig 19A e Fig 19C**) quando comparado com o grupo CTRL. O estímulo com a fração PRO, também aumentou significamente a frequência de monócitos CD69⁺ e CD69⁺TNF- α ⁺ no grupo CARD, quando comparado com o grupo CTRL (**Fig 19B e C**).

Já no grupo IND, apenas monócitos CD69⁺TNF- α ⁺ tiveram sua frequência aumentada com o estímulo da fração CHO, quando comparado ao grupo CTRL (**Fig 19C**). Porém aumento semelhante foi observado em culturas não estimuladas (**Fig 19C**). Esse conjunto de dados nos leva a inferir que antígenos com porções lipídicas tem maior ação em monócitos do grupo CARD comparado ao CTRL, induzindo uma maior ativação e polarização dos monócitos para um perfil inflamatório.

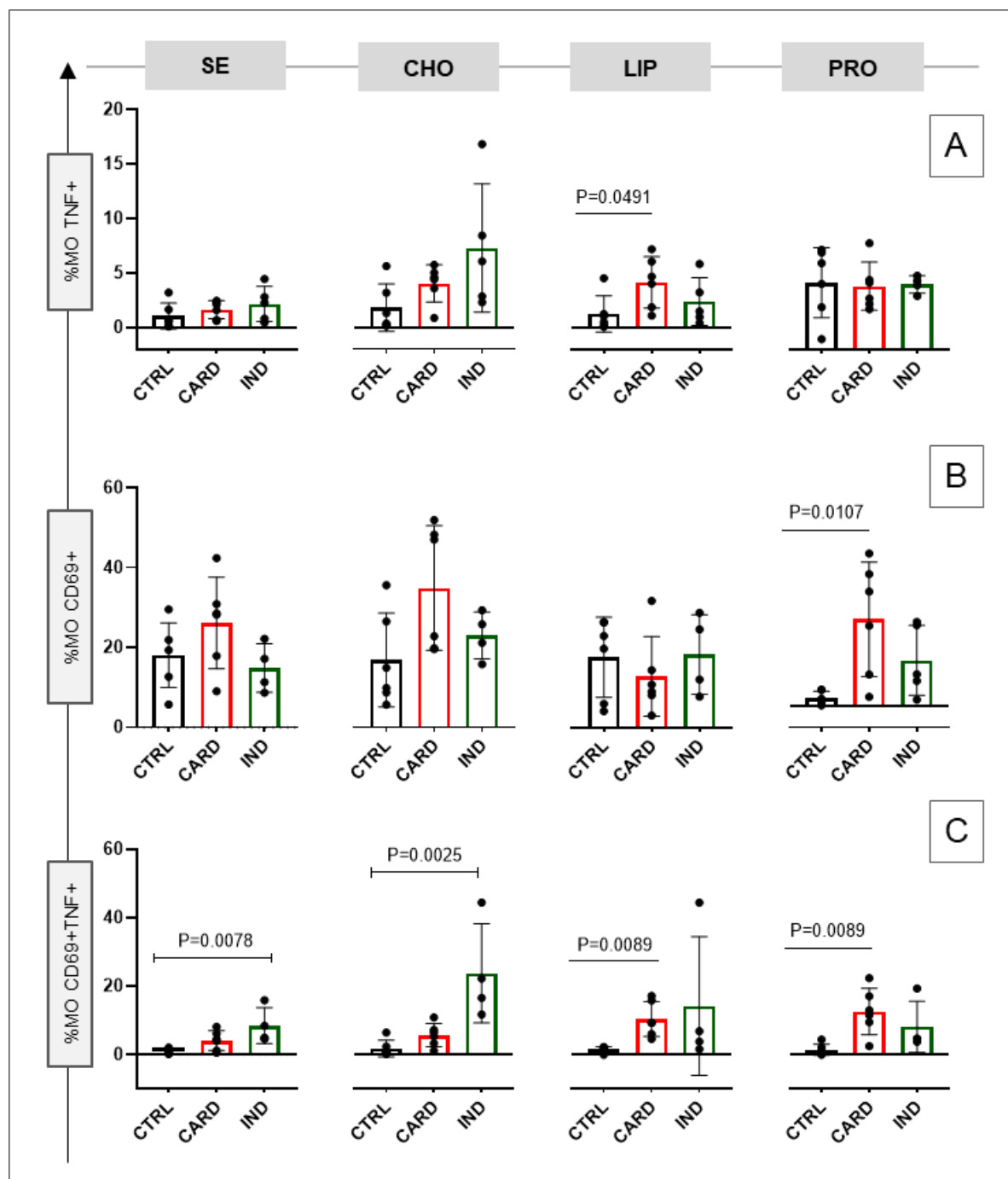


Figura 19: Comparações entre a frequência de monócitos TNF- α^+ (A), CD69⁺ (B), e CD69⁺TNF- α^+ (C) de indivíduos saudáveis e de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações antigênicas obtidas de tripomastigotas do *T. cruzi*. As barras cinzas representam as culturas de monócitos de indivíduos saudáveis (CTRL), as barras vermelhas representam as culturas de monócitos de pacientes com a forma cardíaca (CARD) e as barras verdes representam monócitos de pacientes com a forma clínica indeterminada (IND). Estímulos: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP).

6.6 Monócitos de pacientes do grupo CARD são mais responsivos aos estímulos com frações derivadas de *T. cruzi* quando comparados ao grupo IND

Curiosamente, quando comparamos as frequências da expressão de marcadores de ativação ($CD69^+$) e inflamação ($TNF-\alpha^+$ e $CD69^+TNF-\alpha^+$) em monócitos de pacientes CARD, IND ou indivíduos saudáveis (CTRL) estimulados com as diferentes frações, observamos que a fração enriquecida por proteínas (PRO) aumentou significativamente a frequência de monócitos inflamatórios $TNF-\alpha^+$ (**Fig 20A**) e $CD69^+TNF-\alpha^+$ (**Fig 20C**) no grupo CARD, quando comparados aos monócitos sem estímulos (SE). Além disso, ainda no grupo CARD, observamos que a fração rica em carboidratos (CHO) aumenta a frequência de monócitos $CD69^+$ quando comparada à fração rica em lipídios (LIP) (**Fig 20B**). Não foram observadas diferenças significativas comparando-se os diferentes estímulos nos grupos IND e CTRL.

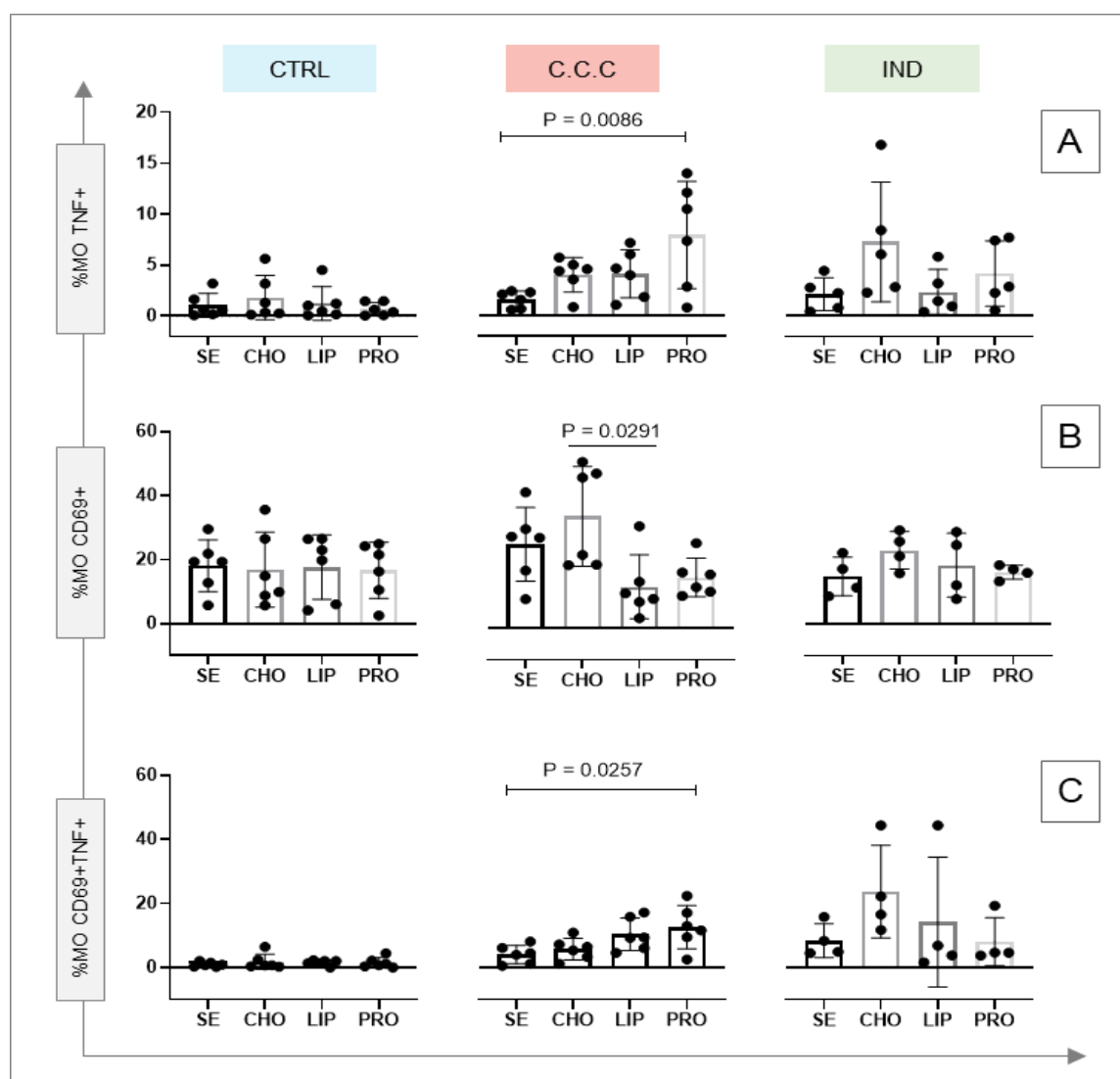


Figura 20: Comparações entre a frequência de monócitos $TNF-\alpha^+$ (A), $CD69^+$ (B), ou $CD69^+TNF-\alpha^+$ (C) expostas a diferentes frações antigênicas obtidas de tripomastigotas do *T. cruzi* em indivíduos saudáveis e de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Estímulos usados: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP).

6.7 Monócitos CD69⁺ de pacientes IND correlacionam-se negativamente com células T DN $\alpha\beta$ TCR regulatórias (IL-10⁺) quando estimulados por fração rica em carboidratos,

Ao correlacionar os monócitos CD69⁺, estimulados com CHO, com células T DN $\alpha\beta$ TCR IL-10⁺ de pacientes IND, observamos uma forte correlação negativa com esses linfócitos regulatórios (**Fig 21**). Por outro lado, há uma forte correlação positiva entre monócitos CD69⁺ de pacientes IND com células T DN $\gamma\delta$ TCR IL-10⁺ estimulados com PRO. Em pacientes CARD não foram observadas quaisquer correlações estatisticamente significativas entre monócitos estimulados e as populações de células T DN.

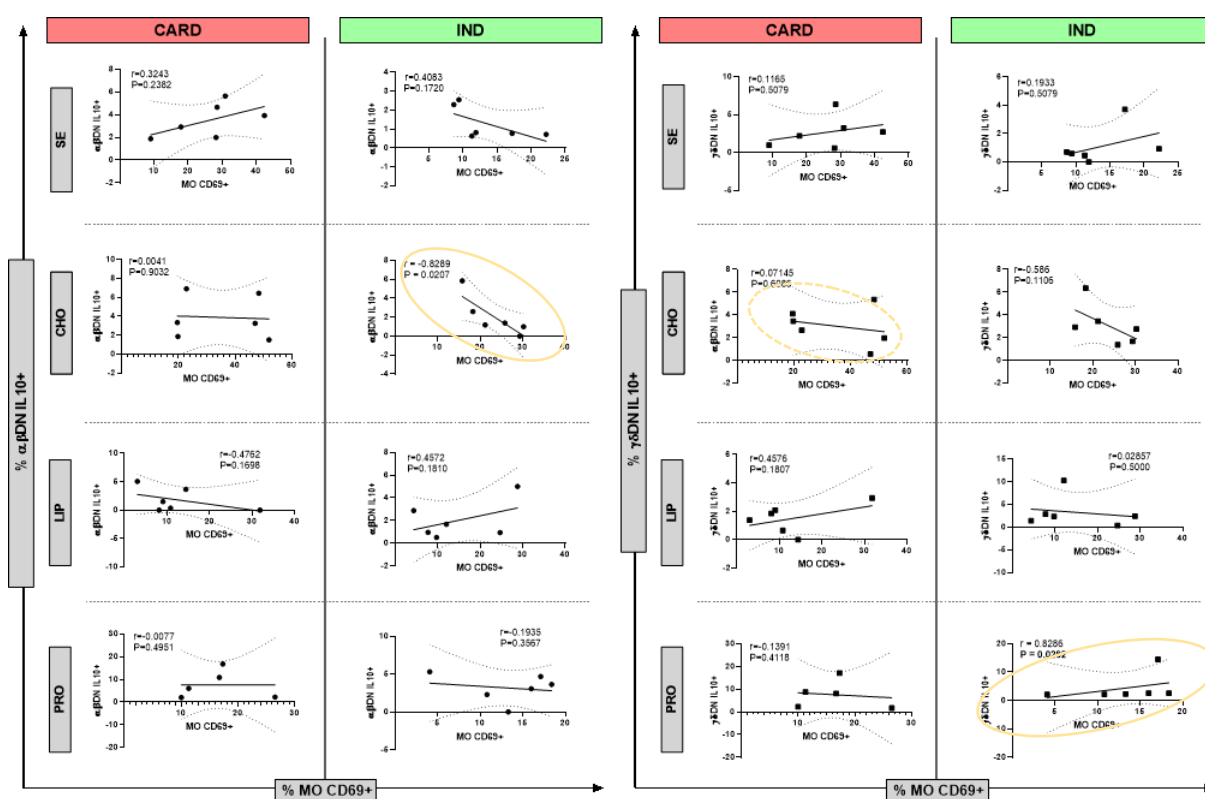


Figura 21: Correlação entre a frequência de células T DN $\alpha\beta$ TCR ou $\gamma\delta$ TCR IL-10⁺ e a frequência de monócitos CD69⁺, de pacientes das formas clínicas da doença de Chagas (CARD e IND) expostos a diferentes frações do *T. cruzi*. Estímulos: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), com frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP). Elipses amarelas contínuas destacam correlações estatisticamente significativas, enquanto as pontilhadas destacam as correlações fortes, porém sem diferença estatística.

6.8 Monócitos TNF- α^+ de pacientes IND ativados por frações de *T. cruzi* estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR inflamatórias

Quando correlacionamos os monócitos inflamatórios (TNF- α^+) com as células T DN também inflamatórias (TNF- α^+), observamos que monócitos IND estimulados com qualquer uma das frações de *T. cruzi* tem uma forte correlação positiva com as células T DN $\gamma\delta$ TCR inflamatórias (**Figura 22**). Nos pacientes da forma CARD, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre monócitos estimulados e as populações de linfócitos T DN. Contudo, nos monócitos não estimulados (SE) em ambas as formas clínicas CARD e IND, podemos observar fortes correlações positivas entre monócitos TNF $^+$ e células T DN $\gamma\delta$ TCR TNF- α^+ , contudo essa correlação foi estatisticamente significativa apenas no grupo IND (**Figura 22**).

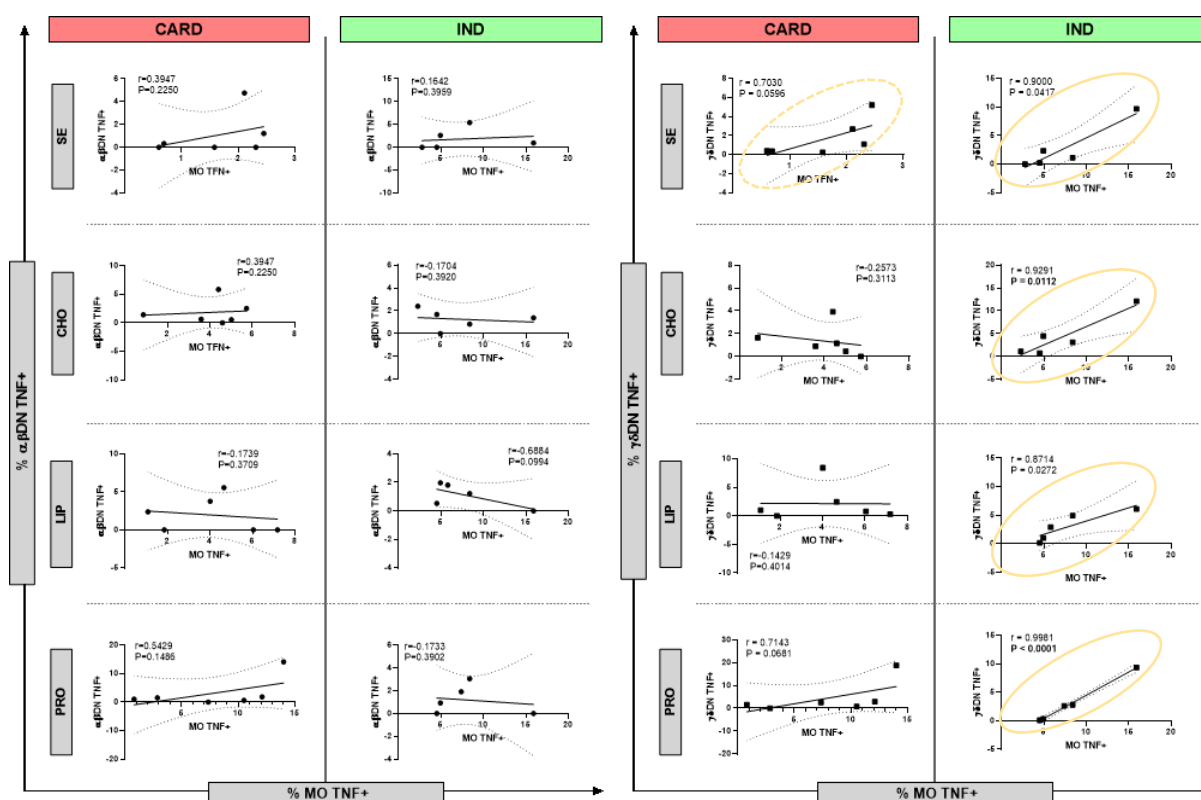


Figura 22: Correlações entre a frequência de monócitos TNF- α^+ e subpopulações de células T DN TNF- α^+ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações do *T. cruzi*. Estímulos: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), com frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP). Elipses amarelas contínuas destacam correlações estatisticamente significativas, enquanto as pontilhadas destacam as correlações fortes, porém sem diferença estatística.

6.9 A ativação de monócitos inflamatórios por fração rica em proteínas de *T. cruzi* está negativamente correlacionada com células T DN $\gamma\delta$ TCR regulatórias em pacientes CARD

A fim de entender qual a relação entre as células T DN regulatórias e monócitos inflamatórios sob diferentes estímulos, correlacionamos essas populações celulares, no entanto só foram observadas fortes correlações positivas e estatisticamente significativas com monócitos inflamatórios ($\text{TNF-}\alpha^+$), no grupo CARD estimulado com a fração PRO, indicando uma possível ação reguladora desses linfócitos sobre os monócitos inflamatórios estimulados com a fração enriquecida em proteínas (PRO) (Figura 23).

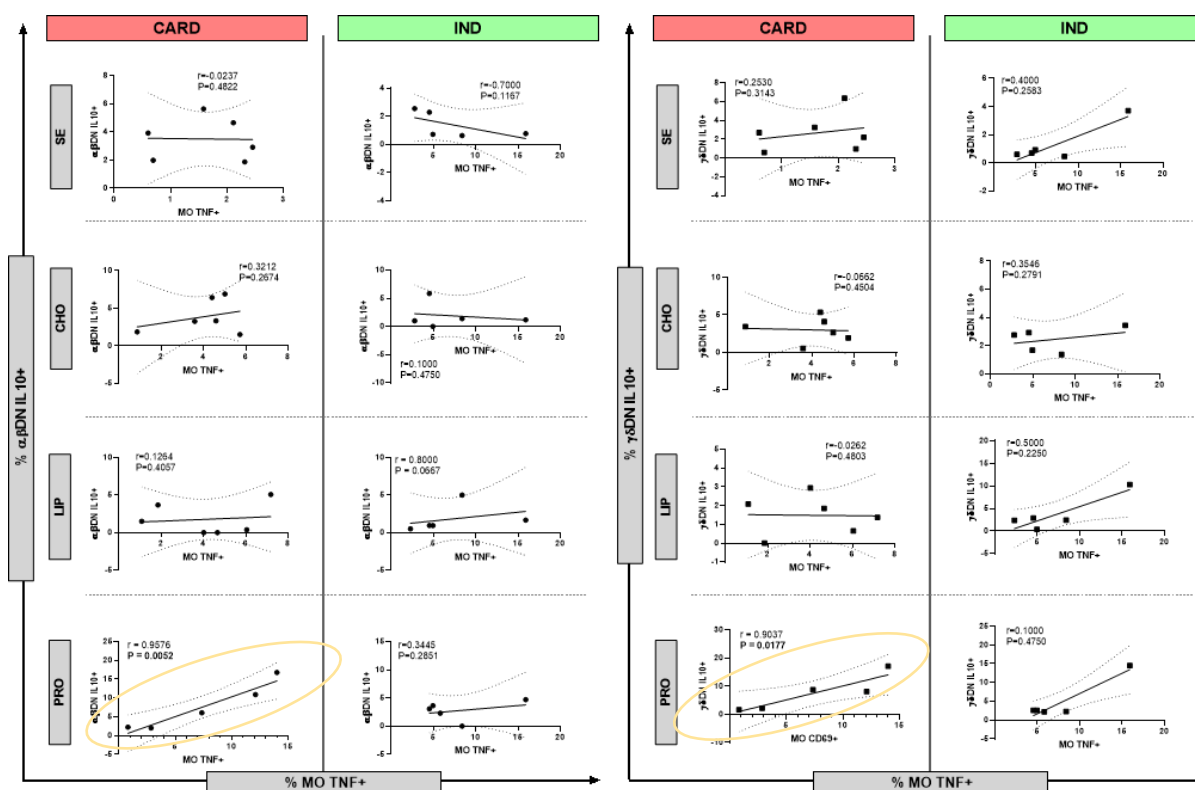


Figura 23: Correlações entre a frequência de monócitos $\text{TNF-}\alpha^+$ e subpopulações de células T DN IL-10^+ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações antigênicas derivadas de tripomastigotas do *T. cruzi*. Estimulos: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP). Elipses amarelas contínuas destacam correlações estatisticamente significativas, enquanto as pontilhadas destacam as correlações fortes, porém sem diferença estatística.

6.10 Monócitos inflamatórios (TNF- α^+) de pacientes com ambas as formas clínicas de DC estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR ativadas (CD69 $^+$)

Por fim, ao correlacionarmos as subpopulações de células T DN CD69 $^+$ com monócitos inflamatórios (TNF- α^+) sem estímulo, observamos que tanto no grupo CARD como no grupo IND há uma forte correlação positiva entre a frequência dessas células e a frequência de células T DN $\gamma\delta$ TCR CD69 $^+$. Além disso, há também uma forte correlação entre a frequência de monócitos TNF- α^+ estimulados com a fração PRO e a frequência de células T DN $\gamma\delta$ TCR CD69 $^+$ apenas no grupo IND (Fig 24).

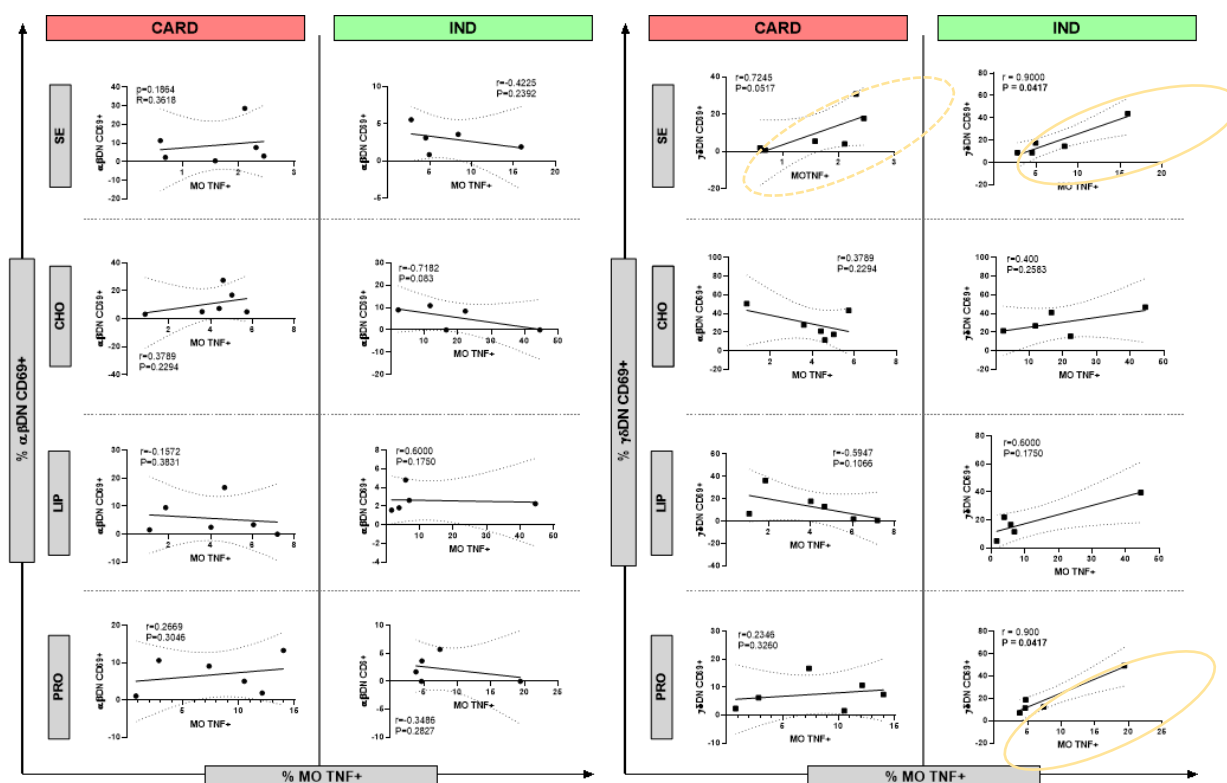


Figura 24: Correlações entre a frequência de monócitos TNF- α^+ e subpopulações de células T DN CD69 $^+$ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas expostas a diferentes frações do *T. cruzi*. Estímulos: não estimuladas (SE), frações ricas em glicolipídios (CHO), com frações ricas em proteínas (PRO) e frações ricas em lipídios (LIP). Elipses amarelas contínuas destacam correlações estatisticamente significativas, enquanto as pontilhadas destacam as correlações fortes, porém sem diferença estatística.

6.11 Maiores frequências de monócitos inflamatórios estão relacionadas a piores parâmetros clínicos de função cardíaca

Para verificar se havia associação de monócitos ativados e /ou inflamatórios com os parâmetros clínicos de função cardíaca avaliados, sendo eles o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (LVDD) e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF), correlacionamos esses dados clínicos com a frequência de monócitos expressando CD69⁺, TNF- α ⁺ ou coexpressando CD69⁺TNF- α ⁺. Aqui se faz necessários pontuar que valores baixos de LVDD e valores altos de LVEF estão associados a uma boa função cardíaca (RIBEIRO; MORCELI; GONÇALVES; FRANCO *et al.*, 2012).

Observando o grupo IND, podemos concluir que maiores frequências de monócitos inflamatórios (TNF- α ⁺ e CD69⁺TNF- α ⁺) estão relacionados a menores valores de LVEF, e possivelmente a uma pior função cardíaca. Considerando o parâmetro LVDD, no grupo CARD observamos uma correlação negativa com a frequência de monócitos CD69⁺, indicando que nesse grupo de pacientes, maiores quantidade de monócitos ativados estão associados uma piora nos valores desse parâmetro.

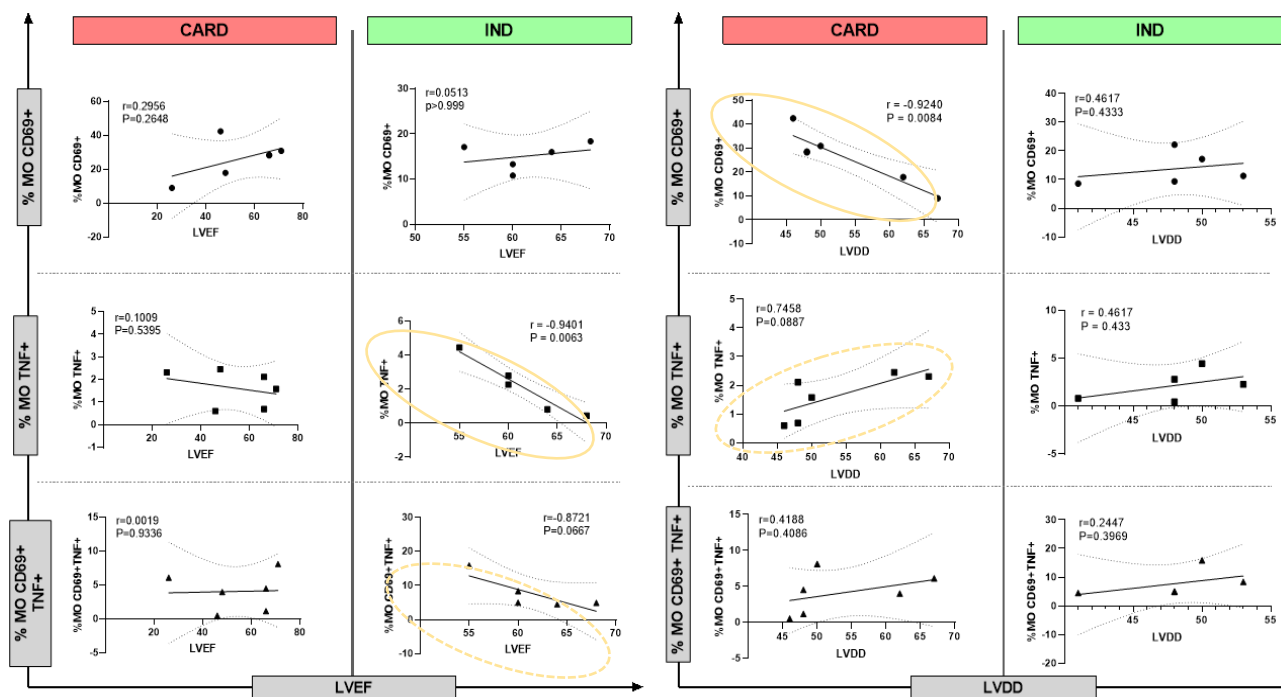


Figura 25: Correlações entre os parâmetros clínicos a frequência de monócitos CD69⁺, TNF- α ⁺ ou CD69⁺TNF- α ⁺ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Elipses amarelas contínuas destacam correlações estatisticamente significativas, enquanto as pontilhadas destacam as correlações fortes, porém sem diferença estatística.

7. DISCUSSÃO

O conjunto de dados compilados neste estudo, em geral, mostraram o perfil inflamatório predominante em monócitos de pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas, (**Figura 4E**). Concomitante ao aumento na frequência de monócitos TNF- α^+ , no grupo CARD TRP, também observou-se um aumento na frequência de monócitos IL-10⁺ sob a mesma condição. Apesar de parecer antagônico, não é incomum que aumento da atividade inflamatória estimule também a secreção de citocinas antiinflamatórias, na tentativa de amenizar os efeitos deletérios ou mesmo equilibrar o contexto inflamatório exacerbado (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Assim como observamos em monócitos, Longhi e colaboradores (2014) também observaram um aumento de TNF- α e IL-10, em linfócitos, em pacientes com C.C.C. após estímulo com proteína P ribossomal de *T. cruzi*, indicando uma possível ativação dupla da resposta modulatória e pró-inflamatória frente ao antígeno (LONGHI; ATIENZA; PEREZ PRADOS; BUYING *et al.*, 2014). Estudos em modelo murino também demonstraram que a produção de TNF- α não afeta negativamente a produção de IL-10, podendo ainda induzir sua produção (HUYNH; KUSNADI; PARK; MURATA *et al.*, 2016). Com essas observações iniciais, podemos inferir que essa secreção concomitante de citocinas anti e pró-inflamatórias indica uma múltipla ativação de células de diferentes subtipos, que co-existem no decorrer da infecção, e que podem se direcionar para um perfil em detrimento do outro no curso da infecção, a depender de múltiplas variáveis.

Ainda assim, no grupo IND, a frequência de monócitos IL-10⁺ foi significativamente maior do que no grupo CARD, com ou sem estímulo (**Figura 4D**). Os resultados das frequências de citocinas indicam que monócitos de pacientes IND conseguem manter um equilíbrio imunológico, através da secreção de IL-10, que potencialmente pode suprimir a ação de diversas populações celulares, dentre elas linfócitos. Além disso, estudos com modelo murino, tem demonstrado o importante papel da IL-10 na redução da fibrose durante a cicatrização, parecendo impedir resultados prejudiciais da formação de cicatrizes em diferentes tecidos (RADA; DONATO; PENAS; ALBA SOTO *et al.*, 2020). Especificamente na DC, a IL-10 foi positivamente associada ao aumento de derivado de ácido betulínico, capaz de reduzir a inflamação e a fibrose cardíaca, por induzir um fenótipo antiinflamatório (M2) em macrófagos (MEIRA; SANTOS; SANTO; VASCONCELOS *et al.*, 2019). Assim, é importante ressaltar que a regulação da polarização de macrófagos para M2 pela IL-10 parece ser crítica para diminuir a fibrose prejudicial no tecido cardíaco (JUNG; MA; IYER;

DELEON-PENNELL *et al.*, 2017; MYLONAS; JENKINS; CASTELLAN; RUCKERL *et al.*, 2015).

Esse conjunto de dados dos diferentes perfis de monócitos entre as formas clínicas corroboram ainda os achados de Souza e colaboradores (2004), que demonstraram um perfil anti-inflamatório em monócitos de pacientes indeterminados, com maior expressão de IL-10, e em contrapartida maiores frequências de monócitos expressando TNF- α em pacientes cardíacos (SOUZA; ROCHA; ROCHA-VIEIRA; MENEZES *et al.*, 2004).

Ainda considerando o perfil funcional visto nos monócitos CARD, visto neste estudo, e sua implicação no desenvolvimento de sintomas vistos na DC, é importante ressaltar que o TNF- α é uma citocina altamente pleiotrófica, capaz de afetar qualquer tipo de célula, mas especialmente monócitos, podendo desencadear respostas como expressão de genes inflamatórios, estimulação da proliferação, e ativação de apoptose ou necroptose (SIEGMUND; KUMS; EHRENSCHWENDER; WAJANT, 2016). Já o CD120a (ou TNFR1) mais frequente e expresso em monócitos CARD, como mostrado na figura 5D, contém domínios de receptor de morte, que permite, principalmente, o envolvimento de vias de sinalização ativadores citotoxicidade, como o fator nuclear kappa B (NF κ B) ou quinases da família de MAP quinase (BRENNER; BLASER; MAK, 2015). O CD120a é expresso por qualquer tipo de células, mas em monócitos pode estimular a secreção autócrina de TNF- α em resposta à sua ativação. Ou, juntamente com a sinalização de TNFR2 desencadear um potencial necroptótico. Interessantemente, essa alternativa de ação, pode ser usada com estratégia de alguns microorganismos, que mediada por IL-10, desencadeiam a liberação do TNFR2 para escapar ou diminuir os efeitos da morte por TNF- α (BALCEWICZ-SABLINSKA; KEANE; KORNFELD; REMOLD, 1998; SIEGMUND; KUMS; EHRENSCHWENDER; WAJANT, 2016).

Recentemente, em seu estudo com pacientes, Silva *et al.* associaram maiores níveis plasmáticos de sTNFR1 e sTNFR2 (receptores na sua forma solúvel) com maior dilatação cardíaca e pior função sistólica em pacientes com C.C.C. (SILVA; COSTA; LIMA; XAVIER *et al.*, 2020). Em modelo murino, Kroll-Palhares e colaboradores demonstraram que a sinalização de TNF- α via TNFR1/ p55, é um indutor de ativação celular, desenvolvimento de miocardite e dano ao tecido cardíaco durante a infecção experimental por *T. cruzi*, concluindo que a sinalização deste eixo pode desempenhar um papel prejudicial durante a infecção, e contribuí para o desenvolvimento de anormalidades imunológicas, como esplenomegalia e

desregulação celular de células T CD8⁺ levando à lesão cardíaca. (KROLL-PALHARES; SILVÉRIO; SILVA; MICHAILOWSKY *et al.*, 2008).

Em suma, esses dados nos levaram a corroborar que, de fato, monócitos podem ser ativados pela interação com *T. cruzi* adquirindo tanto propriedades inflamatórias, como fenótipos envolvidos no reestabelecimento da homeostase, e que a combinação do direcionamento dessas células com as demais células envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro, além das características intrínsecas do parasita, contribuirão para o desfecho clínico daquele paciente (MEDINA-BUELVAS; RODRÍGUEZ-SOSA; VEGA, 2021).

Além da maior frequência de TNF- α e seu receptor, os monócitos de pacientes CARD também exibem maior frequência e /ou expressão de PDL-1 e Fas-L (**Figura 6**). Estudos com modelo murino de inflamação cardíaca demonstraram um aumento de PDL-1 em células cardíacas, como tentativa de reduzir a inflamação local e diminuir danos irreversíveis no coração (revisado por (CARRILLO-SALINAS; NGWENYAMA; ANASTASIOU; KAUR *et al.*, 2019). Outros trabalhos de diferentes grupos, com modelo murino da infecção por *T. cruzi*, também mostraram papel semelhante da expressão de PD-1 e PDL-1 na limitação das respostas de células T no tecido cardíaco (Revisto por (PINTO; MEDEIROS; FONTES-CAL; NAZIAZENO *et al.*, 2018) Além disso, é descrito que as proteínas PD-1 e PDL-1 levam à imunotolerância e previnem reações imunológicas a antígenos cardíacos. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas quanto à frequência de monócitos PDL-1⁺ entre os grupos sem estímulo, o grupo IND exibiu maior expressão da molécula comparado ao grupo CARD meio, indicando uma maior tolerância às repostas imunológicas danosas ao hospedeiro. Em suma, aumentos dessas proteínas poderiam surgir em contextos inflamatórios, de forma crucial para reduzir a inflamação cardíaca após infecção (GRABIE; GOTSMAN; DACOSTA; PANG *et al.*, 2007). Safi e colaboradores sugeriram que o aumento de PDL-1 em monócitos periféricos também pode ser acompanhado de distribuição elevada de FasL, CD40, IFN- γ e perforina (SAFI; AHMED; AL-AZAB; XIA *et al.*, 2021). Estes dados também poderiam indicar uma tentativa de regulação da inflamação. No entanto, é importante lembrarmos que a regulação via Fas-L se dá pela indução de apoptose. Dados de Rodrigues e colaboradores, com pacientes C.C.C. grave, apontaram um alto percentual de linfócitos apoptóticos, relacionados à ativação de vias de morte programadas, por receptores de Fas/Fas-L ou TNF- α , levando ao escape do parasita e, conseqüentemente, a uma contínua estimulação do sistema imunológico (RODRIGUES; AGRELLI; LEON; SILVA TEIXEIRA *et al.*, 2008). Em nossos dados, observamos maior frequência de monócitos Fas-L⁺ no grupo CARD meio em comparação ao grupo IND meio (**Figura 6C**), e uma maior responsividade desses

monócitos frente ao estímulo com TRP. Em modelo experimental, a apoptose de células T também leva a um aumento do crescimento do parasita: em animais Fas-L^{-/-} a infiltração cardíaca foi significativamente reduzida, culminando em menor destruição de cardiomiócitos (DE OLIVEIRA; DINIZ; BATISTA; BATISTA *et al.*, 2007). Logo, poderíamos sugerir que a apoptose de linfócitos mediada por Fas-L e/ou TNF- α produzidos por monócitos, bem como o aumento de PDL-1, no contexto da DC, estaria correlacionada com uma resposta imunológica ineficiente no controle parasitário, e portanto positivamente relacionada com danos ao coração.

A caracterização fenotípica de monócitos (Figura 8), e a subcategorização observada em nossas análises, vão de encontro aos achados de três outros trabalhos com diferentes estratégias, que também demonstraram aumentos no subconjunto intermediário em pacientes C.C.C (GÓMEZ-OLARTE; BOLAÑOS; ECHEVERRY; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019; PINTO; MEDEIROS; TEIXEIRA-CARVALHO; ELOI-SANTOS *et al.*, 2018; PÉREZ-MAZLIAH; CASTRO EIRO; ÁLVAREZ; LOCOCO *et al.*, 2018). O diferente perfil nas frequências de monócitos de pacientes CARD é um dado particularmente relevante, visto que monócitos intermediários e clássicos são descritos como mais associados a um pior prognóstico em diferentes doenças miocárdicas (BARISIONE; GARIBALDI; GHIGLIOTTI; FABBI *et al.*, 2010). No entanto, apesar do estímulo com extrato bruto influenciar na frequência das subpopulações de monócitos intermediários e não-clássicos em ambas as formas clínicas, é importante também notarmos que, sem estímulo, os monócitos de pacientes IND, em geral, possuem maiores frequências de monócitos intermediários e não-clássicos, quando comparado aos pacientes CARD. Recentemente, Pieralisi e colegas (2021) em seus estudos com pacientes com doença de Chagas também encontraram maiores porcentagens de monócitos não-clássicos em pacientes IND, quando comparados com pacientes com C.C.C. ou indivíduos não infectados. No entanto, no mesmo estudo os autores não encontraram diferenças entre as subpopulações de monócitos intermediários entre os grupos, e encontraram porcentagens significativamente maiores de monócitos clássicos em pacientes CARD (PIERALISI; CEVEY; PENAS; PRADO *et al.*, 2021). As divergências encontradas entre nossos estudos podem estar ligadas à heterogeneidade da *coorte* avaliada, visto que no estudo do grupo argentino excluiu-se ainda pacientes com uso de hipolipemiantes e estatinas.

Pelas análises semi-quantitativas (**Figura 8D**), é possível observar maior frequência na subpopulação de monócitos clássicos em pacientes CARD. Narasimhan (2019) revisando estudos das subpopulações de monócitos, descreve que monócitos clássicos são críticos para respostas inflamatórias iniciais, no entanto com o estabelecimento da doença, eles podem se

diferenciar em macrófagos teciduais, e contribuir para lesões crônicas. Por outro lado, pacientes do grupo IND apresentaram maior frequência da subpopulação de monócitos não-clássicos quando comparado ao grupo CARD, que segundo o mesmo autor, são amplamente relacionados a um perfil antiinflamatório por manter a homeostase vascular e secreção de IL-10 (NARASIMHAN; MARCOVECCHIO; HAMERS; HEDRICK, 2019).

Por último, observamos que sem estímulo, pacientes do grupo IND tem frequências significativamente maiores de monócitos intermediários, quando comparado ao grupo CARD. Esse achado é curioso, visto que tradicionalmente monócitos intermediários estão relacionados com inflamação (GÓMEZ-OLARTE; BOLAÑOS; ECHEVERRY; RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). Contudo, a literatura também descreve a ampla atividade de apresentação de antígenos e estimulação de células T decorrente das atividades dessa subpopulação, o que poderia estar relacionado a um maior controle do parasita (TAHIR; STEFFENS, 2021).

As interações entre monócitos e linfócitos durante a apresentação de antígenos, através de moléculas de HLA-DR é de grande importância para a produção de uma resposta imunológica eficiente (DENDROU; PETERSEN; ROSSJOHN; FUGGER, 2018), portanto também analisamos a frequência e expressão dessa molécula dentro das subpopulações de monócitos de pacientes CARD e IND (**Figura 9**).

No contexto da DC, a avaliação da frequência e expressão de HLA-DR traz situações bem descritas na literatura, como uma diminuição na expressão dessa molécula apresentadora de antígenos, em pacientes com C.C.C., como forma de estratégia de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, além da expressão reduzida também de moléculas co-estimulatórias como CD86 (ALBA SOTO; MIRKIN; SOLANA; GONZÁLEZ CAPPÁ, 2003; SOARES; NEVES; CAVALCANTI; MARINHO *et al.*, 2016). Ainda que o estímulo com TRP aumente a expressão de HLA-DR em CARD, é interessante notar que, em geral, em pacientes CARD tem-se uma menor expressão de HLA-DR; e em IND a expressão da molécula tem uma tendência a ser diminuída com estímulo TRP. Esses resultados podem indicar que o parasito poderia alterar diretamente a função de apresentação de antígenos por esses monócitos, utilizando desse mecanismo para escapar das respostas imunes, e favorecer assim sua infecção persistente (VAN OVERTVELT; VANDERHEYDE; VERHASSELT; ISMAILI *et al.*, 1999), como observado e sugerido por Flamme (1997) e Alba Soto (2003) onde foi demonstrado que monócitos infectados por *T. cruzi* eram incapazes de apresentar antígenos de forma eficiente aos linfócitos T CD4 (ALBA SOTO; MIRKIN; SOLANA; GONZÁLEZ CAPPÁ, 2003; LA FLAMME; KAHN; RUDENSKY; VAN VOORHIS, 1997),

ou mesmo quando apresentado, havia uma depressão na resposta via MHC-II, que contribuía para uma resposta anérgica das células T CD4⁺, mesmo na presença de IFN- γ (MILLAR; WLEKLINSKI-LEE; KAHN, 1999). Em adição, é importante ainda pontuar que nos monócitos clássicos, os mais prevalentes no grupo CARD, a expressão de HLA-DR é a menor dentre todos as subpopulações tanto no próprio grupo CARD, como no grupo IND, com ou sem estímulo. Tarleton (1996) mostraram que camundongos MHC-II nocaute exibiram altas cargas parasitárias, o que leva os animais à morte ainda na fase aguda da doença, mesmo com a manutenção de uma resposta inflamatória significativa. No mesmo estudo, os autores também observaram que após a infecção com *T. cruzi*, tanto camundongos MHC normais, como MHC II⁻ tiveram o número de linfócitos T TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ aumentados no baço, e que esse aumento era maior nos animais *nocautes* o que os levaram a interpretar que essa subpopulação de linfócitos não era restrita a CD1 (TARLETON; GRUSBY; POSTAN; GLIMCHER, 1996). Louie (1994) em seu estudo com hidribomas de monócitos e macrófagos observou que a infecção pelo *T. cruzi* levou à diminuição da expressão de HLA-DR (LOUIE; CUNA; RODRIGUEZ DE CUNA; MAYER *et al.*, 1994). Souza (2004) e Gómez-Olarte (2019), em parcial concordância, demonstraram maiores populações de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ em pacientes C.C.C, e redução dessa população em pacientes IND, assim como pudemos observar na subpopulação de monócitos não clássico, com ou sem estímulo.

Nossos dados, demonstraram, que sem estímulo, no grupo CARD as subpopulações de monócitos intermediários e não-clássicos HLA-DR⁺ eram mais frequentes quando comparado ao grupo IND, também sem estímulo. Além disso, Sathler-Avelar e colaboradores (2008) também observaram aumento da população de monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) HLA-DR⁺ na fase crônica inicial em crianças e em adultos chagásicos crônicos após tratamento antiparasitário (SATHLER-AVELAR; VITELLI-AVELAR; MASSARA; DE LANA *et al.*, 2008), o que poderia sugerir uma (re)ativação desses monócitos mais inflamatórios.

Na literatura poucos são os dados que caracterização a expressão das isoformas da família CD1 em monócitos, sobretudo no contexto da DC, adicionada à limitação na expressão das isoformas do grupo 1 em modelo murino (ADAMS, 2013). Considerando-se a abundância de antígenos glicoconjugados e lipídicos que compõem a membrana do *T. cruzi* (PROCÓPIO; ALMEIDA; TORRECILHAS; CARDOSO *et al.*, 2002), não poderíamos deixar de considerar a caracterização dessas outras moléculas apresentadoras de antígenos, que possam ter importante papel na ativação de células efetoras no contexto da DC (**Figura**

10). Apesar das lacunas ainda existentes acerca da apresentação de antígenos pela família de moléculas CD1, à luz da literatura podemos sugerir algumas possíveis interpretações para as observações constatadas em nosso estudo.

É sabido que a distribuição das isoformas de CD1 depende da associação a lipoconjugados que são mais propensos à ligação e estabilização pelas diferentes isoformas, além de requererem o processamento por enzimas e necessidade de proteínas acessórias e pH específico (ODYNIEC; BARRAL; GARG; TATITURI *et al.*, 2010). As isoformas da CD1a, CD1b e CD1c são expressas constitutivamente em várias células mielomonocíticas, dentre elas monócitos, células dendríticas, e células linfóides, enquanto a isoforma CD1d seria pouco expressa em monócitos, e apesar de sua expressão parecer ser a partir de estimulação antígeno-específica, e não caracterizar uma APC madura (ADAMS, 2013; PORCELLI, 1995). Gregory e colaboradores (2000) em seus experimentos com PBMCs, demonstraram que as moléculas de CD1 podem ser expressas em monócitos, mesmo de indivíduos saudáveis, em determinados estados de diferenciação ou ativação. Nesse estudo desses autores, mostrou-se ainda que particularmente a isoforma CD1a participa da coestimulação de células T, induzida por super antígeno bacteriano (GREGORY; ZILBER; CHARRON; GELIN, 2000).

Como são poucos os dados sobre a distribuição das isoformas de CD1, no contexto da DC, avaliamos a frequência e expressão das isoformas discriminadas nas subpopulações de monócitos. Os dados demonstraram que o estímulo TRP aumenta a frequência e/ou expressão de CD1a e CD1b na maioria dos monócitos em pacientes CARD, e visto que constitutivamente em monócitos, a expressão dessas moléculas é descrita como muito baixa (PORCELLI; MODLIN, 1999), podemos inferir que, de fato, os lipoantígenos expressos em *T.cruzi* são capazes de induzir a expressão de CD1a e CD1b, e que essas moléculas podem participar ativamente na apresentação de antígenos lipídicos das formas tripomastigotas. Esse dado é particularmente interessante pois, até o momento, faltam dados na literatura que associem a expressão dessas moléculas no contexto de doenças causadas por protozoários.

Além disso, temos que em monócitos clássicos, sem estímulo, há uma maior frequência de monócitos CD1a⁺, apesar do MFI dessa molécula indicar maior expressão no grupo IND.

Curiosamente, dados recentes tem proposto uma nova interpretação para a ligação de CD1a-Lipídio-TCR. Pesquisas com diversos ligantes de TCR, dentre eles exógenos ou próprios, demonstraram que, na verdade, a sinapse imunológica entre CD1a com o TCR ocorre sem o contato direto do TCR com o lipídio apresentado, devido à conformação da

estrutura dessa isoforma. Assim, apenas quando um lipídio ‘maior’ bloqueasse esse contato convencional, haveria o deslocamento de bloqueadores endógenos ligados ao CD1a, que levaria à ativação das células T, em um mecanismo definido como “ligado até desligar” (Ver esquema proposto na **figura 26**) (COTTON; WEGRECKI; CHENG; CHEN *et al.*, 2021; GAPIN, 2021). Diante desses dados, poderíamos sugerir que a expressão aumentada de CD1a, vista no grupo IND, na verdade, poderia ser mais um mecanismo regulatório e/ou inibitório da ativação de células T. Essa interpretação alternativa é apoiada por outros estudos, como o de Jabbour e colaboradores (2015), que observaram uma diminuição significativa na expressão total de CD1a (5 vezes menos), em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea comparado com pele normal, e essa diminuição era inversamente correlacionada com o índice parasitário nas lesões (JABBOUR; ISSA; CHARAFEDDINE; SIMAAN *et al.*, 2015).

Essa proposta faz ainda mais sentido quanto analisamos a isoforma CD1b. Tem-se evidências de que para que ocorra a ligação de lipídios às moléculas CD1b tem-se a necessidade do pH ácido, como forma de controle do tamanho e da taxa de antígenos capturados. Por outro lado, em endossomos ou lisossomos tardios, na presença de pH básico, a tendência é que o CD1b se ligue a lipídios de cadeias longas (MOODY; BRIKEN; CHENG; ROURA-MIR *et al.*, 2002). Diante desta informação, é possível especular que, como vemos que em CARD sem estímulo há maiores expressões da molécula CD1b em todas as subpopulações de monócitos, a maior expressão dessa isoforma se daria pela ligação de supostamente lipoconjugados de cadeia mais longa, ou até mesmo âncoras de fosfatidilinositol ligadas a glicanos adicionais (BRIGL; BRENNER, 2004), que potencialmente não encaixariam na isoforma CD1a ou inibiriam a ligação do TCR ao CD1a.

Para essa forma de interpretação poderíamos ainda levar em consideração o que ocorre com a apresentação de antígenos de veneno de abelha, por moléculas de CD1a. No caso, apesar do veneno de abelha possuir antígenos imunogênicos contendo frações proteicas, através da enzima fosfolipase A2, presente em monócitos, são gerados neoantígenos menores, como ácidos graxos e lisofosfolipídios, capazes de ativar respostas policlonais de células T, via apresentação por CD1a (BOURGEOIS; SUBRAMANIAM; CHENG; DE JONG *et al.*, 2015). Outro estudo, muito elegante de deJong e colegas (2010), demonstrou que as células T CD1a autorreativas são um componente normal do repertório de células T $\alpha\beta$ TCR humanas, normalmente aparecendo em sangue periférico, e que não apresentavam as sequências de TCR altamente conservadas, como já observado em células iNKT. Outro dado relevante observado nesse estudo, foi a produção de IL-22 de uma forma dose dependente em

reposta a CD1a, por células T CD1a-reativas, mas também de IFN- γ , mas não IL-17. A IL-22 é uma citocina da família da IL-10, que pode ter efeitos que envolvem a estimulação celular, proliferação e síntese de defensinas, além de ser secretada nos locais de inflamação, participando portanto da cicatrização e homeostase do tecido (WOLK; KUNZ; WITTE; FRIEDRICH *et al.*, 2004).

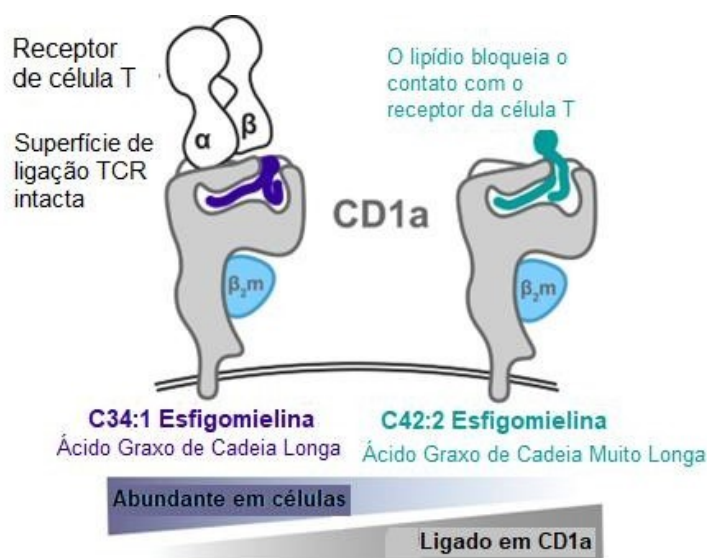


Figura 26: Novo esquema de ligação CD1a-Lipídio-TCR proposto por Cotton e colaboradores (2021). Para chegar nesse modelo de ligação, os autores utilizaram métodos de otimização de lipidômica para detectar antígenos endógenos que se ligam à CD1a celular. Através do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, eles determinaram que CD1a captura preferencialmente lipídios endógenos curtos que permitem amplamente a ligação da isoforma ao TCR, e consequentemente estabilizam a tríade de ligação. Por outro lado, os dados mostraram que a lipídios mais longos forçavam grupamentos fosfocolina a emergir acima do local de exibição do antígeno, impedindo assim a acoplagem do TCR com CD1a. Com isso eles inferiram que os agonistas funcionais de CD1a, não seriam “antígenos”, mas sim deslocadores de bloqueadores negativos dominantes. E como conclusão proporam o mecanismo em que a ligação de lipídios longos, bem como o aumento de lipídios endógenos de cadeia curta, deslocariam os bloqueadores endógenos ligados a CD1a, e consequentemente haveria a ativação das célula T. (COTTON; WEGRECKI; CHENG; CHEN *et al.*, 2021).

Com a isoforma CD1c, observamos uma tendência de maior frequência e expressão da molécula em monócitos do grupo IND sem estímulo. Esse achado é particularmente interessante, visto que de todas as isorformas do grupo 1, o CD1c é o único que é descrito com a capacidade de trafegar amplamente por todos os compartimentos endossomais, além de ser marcador característico de APCs profissionais (ADAMS, 2013). Ao que tem sido demonstrado por alguns pesquisadores, o CD1c pode ser um importante mediador no

reconhecimento de lipídios derivados de *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis* e outras micobactérias, para células T $\alpha\beta$ reativas, inclusive as duplo negativas (CD4-CD8-), promovendo nesse contexto a secreção de IFN- γ (FELIO; NGUYEN; DASCHER; CHOI *et al.*, 2009; ROY; LY; LI; ALTMAN *et al.*, 2014; VAN RHIJN; YOUNG; DE JONG; VAZQUEZ *et al.*, 2009). Até então só são descritos pouquíssimos lipídios naturais específicos para CD1c sendo eles fosfolipídios de cadeia ramificada (MOODY; YOUNG; CHENG; ROSAT *et al.*, 2004), e posteriormente foi evidenciado que tanto CD1a e CD1c podem se ligar e apresentar também lipopeptídeos (VAN RHIJN; YOUNG; DE JONG; VAZQUEZ *et al.*, 2009). Além disso, Van Rhijn e colegas demonstraram que a ativação das células T específicas era dependente da dose de lipopeptídeos, e indubitavelmente dependente da expressão de CD1c nas APCs (VAN RHIJN; YOUNG; DE JONG; VAZQUEZ *et al.*, 2009). No entanto, ainda não se sabe se ou como outros antígenos de lipoconjugados podem ser apresentados por CD1c, e se eles são reconhecidos pelas células T $\alpha\beta$. Visto que com e sem estímulo, pacientes IND tem maior frequência de monócitos CD1c+, poderíamos inferir que monócitos de pacientes IND e CARD tem diferenças substanciais na participação desta molécula na apresentação de antígenos de *T. cruzi*, que poderia influenciar no desfecho clínico.

Em linhas gerais, observamos que tanto a frequência quanto a expressão da maioria das isoformas de CD1 nas diferentes subpopulações de monócitos era maior no grupo IND meio, quando comparado ao CARD sob a mesma condição (**Figuras 11-13**). Esses dados vão de encontro ao estudo de Donovan (2007) que também observou que células dendríticas derivadas de monócitos infectadas por *Leishmania donovani* têm uma pronunciada regulação negativa de moléculas CD1 do Grupo 1, que poderia levar a uma diminuição da apresentação de antígenos lipídicos, facilitando assim a disseminação do parasito para os órgãos viscerais (DONOVAN; JAYAKUMAR; MCDOWELL, 2007).

Apesar de ainda não completa, essa descrição inicial da frequência e expressão das isoformas de CD1 no contexto da DC aponta um caminho interessante, visto que cada vez mais tem sido esclarecida a importância dos lisossomos para a infecção inicial do *T. cruzi* nas células, bem como sua permanência para evadir-se das repostas imunológicas iniciais; e levando em consideração que todas as isoformas dessa família participam do metabolismo lipídico (endossomos, lisossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático) (MOODY; BRIKEN; CHENG; ROURA-MIR *et al.*, 2002). A cobertura abrangente dada pela família CD1 aos compartimentos onde a maioria dos lipídios são sintetizados é equivalente àquela fornecida pelos sistemas de MHC de classe I e II (HAIG; GUAN; LI; MCMICHAEL *et al.*,

2011). A caracterização preliminar proposta por esse presente estudo mostra que, de fato, entre as diferentes formas clínicas vistas na DC, há diferenças significativas na apresentação de antígenos com motivos lipídicos e/ou glicolipídicos, que podem induzir ou colaborar com os diferentes desfechos clínicos observados.

Outra consideração importante diz respeito à capacidade das isoformas apresentarem autolipídios, e ativarem células T autorreativas, como discutido no trabalho de Haig *et al* (HAIG; GUAN; LI; MCMICHAEL *et al.*, 2011). Ainda na corrente sanguínea, diferentes tipos de lipídios ligantes de CD1 se associam com partículas de lipoproteínas de baixa (VLDL) e alta (HDL) densidade (SALIO; SILK; JONES; CERUNDOLO, 2014), o que poderia estar também associado à apresentação crônica de criptoantígenos ou mesmo antígenos miméticos, já descritos na DC (CUNHA-NETO; DURANTI; GRUBER; ZINGALES *et al.*, 1995).

Apesar de estudos *in vitro* e *in vivo* de Procópio e colaboradores (2002) mostrarem que glicoproteínas do tipo mucinas ancoradas a GPI, ou mesmo os GILPS, apesar de ligarem como a molécula de CD1d, foram incapazes de ativar células NKT, mas que o MCH II sim era crítico para produção dos principais anticorpos IgG anti-mucinas GPI de *T. cruzi* (PROCÓPIO; ALMEIDA; TORRECILHAS; CARDOSO *et al.*, 2002), os dados das pesquisas com células de pacientes com a doença de Chagas produzidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram o importante papel da isoforma CD1d na ativação de uma resposta pró-inflamatória de linfócitos T DN $\gamma\delta$ TCR, levando a uma pior função cardíaca em pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas (PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016). Com isso, entender melhor o contexto da apresentação de antígenos por essas moléculas era imprescindível para aprofundar as interpretações sobre os efeitos desta família de moléculas na ativação de diferentes populações de células T DN.

Logo, inicialmente, fizemos a caracterização de monócitos CD1d⁺, e observamos que esses monócitos exibem perfil inflamatório, no grupo CARD tanto sem como com estímulo TRP (**Figura 15E**). A análise da correlação entre a expressão de moléculas inibitórias (PDL-1 e FAS-L) por monócitos CD1d⁺ e citocina inflamatória por células T DN, mostra uma correlação positiva em parâmetros de pacientes CARD e negativa em IND (Figura 13). Estes dados podem sugerir que pacientes IND talvez possuam uma tendência de melhor controle das células inflamatórias (T DN TNF- α ⁺), via monócitos CD1d⁺PDL-1⁺, e que pacientes CARD aumentem o número de monócitos regulatórios CD1d⁺IL-10⁺ e CD1d⁺PDL-1⁺ na tentativa de controlar a inflamação potencialmente gerada pelas células T DN $\alpha\beta$ TCR. Além de encontradas em células do sangue periférico, a molécula CD1d podem também ser

encontradas em células epiteliais e de origem não hematopoiética, facilitando a ativação de uma resposta T rápida e robusta em tecidos, sem a necessidade da apresentação de antígeno por uma APC profissional (DOUGAN; KASER; BLUMBERG, 2007). A expressão de CD1d pode ser diferencialmente regulada em tecidos específicos, influenciando assim tanto em funções pró-inflamatórias como reguladoras. Atualmente, tem-se sugerido que o nível de expressão de CD1d seria mais importante para a função efetora gerada do que o antígeno específico apresentado (LUOMA; CASTRO; ADAMS, 2014). Nos nossos dados, observamos que monócitos do grupo CARD tem uma tendência a maior expressão do que o grupo IND (**Figura 15A**). Em todas as subpopulações de monócitos, principalmente nos monócitos inflamatórios (Intermediários) e não-clássicos, a expressão de CD1d no grupo CARD sem estímulo é maior do que no grupo IND sem estímulo (**Figuras 12B e 13B**). Esses achados são congruentes com os demais dados produzidos pelo nosso grupo de pesquisa que indicaram a participação de células CD1d⁺ em respostas inflamatórias, relacionadas a um pior quadro clínico (PASSOS; VILLANI; MAGALHÃES; GOLLOB *et al.*, 2016). Vimos também que os monócitos CD1d⁺ de pacientes do grupo CARD são mais responsivos ao estímulo TRP, aumentando a frequência de monócitos positivos para moléculas tanto relacionadas à inflamação como também relacionadas à regulação via apoptose (**Figura 15**). Além disso, apenas no grupo CARD meio vimos uma forte correlação positiva entre a frequência de monócitos CD1d⁺ e a frequência de células T DN $\alpha\beta$ TCR TNF⁺. É sabido que durante a captação de antígenos lipídicos pelos monócitos, outros receptores como receptor de LDL (LDLR), LOX1 (receptor 1 de LDL oxidado do tipo lectina) e CD36 podem se ligar também às células apoptóticas, portanto relacionando-se com captação de lipídeos de células infectadas (GREAVES; GORDON, 2005), o que por sua vez leva a diferentes resposta celulares. Levando em consideração que pacientes CARD tem maiores frequência de monócitos CD1d⁺FasL⁺, mas também CD1d⁺TNF- α ⁺CD120⁺, após estímulo com TRP, parece tentador considerar que o *T. cruzi* induz uma série de mudanças na resposta de monócitos, de forma a aumentar expressão de receptores ligados à morte celular, e também citocina TNF- α intracelular, que poderiam potencialmente promover a apoptose em células-alvo. Obviamente, por limitações técnicas, nos faltaram evidências experimentais que reforcem esse dado, e mostrem um aumento destes receptores também em células-alvo, como linfócitos efetores, para demonstrarmos como Chaves (2016) que a apoptose está associada à redução proliferativa de linfócitos, aumento de produção de TNF- α , e expressão gênica de TNF / TNFR e família das caspases em pacientes CARD (CHAVES; DE ASSIS SILVA GOMES

ESTANISLAU; FIUZA; CARVALHO *et al.*, 2016); e Tostes (2005) que demonstrou que a perda de células miocárdicas por apoptose e fibrose contribui para a insuficiência cardíaca, na fase crônica da DC (TOSTES; BERTULUCCI ROCHA-RODRIGUES; DE ARAUJO PEREIRA; RODRIGUES, 2005). Resumindo, à luz da literatura, nossos dados podem indicar que a indução de apoptose via CD1d⁺FasL⁺, poderia potencialmente beneficiar apresentação de antígenos, e ativação de linfócitos T DN inflamatórios, e culminar em lesões no miocárdio.

Essa afirmação vai de encontro aos achados de de Oliveira e colegas, que descreveram a presença de células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ nas lesões cardíacas de animais murinos, nas fases iniciais da infecção, que correspondiam de 30 a 40% das células CD3⁺ obtidas no tecido. No experimento citado, os autores relatam que essas células T DN Fas-L^{-/-} regulavam negativamente alguns co-receptores importantes para as funções efetoras das células T convencionais; e que a infiltração cardíaca em animais Fas-L^{-/-} foi significativamente reduzida, gerando uma menor destruição de cardiomiócitos (DE OLIVEIRA; DINIZ; BATISTA; BATISTA *et al.*, 2007).

Além disso, Freire-de-Lima e colaboradores demonstraram que macrófagos em contato com células apoptóticas favorecem o crescimento intracelular do parasita e aumentam a parasitemia, sugerindo que o estado de apoptose contínua tem um papel importante na manutenção do parasita no hospedeiro (FREIRE-DE-LIMA; NASCIMENTO; SOARES; BOZZA *et al.*, 2000).

Somado à essas informações, temos que dentre as frações derivadas do extrato bruto, a que mais estimula os monócitos inflamatórios (TNF- α ⁺), no grupo CARD, é a fração enriquecida em lipídios, e a fração rica em proteínas (PRO) que aumenta a frequência de monócitos ativados (CD69⁺), sendo que a frequência de monócitos CD69⁺TNF⁺ é aumentada tanto com as frações LIP e PRO, apenas quando comparado ao grupo controle, dando mais indícios que antígenos com a natureza lipoproteica podem estimular monócitos inflamatórios (**Figura 20**).

Interessantemente, quando comparamos o efeito das diferentes frações entre as formas clínicas da DC, temos que a fração rica em carboidratos tem maior potencial de ativação de monócitos quando comparada à fração LIP, no grupo CARD (**Figura 20**).

Apesar deste estudo ser um teste preliminar, e essas frações ainda não terem sido totalmente caracterizadas, o panorama geral que as comparações das figuras 19 e 20, já nos mostraram é que as populações de monócitos são estimuladas de forma diferencial nas formas clínicas, onde monócitos de pacientes do grupo CARD parecem ser mais responsivos às frações derivadas de *T. cruzi*.

Um dado interessante que obtivemos é que *sem estímulo*, no grupo CARD, observamos uma forte correlação positiva entre as subpopulações de células T DN $\gamma\delta$ TCR e, estatisticamente significativa, nas T DN $\alpha\beta$ TCR e os monócitos CD1d⁺. Uma correlação inversa foi observada no grupo IND sem estímulo, onde além de fraca, as correlações foram negativas (**Figura 14**). Há indícios de que as populações de linfócitos T DN $\gamma\delta$ TCR teriam, em humanos, evoluído para amostrar um conjunto particular de antígenos, colaborando para a proteção e preservação do organismo (LUOMA; CASTRO; ADAMS, 2014).

Outro dado curioso, é que a adição de extrato bruto de *T. cruzi* (TRP) salientou as fortes correlações positivas entre os monócitos CD1d⁺TNF⁺ e CD1d⁺CD120⁺ com ambas as subpopulações de células T DN, apenas no grupo IND (**Figura 18**). Dentro das populações de linfócitos T mais caracterizadas, temos as células iNKT $\alpha\beta$ TCR, que são descritas pela secreção exuberante de IFN- γ e IL-4 estimulação com lipídios agonistas apresentados por CD1d (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007) Observamos também que monócitos TNF⁺ de pacientes IND ativados por qualquer uma das frações de *T. cruzi*, ou mesmo sem estímulo algum, estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR TNF- α ⁺ inflamatórias (**Figura 22**). Através dessa correlação podemos inferir que esses monócitos ativados podem ativar um perfil inflamatório nessa subpopulação de células T DN via CD1. Ainda mais levando em consideração os dados da literatura que tem demonstrado que células T DN $\gamma\delta$ TCR são citolíticas, e secretam principalmente citocinas do tipo Th1 (SPADA; GRANT; PETERS; SUGITA *et al.*, 2000).

A fração CHO e LIP, enriquecida com carboidratos e lipídios respectivamente, potencialmente poderiam conter os GILPs do parasita. Essas moléculas funcionam como agonistas de TLR4, co receptor de CD14, culminando em efeitos pro-inflamatórios (OLIVEIRA; PEIXOTO; DE ARRUDA; CAMPOS *et al.*, 2004). Além disso, tendo em perspectiva que as células T DN reconhecem esses e outros antígenos de natureza lipídica e /ou gliconjugados pela apresentação não clássica via CD1, decidimos investigar as demais correlações entre as subpopulações de células T DN $\alpha\beta$ DN e T DN $\gamma\delta$ TCR com monócitos.

Analisando as correlações indicadas na figura 21, observamos que no grupo IND as células T DN $\gamma\delta$ TCR IL-10⁺ teve uma forte correlação negativa com os monócitos CD69⁺ estimulados com CHO, nos levando a inferir junto com a observação das outras correlações que o estímulo provocado com a fração CHO fizesse com que as células T DN $\gamma\delta$ TCR regulatórias perdessem a capacidade de regular os monócitos ativados. Por outro lado, ainda no grupo IND, observamos que sob o estímulo PRO, as correlações entre subpopulações de

células T DN $\gamma\delta$ TCR e monócitos CD69⁺, nos grupos CARD e IND tem tendências opostas, mais uma vez ressaltando importantes diferenças nas respostas imunológicas entre as formas clínicas.

Quando correlacionamos monócitos inflamatórios (TNF- α ⁺) com as subpopulações de células T DN regulatórias (IL-10⁺), de forma curiosa, vemos que apenas sob o estímulo de fração enriquecida com a PRO há fortes correlações positivas entre esses monócitos e as células T DN $\alpha\beta$ TCR e $\gamma\delta$ TCR, apenas no grupo CARD (Figura 23). Monócitos inflamatórios (TNF- α ⁺) *sem estímulo* de pacientes com ambas as formas clínicas de DC estão fortemente correlacionados às células T DN $\gamma\delta$ TCR ativadas (CD69⁺). No entanto, apesar de não ser estatisticamente significativo (**Figura 24**), comparando as correlações entre as subpopulações de células T DN $\alpha\beta$ TCR *versus* monócitos ativados (CD69⁺), sob a maioria dos estímulos, nos grupos CARD e IND, observamos uma tendência oposta entre os grupos, onde no grupo CARD tem-se correlações positivas, e no grupo IND, correlações negativas. Este resultado pode ser interpretado como que as células T $\alpha\beta$ DN, nesse contexto, exibissem uma regulação inflamatória sob os monócitos CARD, e antiinflamatória nos monócitos IND. Já com a população de células T DN $\gamma\delta$ TCR CD69⁺, sob os estímulos CHO e LIP, teoricamente os que tem maior potencial de ativação para essa subpopulação de linfócitos, observamos um panorama invertido, e ainda oposto entre o grupo CARD e IND, nos levando a interpretar que, nessas situações, as células T $\gamma\delta$ DN teriam o papel regulatório antiinflamatório, corroborando dados encontrados em outro estudo do nosso grupo (VILLANI; ROCHA; NUNES; ANTONELLI *et al.*, 2010). Esse conjunto de dados, mais vez nos leva a inferir que uma vez ativadas as células T DN tem importante papel na articulação da resposta imunológica, e através da secreção de citocinas, podem deslocar a resposta para um perfil anti ou pró-inflamatório (VILLANI; ROCHA; NUNES; ANTONELLI *et al.*, 2010). Além disso, a falta de co-receptores aumenta a tolerância das células T DN às estimulações persistentes, tornando-as um importante alvo de estudos em infecções crônicas, como a vista na doença de Chagas (HAMAD; SRIKRISHNAN; MIRMONSEF; BROEREN *et al.*, 2001).

Em um panorama geral, analisando as correlações como um todo, parece que no grupo IND tem-se um número maior de correlações entre as diferentes subpopulações de células T DN com monócitos sob diferentes estímulos de *T. cruzi*. Essa menor responsividade geral a antígenos fracionados de *T. cruzi* poderia ser induzida pelo fenômeno de exaustão celular das células T específicas, após estimulação crônica, e ação inflamatória intensa e prolongada (NATALE; MINNING; ALBAREDA; CASTRO EIRO *et al.*, 2021). Além disso, a presença

de correlações entre parâmetros imunoregulatórios em populações celulares de IND podem indicar uma resposta mais regulada, como sugerimos anteriormente (MENEZES; ROCHA; SOUZA; CHAVES *et al.*, 2004).

Finalmente, ao correlacionar monócitos ativados e/ou inflamatórios (TNF- α^+ ; CD69⁺, CD69⁺TNF- α^+) com os parâmetros clínicos de função cardíaca dos pacientes CARD e IND (**Figura 25**), vimos que, de forma geral, maiores frequências de monócitos inflamatórios estão relacionadas a piores parâmetros clínicos de função cardíaca. Como já foi discutido nesse estudo, e já bem estabelecido na literatura, de fato, monócitos inflamatórios, especialmente produtores de TNF- α , são importantes agentes de lesões no miocárdio, e manutenção da inflamação no tecido cardíaco. É sabido também que maiores taxas de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β ,IL-6) estão intimamente relacionadas a arritmias ventriculares, logo essas correlações eram esperadas (CHEN; LI; WANG; YU *et al.*, 2020; FELDMAN; COMBES; WAGNER; KADAKOMI *et al.*, 2000; LANNES-VIEIRA; PEREIRA; VINAGRE; ARNEZ, 2011).

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, nosso estudo demonstrou que monócitos dos pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da DC apresentam diferenças fenotípicas e funcionais, considerando-se os marcadores utilizados. Essas diferenças somadas à outras condições imunológicas podem ser determinantes para a polarização da forma clínica sintomática cardíaca ou assintomática da doença.

Além disso, pudemos concluir também que, de fato, a expressão das isoformas da família CD1 são expressas de maneira heterogênea nos monócitos de pacientes com as diferentes formas clínicas, tal informação ainda não era descrita no contexto da DC, e pode ajudar a compreender como a apresentação de antígenos de origem lipídica e glicolipídica, abundantemente presentes na membrana do *T. cruzi*, pode ter efeitos na manutenção do equilíbrio parasito / hospedeiro, ou manter a inflamação durante o curso da doença.

Por fim, considerando os dados produzidos nesse estudo, e embasados pela literatura, sugerimos que a apresentação de antígenos não-convencional pode ter efeitos importantes no contexto da DC, por estar associado à ativação de células T atípicas. Ainda assim, mais estudos com as células T DN para entender o seu papel efetor, mediante a ativação por CD1 se fazem necessários para melhor compreensão dos mecanismos de resposta imunológica associados.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo podemos entender que as diferenças na natureza dos antígenos influenciam na apresentação pelos monócitos para as distintas populações de células T DN. Conseqüentemente, como resultado tem-se diferentes capacidades de desencadear respostas imunológicas, que estão possivelmente associadas aos sinais e sintomas observados nas formas clínicas da DC. Podemos também inferir que as células T DN reativas às isoformas de CD1 podem desempenhar um papel crítico no fornecimento de instruções no amadurecimento de células apresentadoras de antígeno durante a resposta imunológica, e conseqüentemente influenciar a resposta adaptativa subsequente, inclusive na resposta de células T restritas ao MHC.

O estudo da apresentação de antígenos via CD1 para as diferentes populações de células T CD1-reativas, inclusive as células T DN, pode ajudar a entender as conseqüências de uma resposta inata imediata e uma resposta adaptativa tardia contra *T. cruzi*, e como os diversos eventos imunológicos podem resultar em desfechos clínicos tão diferentes.

Descrever a natureza precisa dos antígenos que são apresentados via CD1, sua ligação e restrição ao TCR também será de fundamental importância para distinguir antígenos específicos e mais imunogênicos, para a partir daí se pensar em alternativas de alvos terapêuticos ou de intervenção.

Inclusive, norteando pesquisas de possíveis alvos terapêuticos, Kawasaki e colegas tem demonstrado uma incrível potencialidade no uso de nanopartículas lipossomais direcionadas para células dendríticas CD1b⁺ derivadas de monócitos carregadas com antígenos glicolipídicos de micobactérias, aumentando a eficiência na ativação de células T (KAWASAKI; RILLAHAN; CHENG; VAN RHIJN *et al.*, 2014) ou mesmo o uso de tetrâmeros de CD1 carregado com antígenos lipídicos tem dado resultados promissores para seu uso em vacinação para tuberculose (LAYTON; YU; SMITH; SCRIBA *et al.*, 2018).

É preciso esclarecer ainda que, embora parte da discussão acerca dos mecanismos de apresentação via CD1 e sua associação com a ativação de diferentes células T DN seja especulativa, devido às limitações na produção de dados experimentais no presente estudo, as interpretações propostas estão embasadas em publicações recentes disponíveis na literatura.

Além disso, produzimos dados que conduzem à elaboração de novas hipóteses e que abrem novas perspectivas para estudos futuros.

Concluimos que, nessa linha, este estudo traz informações iniciais e inéditas para o entendimento das vias alternativas de ativação da resposta imunológica, e como as formas

não-clássicas de apresentação no contexto da doença de Chagas podem contribuir para o encaminhamento de eventos imunológicos que culminarão em distintas formas da doença observadas na clínica. Aprofundar o entendimento dos antígenos, isoformas de CD1 e subpopulações de células T envolvidos pode ser um passo a mais parecer da complexa interação parasito-hospedeiro, observada na doença de Chagas, e quem sabe, contribuir com novos alvos de intervenção terapêutica.

10. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, 84, n. 2, p. 231-244, Nov 1996.

ADAMS, E. J. Diverse antigen presentation by the Group 1 CD1 molecule, CD1c. **Mol Immunol**, 55, n. 2, p. 182-185, Sep 2013.

ALBA SOTO, C. D.; MIRKIN, G. A.; SOLANA, M. E.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect Immun**, 71, n. 3, p. 1194-1199, Mar 2003.

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S. *et al.* Highly purified glycosylphosphatidylinositols from Trypanosoma cruzi are potent proinflammatory agents. **EMBO J**, 19, n. 7, p. 1476-1485, Apr 03 2000.

ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of Trypanosoma cruzi. **Biochem J**, 304 (Pt 3), p. 793-802, Dec 1994.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol**, 70, n. 4, p. 467-477, Oct 2001.

ANDRADE, J. P.; MARIN NETO, J. A.; PAOLA, A. A.; VILAS-BOAS, F. *et al.* I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arq Bras Cardiol**, 96, n. 6, p. 434-442, Jun 2011.

ANGÉNIEUX, C.; FRAISIER, V.; MAÎTRE, B.; RACINE, V. *et al.* The cellular pathway of CD1e in immature and maturing dendritic cells. **Traffic**, 6, n. 4, p. 286-302, Apr 2005.

ARGÜELLO, R. J.; ALBAREDA, M. C.; ALVAREZ, M. G.; BERTOCCHI, G. *et al.* Inhibitory receptors are expressed by Trypanosoma cruzi-specific effector T cells and in hearts of subjects with chronic Chagas disease. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e35966, 2012.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C. *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, 177, n. 6, p. 3515-3519, Sep 2006.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; KEANE, J.; KORNFELD, H.; REMOLD, H. G. Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. **J Immunol**, 161, n. 5, p. 2636-2641, Sep 1998.

BARISIONE, C.; GARIBALDI, S.; GHIGLIOTTI, G.; FABBI, P. *et al.* CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. **Dis Markers**, 28, n. 2, p. 115-124, 2010.

BARRAL, D. C.; BRENNER, M. B. CD1 antigen presentation: how it works. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 12, p. 929-941, Dec 2007.

BARRY, M. A.; VERSTEEG, L.; WANG, Q.; POLLET, J. *et al.* A therapeutic vaccine prototype induces protective immunity and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 5, p. e0007413, 05 2019.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The biology of NKT cells. **Annu Rev Immunol**, 25, p. 297-336, 2007.

BENTO, C. A.; MELO, M. B.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. *et al.* Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. **J Immunol**, 157, n. 11, p. 4996-5001, Dec 1996.

BESTETTI, R. B.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; LOPES, G. S.; FARIA-JR, M. *et al.* Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg cytokine profile in patients with chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension. **Heart Vessels**, 34, n. 1, p. 123-133, Jan 2019.

BOURGEOIS, E. A.; SUBRAMANIAM, S.; CHENG, T. Y.; DE JONG, A. *et al.* Bee venom processes human skin lipids for presentation by CD1a. **J Exp Med**, 212, n. 2, p. 149-163, Feb 09 2015.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 6, p. 362-374, Jun 2015.

BRIGL, M.; BRENNER, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annu Rev Immunol**, 22, p. 817-890, 2004.

BRODSKYN, C.; PATRICIO, J.; OLIVEIRA, R.; LOBO, L. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infect Immun**, 70, n. 7, p. 3736-3743, Jul 2002.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; DI NOIA, J. M.; TORRECILHAS, A. C. *et al.* The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. **J Biol Chem**, 279, n. 16, p. 15860-15869, Apr 2004.

CAO, X.; SUGITA, M.; VAN DER WEL, N.; LAI, J. *et al.* CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. **J Immunol**, 169, n. 9, p. 4770-4777, Nov 01 2002.

CARDILLO, F.; DE PINHO, R. T.; ANTAS, P. R.; MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathog Dis**, 73, n. 9, p. ftv082, Dec 2015.

CARDING, S. R.; EGAN, P. J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 5, p. 336-345, May 2002.

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

CARRILLO-SALINAS, F. J.; NGWENYAMA, N.; ANASTASIOU, M.; KAUR, K. *et al.* Heart Inflammation: Immune Cell Roles and Roads to the Heart. **Am J Pathol**, 189, n. 8, p. 1482-1494, 08 2019.

CERÁVOLO, I. P.; CHAVES, A. C.; BONJARDIM, C. A.; SIBLEY, D. *et al.* Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. **Infect Immun**, 67, n. 5, p. 2233-2240, May 1999.

CHAVES, A. T.; DE ASSIS SILVA GOMES ESTANISLAU, J.; FIUZA, J. A.; CARVALHO, A. T. *et al.* Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC Infect Dis**, 16, p. 191, Apr 2016.

CHEN, M.; LI, X.; WANG, S.; YU, L. *et al.* The Role of Cardiac Macrophage and Cytokines on Ventricular Arrhythmias. **Front Physiol**, 11, p. 1113, 2020.

CORDEIRO, F. D.; MARTINS-FILHO, O. A.; DA COSTA ROCHA, M. O.; ADAD, S. J. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. **Clin Diagn Lab Immunol**, 8, n. 1, p. 112-118, Jan 2001.

COSTA, G. C.; DA COSTA ROCHA, M. O.; MOREIRA, P. R.; MENEZES, C. A. *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J Infect Dis**, 199, n. 3, p. 451-454, Feb 2009.

COTTON, R. N.; WEGRECKI, M.; CHENG, T. Y.; CHEN, Y. L. *et al.* CD1a selectively captures endogenous cellular lipids that broadly block T cell response. **J Exp Med**, 218, n. 7, 07 05 2021.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102 Suppl 1, p. 113-122, Oct 2007.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, n. 2, p. 145-154, Mar 2012.

CRUZ, J. S.; MACHADO, F. S.; ROPERT, C.; ROMAN-CAMPOS, D. Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β . **Trends Cardiovasc Med**, 27, n. 2, p. 81-91, 02 2017.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm**, 2014, p. 683230, 2014.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B. *et al.* Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope

crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 8, p. 3541-3545, Apr 11 1995.

DASCHER, C. C.; BRENNER, M. B. CD1 antigen presentation and infectious disease. **Contrib Microbiol**, 10, p. 164-182, 2003.

DE OLIVEIRA, G. M.; DINIZ, R. L.; BATISTA, W.; BATISTA, M. M. *et al.* Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, 171, n. 1, p. 79-86, Jul 2007.

DENDROU, C. A.; PETERSEN, J.; ROSSJOHN, J.; FUGGER, L. HLA variation and disease. **Nat Rev Immunol**, 18, n. 5, p. 325-339, 05 2018.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L.; MATLASHEWSKI, G. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. **J Immunol**, 146, n. 8, p. 2747-2753, Apr 1991.

DIAS, F. C.; MEDINA, T. A. S.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DANTAS, R. O. *et al.* Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic chagas disease and its clinical manifestations. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e78367, 2013.

DIAS, J. C.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A. *et al.* [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. **Epidemiol Serv Saude**, 25, n. spe, p. 7-86, 06 2016.

DONOVAN, M. J.; JAYAKUMAR, A.; MCDOWELL, M. A. Inhibition of groups 1 and 2 CD1 molecules on human dendritic cells by *Leishmania* species. **Parasite Immunol**, 29, n. 10, p. 515-524, Oct 2007.

DOUGAN, S. K.; KASER, A.; BLUMBERG, R. S. CD1 expression on antigen-presenting cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, 314, p. 113-141, 2007.

EXLEY, M.; GARCIA, J.; WILSON, S. B.; SPADA, F. *et al.* CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. **Immunology**, 100, n. 1, p. 37-47, May 2000.

FELDMAN, A. M.; COMBES, A.; WAGNER, D.; KADAKOMI, T. *et al.* The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. **J Am Coll Cardiol**, 35, n. 3, p. 537-544, Mar 2000.

FELIO, K.; NGUYEN, H.; DASCHER, C. C.; CHOI, H. J. *et al.* CD1-restricted adaptive immune responses to *Mycobacteria* in human group 1 CD1 transgenic mice. **J Exp Med**, 206, n. 11, p. 2497-2509, Oct 26 2009.

FISHER, G. H.; ROSENBERG, F. J.; STRAUS, S. E.; DALE, J. K. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. **Cell**, 81, n. 6, p. 935-946, Jun 1995.

FLÁVIA NARDY, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol Res**, 2015, p. 178947, 2015.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T. *et al.* Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, 403, n. 6766, p. 199-203, Jan 13 2000.

GAPIN, L. CD1a autoreactivity: When size does matter. **J Exp Med**, 218, n. 7, 07 05 2021.

GIBALDI, D.; VILAR-PEREIRA, G.; PEREIRA, I. R.; SILVA, A. A. *et al.* CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1 α Is Dually Involved in Parasite Persistence and Induction of a TNF- and IFN γ -Enriched Inflammatory Milieu in. **Front Immunol**, 11, p. 306, 2020.

GIORDANENGO, L.; GUIÑAZÚ, N.; STEMPIN, C.; FRETES, R. *et al.* Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. **Eur J Immunol**, 32, n. 4, p. 1003-1011, 04 2002.

GIORGI, M. E.; DE LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydr Res**, 346, n. 12, p. 1389-1393, Sep 2011.

GIRALDO, N. A.; BOLAÑOS, N. I.; CUELLAR, A.; ROA, N. *et al.* T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3 ζ . **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 1, p. e2038, 2013.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, 71, n. 3, p. 1185-1193, Mar 2003.

GOMES, N. A.; PREVIATO, J. O.; ZINGALES, B.; MENDONÇA-PREVIATO, L. *et al.* Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. **J Immunol**, 156, n. 2, p. 628-635, Jan 1996.

GONÇALES, R. A.; SALAMANCA, A. L.; JÚNIOR, L. R.; E SILVA, K. S. *et al.* identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in. **Future Microbiol**, 16, p. 589-606, May 2021.

GRABIE, N.; GOTSMAN, I.; DACOSTA, R.; PANG, H. *et al.* Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8⁺ T-cell mediated injury in the heart. **Circulation**, 116, n. 18, p. 2062-2071, Oct 2007.

GRAS, S.; VAN RHIJN, I.; SHAHINE, A.; CHENG, T. Y. *et al.* T cell receptor recognition of CD1b presenting a mycobacterial glycolipid. **Nat Commun**, 7, p. 13257, 10 2016.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. **J Lipid Res**, 46, n. 1, p. 11-20, Jan 2005.

GREGORY, S.; ZILBER, M.; CHARRON, D.; GELIN, C. Human CD1a molecule expressed on monocytes plays an accessory role in the superantigen-induced activation of T lymphocytes. **Hum Immunol**, 61, n. 3, p. 193-201, Mar 2000.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Semin Diagn Pathol**, Apr 2019.

GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, S. R.; COLLEY, D. G. *et al.* Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **Am J Trop Med Hyg**, 65, n. 2, p. 152-158, Aug 2001.

GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, G. K.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R. *et al.* Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GÓMEZ-OLARTE, S.; BOLAÑOS, N. I.; ECHEVERRY, M.; RODRÍGUEZ, A. N. *et al.* Intermediate Monocytes and Cytokine Production Associated With Severe Forms of Chagas Disease. **Front Immunol**, 10, p. 1671, 2019.

HAIG, N. A.; GUAN, Z.; LI, D.; MCMICHAEL, A. *et al.* Identification of self-lipids presented by CD1c and CD1d proteins. **J Biol Chem**, 286, n. 43, p. 37692-37701, Oct 2011.

HAMAD, A. R.; SRIKRISHNAN, A.; MIRMONSEF, P.; BROEREN, C. P. *et al.* Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. **J Exp Med**, 193, n. 10, p. 1113-1121, May 21 2001.

HIGUCHI, M. E. L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, 60, n. 1, p. 96-107, Oct 2003.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J. *et al.* Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med**, 357, n. 10, p. 1018-1027, Sep 2007.

HUYNH, L.; KUSNADI, A.; PARK, S. H.; MURATA, K. *et al.* Opposing regulation of the late phase TNF response by mTORC1-IL-10 signaling and hypoxia in human macrophages. **Sci Rep**, 6, p. 31959, 08 25 2016.

J, B.; M, B. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases-Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Front Chem**, 9, p. 622286, 2021.

JABBOUR, M. N.; ISSA, G.; CHARAFEDDINE, K.; SIMAAN, Y. *et al.* The immune microenvironment in cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 29, n. 6, p. 1170-1179, Jun 2015.

JUNG, M.; MA, Y.; IYER, R. P.; DELEON-PENNELL, K. Y. *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. **Basic Res Cardiol**, 112, n. 3, p. 33, 05 2017.

KAWASAKI, N.; RILLAHAN, C. D.; CHENG, T. Y.; VAN RHIJN, I. *et al.* Targeted delivery of mycobacterial antigens to human dendritic cells via Siglec-7 induces robust T cell activation. **J Immunol**, 193, n. 4, p. 1560-1566, Aug 15 2014.

KROLL-PALHARES, K.; SILVÉRIO, J. C.; SILVA, A. A.; MICHAILOWSKY, V. *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8⁺ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103, n. 4, p. 375-385, Jun 2008.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, 16 Suppl 1, p. 13-34, Jul 2009.

LA FLAMME, A. C.; KAHN, S. J.; RUDENSKY, A. Y.; VAN VOORHIS, W. C. *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. **Eur J Immunol**, 27, n. 12, p. 3085-3094, Dec 1997.

LANNES-VIEIRA, J.; PEREIRA, I. R.; VINAGRE, N. F.; ARNEZ, L. E. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. **Adv Exp Med Biol**, 691, p. 221-230, 2011.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C.; NITZ, N. *et al.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **Am J Trop Med Hyg**, 63, n. 3-4, p. 111-118, 2000 Sep-Oct 2000.

LAYTON, E. D.; YU, K. K. Q.; SMITH, M. T.; SCRIBA, T. J. *et al.* Validation of a CD1b tetramer assay for studies of human mycobacterial infection or vaccination. **J Immunol Methods**, 458, p. 44-52, 07 2018.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Dis**, 13, n. 4, p. 342-348, Apr 2013.

LONGHI, S. A.; ATIENZA, A.; PEREZ PRADOS, G.; BUYING, A. *et al.* Cytokine production but lack of proliferation in peripheral blood mononuclear cells from chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients in response to *T. cruzi* ribosomal P proteins. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 6, p. e2906, Jun 2014.

LOUIE, M. J.; CUNA, W. R.; RODRIGUEZ DE CUNA, C.; MAYER, L. *et al.* Impairment of monocytic function during *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, 1, n. 6, p. 707-713, Nov 1994.

LUOMA, A. M.; CASTRO, C. D.; ADAMS, E. J. $\gamma\delta$ T cell surveillance via CD1 molecules. **Trends Immunol**, 35, n. 12, p. 613-621, 12 2014.

MAGALHÃES, L. M.; VILLANI, F. N.; NUNES, M. O. C.; GOLLOB, K. J. *et al.* High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **J Infect Dis**, 207, n. 4, p. 661-665, Feb 2013.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **Am J Med**, 128, n. 11, p. 1251.e1257-1259, Nov 2015.

MAÎTRE, B.; ANGÉNIEUX, C.; SALAMERO, J.; HANAU, D. *et al.* Control of the intracellular pathway of CD1e. **Traffic**, 9, n. 4, p. 431-445, Apr 2008.

MCMICHAEL, A. J.; PILCH, J. R.; GALFRÉ, G.; MASON, D. Y. *et al.* A human thymocyte antigen defined by a hybrid myeloma monoclonal antibody. **Eur J Immunol**, 9, n. 3, p. 205-210, Mar 1979.

MEDINA-BUELVAS, D. M.; RODRÍGUEZ-SOSA, M.; VEGA, L. Characterisation of Macrophage Polarisation in Mice Infected with Ninoa Strain of. **Pathogens**, 10, n. 11, Nov 06 2021.

MEIRA, C. S.; SANTOS, E. S.; SANTO, R. F. D. E.; VASCONCELOS, J. F. *et al.* Betulinic Acid Derivative BA5, Attenuates Inflammation and Fibrosis in Experimental Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy by Inducing IL-10 and M2 Polarization. **Front Immunol**, 10, p. 1257, 2019.

MENEZES, C.; COSTA, G. C.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug Dev Res**, 72, n. 6, p. 471-479, Sep 2011.

MENEZES, C. A.; ROCHA, M. O.; SOUZA, P. E.; CHAVES, A. C. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clin Exp Immunol**, 137, n. 1, p. 129-138, Jul 2004.

MILLAR, A. E.; WLEKLINSKI-LEE, M.; KAHN, S. J. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. **J Immunol**, 162, n. 10, p. 6092-6099, May 15 1999.

MOODY, D. B.; BRIKEN, V.; CHENG, T. Y.; ROURA-MIR, C. *et al.* Lipid length controls antigen entry into endosomal and nonendosomal pathways for CD1b presentation. **Nat Immunol**, 3, n. 5, p. 435-442, May 2002.

MOODY, D. B.; YOUNG, D. C.; CHENG, T. Y.; ROSAT, J. P. *et al.* T cell activation by lipopeptide antigens. **Science**, 303, n. 5657, p. 527-531, Jan 23 2004.

MORATO, M. J.; BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; NUNES, R. M. *et al.* Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. **Am J Trop Med Hyg**, 35, n. 3, p. 505-511, May 1986.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, 373, n. 14, p. 1295-1306, 10 2015.

MYLONAS, K. J.; JENKINS, S. J.; CASTELLAN, R. F.; RUCKERL, D. *et al.* The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an 'M2' phenotype in response to Th2 immunologic challenge. **Immunobiology**, 220, n. 7, p. 924-933, Jul 2015.

NARASIMHAN, P. B.; MARCOVECCHIO, P.; HAMERS, A. A. J.; HEDRICK, C. C. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. **Annu Rev Immunol**, 37, p. 439-456, 04 26 2019.

NATALE, M. A.; MINNING, T.; ALBAREDA, M. C.; CASTRO EIRO, M. D. *et al.* Immune exhaustion in chronic Chagas disease: Pro-inflammatory and immunomodulatory action of IL-27 in vitro. **PLoS Negl Trop Dis**, 15, n. 6, p. e0009473, 06 2021.

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, 62, n. 9, p. 767-776, Aug 2013.

ODYNIEC, A. N.; BARRAL, D. C.; GARG, S.; TATITURI, R. V. *et al.* Regulation of CD1 antigen-presenting complex stability. **J Biol Chem**, 285, n. 16, p. 11937-11947, Apr 16 2010.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; DE ARRUDA, L. B.; CAMPOS, M. A. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J Immunol**, 173, n. 9, p. 5688-5696, Nov 01 2004.

PASSOS, L. S.; VILLANI, F. N.; MAGALHÃES, L. M.; GOLLOB, K. J. *et al.* Blocking of CD1d Decreases *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of CD4-CD8- T Cells and Modulates the Inflammatory Response in Patients With Chagas Heart Disease. **J Infect Dis**, 214, n. 6, p. 935-944, 09 2016.

PASSOS, L. S. A.; MAGALHÃES, L. M. D.; SOARES, R. P.; MARQUES, A. F. *et al.* Specific activation of CD4. **Clin Exp Immunol**, 190, n. 1, p. 122-132, 10 2017.

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 19, n. 1, p. 34, Dec 2013.

PIERALISI, A. V.; CEVEY, Á.; PENAS, F. N.; PRADO, N. *et al.* Fenofibrate Increases the Population of Non-Classical Monocytes in Asymptomatic Chagas Disease Patients and Modulates Inflammatory Cytokines in PBMC. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 785166, 2021.

PINTO, B. F.; MEDEIROS, N. I.; FONTES-CAL, T. C. M.; NAZIAZENO, I. M. *et al.* The Role of Co-Stimulatory Molecules in Chagas Disease. **Cells**, 7, n. 11, Nov 2018.

PINTO, B. F.; MEDEIROS, N. I.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELOI-SANTOS, S. M. *et al.* CD86 Expression by Monocytes Influences an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Front Immunol**, 9, p. 454, 2018.

PISSETTI, C. W.; CORREIA, D.; DE OLIVEIRA, R. F.; LLAGUNO, M. M. *et al.* Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 5, n. 3, p. e976, Mar 2011.

PORCELLI, S.; MORITA, C. T.; BRENNER, M. B. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. **Nature**, 360, n. 6404, p. 593-597, Dec 1992.

PORCELLI, S. A. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. **Adv Immunol**, 59, p. 1-98, 1995.

PORCELLI, S. A.; MODLIN, R. L. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. **Annu Rev Immunol**, 17, p. 297-329, 1999.

PROCÓPIO, D. O.; ALMEIDA, I. C.; TORRECILHAS, A. C.; CARDOSO, J. E. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKT cell pathway. **J Immunol**, 169, n. 7, p. 3926-3933, Oct 2002.

PÉREZ-MAZLIAH, D. E.; CASTRO EIRO, M. D.; ÁLVAREZ, M. G.; LOCOCO, B. *et al.* Distinct monocyte subset phenotypes in patients with different clinical forms of chronic Chagas disease and seronegative dilated cardiomyopathy. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 10, p. e0006887, 10 2018.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, 391, n. 10115, p. 82-94, 01 2018.

RADA, J.; DONATO, M.; PENAS, F. N.; ALBA SOTO, C. *et al.* IL-10-Dependent and -Independent Mechanisms Are Involved in the Cardiac Pathology Modulation Mediated by Fenofibrate in an Experimental Model of Chagas Heart Disease. **Front Immunol**, 11, p. 572178, 2020.

RASSI, A.; MARIN, J. A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 112, n. 3, p. 224-235, Mar 2017.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S.; LOPES, E. R. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, 48, n. 5, p. 637-644, May 1993.

RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, 9, n. 10, p. 576-589, Oct 2012.

RIBEIRO, S. M.; MORCELI, J.; GONÇALVES, R. S.; FRANCO, R. J. *et al.* Accuracy of chest radiography plus electrocardiogram in diagnosis of hypertrophy in hypertension. **Arq Bras Cardiol**, 99, n. 3, p. 825-833, Sep 2012.

RODRIGUES, V.; AGRELLI, G. S.; LEON, S. C.; SILVA TEIXEIRA, D. N. *et al.* Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. **Microbes Infect**, 10, n. 1, p. 29-37, Jan 2008.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. E. N.; LANNES-VIEIRA, J. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 105, n. 2, p. 233-238, Mar 2010.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, 3, n. 4, p. 395-403, Aug 2000.

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, 30, n. 3, p. 335-340, Mar 1991.

ROY, S.; LY, D.; LI, N. S.; ALTMAN, J. D. *et al.* Molecular basis of mycobacterial lipid antigen presentation by CD1c and its recognition by $\alpha\beta$ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 43, p. E4648-4657, Oct 2014.

SAFI, M.; AHMED, H.; AL-AZAB, M.; XIA, Y. L. *et al.* PD-1/PDL-1 Inhibitors and Cardiotoxicity; Molecular, Etiological and Management Outlines. **J Adv Res**, 29, p. 45-54, 03 2021.

SALIO, M.; SILK, J. D.; JONES, E. Y.; CERUNDOLO, V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. **Annu Rev Immunol**, 32, p. 323-366, 2014.

SANMARCO, L. M.; EBERHARDT, N.; PONCE, N. E.; CANO, R. C. *et al.* New Insights into the Immunobiology of Mononuclear Phagocytic Cells and Their Relevance to the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. **Front Immunol**, 8, p. 1921, 2017.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L.; DE LANA, M. *et al.* Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes Infect**, 10, n. 2, p. 103-113, Feb 2008.

SCHOFIELD, L.; MCCONVILLE, M. J.; HANSEN, D.; CAMPBELL, A. S. *et al.* CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. **Science**, 283, n. 5399, p. 225-229, Jan 1999.

SIEGMUND, D.; KUMS, J.; EHRENSCHWENDER, M.; WAJANT, H. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. **Cell Death Dis**, 7, n. 9, p. e2375, 09 2016.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, 63, n. 12, p. 4862-4867, Dec 1995.

SILVA, W. T.; COSTA, H. S.; LIMA, V. P.; XAVIER, D. M. *et al.* Plasma levels of soluble TNF receptors are associated with cardiac function in patients with Chagas heart disease. **Int J Cardiol**, 316, p. 101-103, 10 2020.

SOARES, A. K.; NEVES, P. A.; CAVALCANTI, M. D.; MARINHO, S. M. *et al.* 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, n. 5, p. 632-636, 2016 Sep-Oct 2016.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C. A. *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, 72, n. 9, p. 5283-5291, Sep 2004.

SPADA, F. M.; BORRIELLO, F.; SUGITA, M.; WATTS, G. F. *et al.* Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. **Eur J Immunol**, 30, n. 12, p. 3468-3477, Dec 2000.

SPADA, F. M.; GRANT, E. P.; PETERS, P. J.; SUGITA, M. *et al.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. **J Exp Med**, 191, n. 6, p. 937-948, Mar 20 2000.

SUGITA, M.; GRANT, E. P.; VAN DONSELAAR, E.; HSU, V. W. *et al.* Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. **Immunity**, 11, n. 6, p. 743-752, Dec 1999.

TAHIR, S.; STEFFENS, S. Nonclassical monocytes in cardiovascular physiology and disease. **Am J Physiol Cell Physiol**, 320, n. 5, p. C761-C770, 05 01 2021.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. **Adv Parasitol**, 76, p. 171-194, 2011.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L. H. Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol**, 8, n. 1, p. 13-22, Jan 1996.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C. *et al.* Chagas disease. **Postgrad Med J**, 82, n. 974, p. 788-798, Dec 2006.

TEYTON, L. Role of lipid transfer proteins in loading CD1 antigen-presenting molecules. **J Lipid Res**, 59, n. 8, p. 1367-1373, 08 2018.

TOSTES, S.; BERTULUCCI ROCHA-RODRIGUES, D.; DE ARAUJO PEREIRA, G.; RODRIGUES, V. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. **Int J Cardiol**, 99, n. 2, p. 233-237, Mar 2005.

VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J. *et al.* Trypanosoma cruzi infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect Immun**, 67, n. 8, p. 4033-4040, Aug 1999.

VAN RHIJN, I.; YOUNG, D. C.; DE JONG, A.; VAZQUEZ, J. *et al.* CD1c bypasses lysosomes to present a lipopeptide antigen with 12 amino acids. **J Exp Med**, 206, n. 6, p. 1409-1422, Jun 08 2009.

VELGE, P.; KUSNIERZ, J. P.; OUAISSI, A.; MARTY, B. *et al.* Trypanosoma cruzi: infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **Eur J Immunol**, 21, n. 9, p. 2145-2152, Sep 1991.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of Trypanosoma cruzi: uptake and mechanism of destruction. **J Immunol**, 133, n. 6, p. 3338-3343, Dec 1984.

VILLANI, F. N.; ROCHA, M. O.; NUNES, M. O. C.; ANTONELLI, L. R. *et al.* Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. **Infect Immun**, 78, n. 10, p. 4421-4430, Oct 2010.

VINCENT, M. S.; XIONG, X.; GRANT, E. P.; PENG, W. *et al.* CD1a-, b-, and c-restricted TCRs recognize both self and foreign antigens. **J Immunol**, 175, n. 10, p. 6344-6351, Nov 2005.

WOLK, K.; KUNZ, S.; WITTE, E.; FRIEDRICH, M. *et al.* IL-22 increases the innate immunity of tissues. **Immunity**, 21, n. 2, p. 241-254, Aug 2004.

WRIGLEY, B. J.; LIP, G. Y.; SHANTSILA, E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. **Eur J Heart Fail**, 13, n. 11, p. 1161-1171, Nov 2011.

YUE, S. C.; SHAULOV, A.; WANG, R.; BALK, S. P. *et al.* CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF-kappaB activation and production of bioactive IL-12. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 33, p. 11811-11816, Aug 2005.

World Health Organization. (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. **World Health Organization**.

12. ANEXO

REVIEW

Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression

Teresiama Velikkakam^{1,2} | Kenneth J. Gollob^{3,4} | Walderez Ornelas Dutra^{1,2,4} 

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Walderez Ornelas Dutra, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Email: waldutra@gmail.com

Senior author: Walderez Ornelas Dutra.

Funding information

TV, KJG and WOD are CNPq fellows.

Abstract

Double-negative (DN) T cells are present at relatively low frequencies in human peripheral blood, and are characterized as expressing the alpha-beta or gamma-delta T-cell receptor (TCR), but not the CD4 nor the CD8 co-receptors. Despite their low frequencies, these cells are potent producers of cytokines and, thus, are key orchestrators of immune responses. DN T cells were initially associated with induction of peripheral immunological tolerance and immunomodulatory activities related to disease prevention. However, other studies demonstrated that these cells can also display effector functions associated with pathology development. This apparent contradiction highlighted the heterogeneity of the DN T-cell population. Here, we review phenotypic and functional characteristics of DN T cells, emphasizing their role in human diseases. The need for developing biomarkers to facilitate the translation of studies from animal models to humans will also be discussed. Finally, we will examine DN T cells as promising therapeutic targets to prevent or inhibit human disease development.

KEYWORDS

cancer, double-negative T cells, immunoregulation, inflammatory diseases, parasitic diseases

ONTOGENY AND THE ORIGIN OF DN T CELLS

Double-negative (DN) T cells are a unique lymphocyte population that lack the CD4 and CD8 co-receptors. Like all T lymphocytes, they express the T-cell receptor (TCR) alpha-beta ($\alpha\beta$) or gamma-delta ($\gamma\delta$) chains, which enables them to recognize and further respond to pathogens, mounting a functional adaptive immune response [1,2]. DN T-cell subpopulations may display diverse or conserved antigen-recognition properties, provided by their TCR. TCR- $\alpha\beta$ + or TCR- $\gamma\delta$ + DN T cells have differential expression of other surface markers, cytokines and

chemokines, contributing to their diverse immune functions [3–6].

Despite recent efforts, the precise origin of human DN T cells remains somewhat unclear and poorly understood [7]. There is evidence that DN T cells can be derived from both the thymic and peripheral environments [8,9], suggesting distinct differentiation pathways for the generation of DN T cells.

The ontogeny of thymus-derived DN T cells occurs in an orderly manner initiating from bone marrow progenitors. Immature thymocytes derived from bone marrow precursors that do not express CD4 nor CD8 (double negative, DN) can be subdivided into four distinct stages in

mice (DN1–DN4) based on the expression of CD44 and CD25, or three distinct DN stages in humans (DN1–DN3) [10,11]. Figure 1 compares the maturation and development stages of T lymphocytes in mice and humans, where the distinct phenotypes, including DN T cells, can be generated.

The presence of DN T cells in peripheral blood can be explained by a possible escape from negative selection in the thymus, and subsequent activation and expansion in the periphery [12,13]. However, alternative thymus-independent mechanisms of DN T-cell generation have

also been described [14,15]. DN T cells that displayed increased suppressive activity were observed in the spleen and lymph nodes of thymectomized and CD8-deficient mice [15]. These and other findings support the hypothesis that DN T cells may be derived from activated peripheral CD4⁺ or CD8⁺ T cells. In addition, it has been shown that DN T cells from patients with leukaemia reexpress CD4, suggesting that the transient double-negative phenotype was related to down-regulation of the CD4 molecule [16]. Accordingly, Zhang and colleagues demonstrated, in a murine model, that DN T cells with regulatory functions

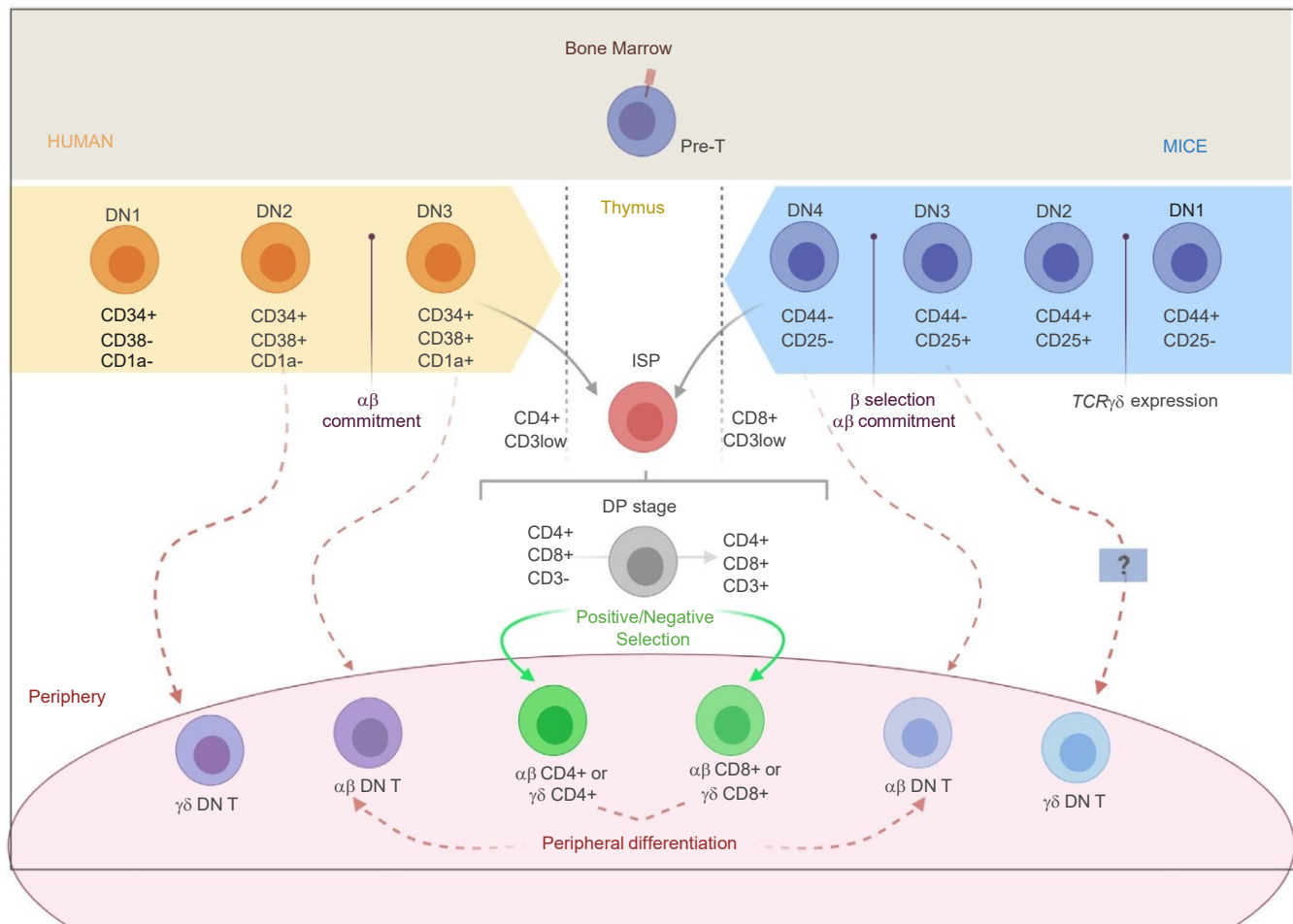


FIGURE 1 Ontogeny of T lymphocytes, highlighting the double-negative T cells. Haematopoietic stem cells become compromised with lymphoid lineage (Pre-T) in bone marrow. After leaving the bone marrow, the pre-T lymphocytes migrate to the thymus, where they will complete their development. During DN1 and DN2 stages, they start to express activation and proliferation molecules (CD44 and CD25, in mice, and CD34 and CD38, in humans). The DN3 stage is critical for defining which T-cell receptor (TCR) will be expressed. If the expression of the TCR γ and TCR δ genes occurs, the process is stopped and the lymphocytes migrate to peripheral organs, such as the intestine, as $\gamma\delta$ T lymphocytes. Alternatively, if the β chain is expressed, cells will progress to later express the α chain. These $\alpha\beta$ DN T cells may also escape to the periphery. In mice, further studies are warranted for the further development and exportation from the thymus of $\gamma\delta$ T cells after DN3 stage. After the DN4 stage, the other T-cell subpopulations pass through the immature single-positive stage (ISP), where only CD4 is expressed in humans, and only CD8 is expressed in mice. Subsequently, they express simultaneously CD4 and CD8 molecules, which characterizes the double-positive stage (DP). At this stage, after the presentation of autoantigens, lymphocytes have three fates: (1) suffer apoptosis due to negligence; (2) react strongly to anatomical factors and undergo negative selection; or (3) go through the positive selection to express either CD4 or CD8 (single positives – SP). After this process, lymphocytes can still return the double-negative phenotype, when in the periphery, under specific situations, by losing the expression of CD4 and CD8. Created with Biorender.com

TABLE 1 Functional and phenotypic characteristics of double-negative T-cell subpopulations

	NKT-I	NKT-II	DN T (inflammatory)	DN T (regulatory)	$\gamma\delta$ DN	MAIT
TCR Ontogeny Phenotypic	Invariant $\alpha\beta$ Thymic CD45RO, CD56, CD161, activation markers high	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$ Thymic/extra-thymic CD45RO, comes high, CD2 low, activation markers high	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$ Thymic/extra-thymic CD45RO, activation markers	Semi-invariant $\alpha\beta$ Thymic CD56, NKG2A CD161, CD94, CD244, tissue-homing markers
Restriction	CD1d alpha-GalCer	CD1d	MHC I and II, and CD1 molecules	MHC I and II, and CD1 molecules	MHC I and II, and CD1 molecules	MR1
Repertoire	Oligoclonal conserved	Polyclonal	Polyclonal	Polyclonal	Oligoclonal/polyclonal	Oligoclonal
Function	Inflammatory cytolytic activities or suppressive, depending on the system studied	Inflammatory cytolytic activities: IFN- γ , TNF- α , granzyme	Inflammatory cytolytic activities: IL-10, granzyme FasL	Suppressive activities: IL-10, granzyme FasL	Inflammatory cytolytic activities or suppressive, depending on the system studied	Inflammatory and effector activities: IFN- γ , TNF- α and IL-17

Note: The different colour shades identify the main DN T cell subpopulations.

could be derived from activated peripheral CD4⁺ or CD8⁺ T cells, *in vivo* and *in vitro* [17]. Grishkan and team also found that stimulation of circulating murine CD4⁺ T cells *in vitro* for long periods (3 weeks) resulted in the generation of DN T cells with an effector phenotype [18]. Moreover, it has been demonstrated that TCR stimulation transformed a subset of CD8⁺ T cells derived from healthy humans into DN T cells through the down-regulation of CD8 expression [19,20].

Working with purified CD4⁺ T cells, Zhang also demonstrated, in mice, a differentiation pathway for the conversion of peripheral CD4⁺ T cells into DN T cells *in vitro* and *in vivo*. The authors found DN T cells in cultures following stimulation of purified CD4⁺ T cells with allogenic dendritic cells (DC) and exogenous IL-2 or IL-15 for 4 days. The converted phenotype was sustained after restimulation. Moreover, the DN T cells overcame anergy and increased proliferation when co-cultured with IL-2 or IL-15, but not IL-4. They also demonstrated that DN T cells derived from CD4⁺ T cells possessed cell-surface markers and gene expression profiles that were distinct from those of CD4⁺CD25⁺ Tregs, naïve CD4⁺CD25⁻ T cells (Teffs) and activated CD4⁺ T cells. In addition, they had a high expression of perforin, a cytotoxic molecule, making them a candidate for mediating DN T-cell suppression of alloantigen-triggered CD4⁺CD25⁻ T-cell proliferation [17].

The multiple sources of DN T cells lead to populations that are phenotypically distinct, and their functional activity depends on the immunological context in which they were activated and the microenvironment where they are acting [21]. Still, it is important to note that most studies to unveil the source of DN T cells come from murine models, many of which are transgenic. Therefore, interpretation of the data in the context of humans must be undertaken with caution.

DN T-CELL SUBPOPULATIONS

In addition to peripheral blood, DN T cells may also be found in secondary lymphoid organs, and frequently in non-lymphoid organs, such as the kidney, lung, liver and intestinal epithelium [22]. Overall, DN T cells are divided into phenotypically and functionally distinct subpopulations, as shown in Table 1.

Within the NKT cell subpopulation, there is a subgroup that shows a double-negative phenotype, performing innate and adaptive immune functions (which from here on, we will refer to as DN NKT). These human DN NKT cells express surface markers such as CD16, CD56 and CD161 in addition to TCR. Differences in TCR specificity and consequently in functional activities can be observed,

further subdividing this subpopulation into DN NKT type I and II cells [23,24]. Type I NKT cells, also called invariant NKT (iNKT), express a highly conserved TCR α chain and therefore exhibit a restricted repertoire. In particular, the activation of iNKT cells occurs by antigen presentation via the CD1d molecule, and after activation, these cells can exhibit a highly cytotoxic profile. In addition, iNKT cells can respond to CD1d-presented lipid antigens within minutes by secreting a wide variety of cytokines [25,26]. Both mice and human iNKT cells recognize the marine sponge glycolipid, α -GalCer presented by CD1d [27]. The few β chain domains that pair with V α 24J α 18 to compose the TCR also contribute to the restricted repertoire observed in this subpopulation. On the contrary, type II NKT subgroup does not react with α -GalCer, but can be activated by various lipids, including self-lipids expressed in the central nervous system, kidneys, pancreas and liver [28]. NKT types I and II have been associated with autoimmune and infectious diseases [29], as we will discuss in the section below.

The TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells can be divided into subpopulations that are functionally distinct, presenting inflammatory or anti-inflammatory activities. In mice, a population of TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells has been associated with autoimmune diseases and often displays a pro-inflammatory profile [30]. These cells express polyclonal $\alpha\beta$ TCR repertoires, but do not express natural killer (NK) cell markers (CD56, CD16) nor classical markers of regulatory T cells, such as FOXP3, CD25, or CTLA-4, and low or even absent expression of the surface costimulatory molecule CD28 [31]. The lack of or low expression of CD28 is classically associated with antigen experience and differentiation in CD4 $^+$ or CD8 $^+$ T cells [32], and is also observed in DN T cells. This subpopulation of peripheral CD28 $^-$ TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells can also exhibit a low content of TCR excision circles (TRECs) as compared to CD4 $^+$ or CD8 $^+$ cells [31], which may indicate that they have a longer proliferative history than CD4 or CD8 $^+$ T cells. A recent study by Li and colleagues showed an increase in TRECs in DN T cells in experimental lupus [33]. In addition, DN T cells display high expression of the inhibitory molecule of programmed cell death protein (PD-1). Rodriguez-Rodriguez et al. demonstrated that PD-1 expression characterized a subset of murine DN T cells with expression of activation markers and a phenotype that strongly suggests they are derived from self-reactive CD8 $^+$ T cells. Moreover, they found that, within DN T cells, the PD-1-expressing subset generates the majority of pro-inflammatory cytokines [34]. Crispín et al. also observed that the pool of TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells is maintained or extended by *de novo* generation of DN T cells from CD8 $^+$ T lymphocytes. These DN cells derived *in vitro* from CD8 $^+$ T cells produce a defined array of pro-inflammatory mediators that includes IL-1 β ,

IL-17, IFN- γ , CXCL3 and CXCL2 [20]. Finally, the same research group pointed out that, in fact, PD-1 and Helios, another inhibitor molecule, are markers of TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells that are derived from self-reactive CD8 $^+$ T cells [35].

TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells have also been linked to regulatory functions. Zhang and colleagues were the first to identify and characterize antigen-specific DN Treg cells and showed that they can regulate immune responses to alloantigens *in vitro* and *in vivo*, and can specifically kill activated syngeneic CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells [36]. Ford et al. demonstrated that CD8-deficient mice displayed functional regulatory DN T cells. Nevertheless, they also observed a reduction in the number of DN T cells in reconstituted thymectomized mice compared with those in non-thymectomized mice. Interestingly, DN T cells from thymectomized mice showed increased suppressive activity compared with those that develop in sham-thymectomized mice [15,37]. Voelkl et al., in their human cancer studies, also characterized a population of TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells with immunoregulatory functions, demonstrating that these cells belong to the family of inducible Treg cells, with potent suppressive activity against CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells. DN T cells stimulated by APC were able to suppress effector cell activity, as long as there was cell-to-cell contact and TCR binding [38]. It has also been shown that TCR- $\alpha\beta^+$ DN Treg cells can serve to limit the clonal expansion of T cells specific for alloantigens after transplantation [31].

Another more recently described population of TCR- $\alpha\beta^+$ DN T cells makes up part of the mucosal-associated invariant T-cell family (MAIT). Within the MAIT subpopulation, there are two main subsets: CD8 $^+$ and DN T cells. Like other DN TCR- $\alpha\beta^+$ cell populations, they exhibit a great capacity to respond to antigens derived from microbial metabolic processes. MAITs exhibit a semi-invariant TCR including the V α 7.2 segment coupled with J α 33, J α 12 or J α 20, and a limited, evolutionarily conserved TCR beta-chain, that recognizes antigens presented by the class I-like molecule, protein 1 related to MHC-Ib (MR1) [39]. Although early studies differ on the ontogeny of these cells, recent studies by Brozova et al. have shown that CD8 $^+$ and DN MAIT subsets are related to memory/effector, tissue-homing and pro-inflammatory activities, with DN MAIT cells expressing less cytotoxic activity and displaying a lower expression of granzyme and CD107a, when compared to CD8 $^+$ MAIT cells [40]. Many studies have shown that MAIT cells may play a role in protective immunity in the lung [41,42], oral mucosa [43] and several types of cancers and infectious diseases [44–46], although they are also implicated in various autoimmune disorders [47–49].

A subpopulation of DN T cells that display the TCR- $\gamma\delta^+$ may be activated by classic triggers of the innate

immune system, including heat-shock protein-derived peptides [50]. Peripheral TCR- $\gamma\delta^+$ DN T cells display MHC-restricted or non-restricted cytotoxicity. Currently, the TCR- $\gamma\delta^+$ DN T cells have been associated with regulatory functions [31]. Among $\gamma\delta$ T cells, 60–95% correspond to the V γ 9V δ 2 T cells, the predominant subset in adult peripheral blood and the best-characterized $\gamma\delta$ T subset. More than 70% of all $\gamma\delta$ T cells are DN T cells [51]. TCR- $\gamma\delta^+$ T cells have restricted receptor repertoires, can respond readily to a wide range of both infectious and non-infectious stressors and share some characteristics with NK cells, as both are often associated with innate immunity. These cells recognize tumour cells, play a prominent role in antiviral protection and display cytolytic activity [51–53]. Thus, TCR- $\gamma\delta^+$ T cells are potentially related to combating bacterial and viral infections, and tumour regression. In this context, they can rapidly secrete large amounts of IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-17, and can act as potent cytotoxic effector cells against virus-infected and malignant cells through the release of perforin and granzyme B [54]. These cells can also perform regulatory functions, promoting tissue repair and wound healing, by secretion of IL-10 and TGF- β with potential suppressive effects on anti-tumour function (reviewed in ref. [55]).

Despite the growing interest over potentially protective and pathogenic functions of DN T cells, discrimination between different phenotypes is still difficult because characterization criteria are often based on exclusion, given the absence of well-defined markers [22]. Single-cell sequencing analysis has become a valuable tool for identifying particular markers of the different subpopulations. Using RNA sequencing, Yang et al. have recently made important contributions to defining the heterogeneity of naïve and activated DN T cells in mice. The analysis revealed five groups of transcriptionally distinct naïve DN T (nDN T) cells, which expressed unique sets of genes and performed mainly innate helper, cytotoxic and immune T-cell functions (named: nDN T at rest, nDN T helper, nDN T intermediate, nDN T cytotoxic and innate nDN T). In addition, two subgroups of activated DN T (aDN T) (named cytotoxic aDN T and pro-inflammatory aDN T) were identified. This study provides important insights that will help to better understand the intrinsic roles of different functional subsets of DN T cells in the development and progression of various diseases, thus facilitating therapeutic interventions [56].

ACTIVATION AND REGULATION OF DN T CELLS

The CD4 and CD8 molecules, absent in DN T cells, are membrane glycoproteins that stabilize the interaction of

TCR-MHC class II and class I molecules, respectively. This interaction is critical for both ontogeny and peripheral responses leading to differentiation and function of T cells [57].

Strober et al. were the first to describe a natural suppressor activity of DN T cells that was not MHC-restricted [58]. The antigen presentation to DN T cells occurs mostly in a non-classical fashion, through the family of CD1 molecules [59,60], which shares characteristics with MHC class I. The CD1 family of glycoproteins is expressed by several antigen-presenting cells (APC) and mainly involved in the presentation of glycolipid antigens to T cells (reviewed in ref. [61]). CD1 molecules can be classified into CD1a, CD1b, CD1c, CD1d and CD1e. CD1a–d are expressed in the membrane of APC, while CD1e is an intracellular chaperone. Presentation by CD1 proteins requires uptake and intracellular processing by APC and leads to the presentation of both exogenous and endogenous lipid antigens. While the main type of DN T-cell activation is by CD1 molecules, these cells can also recognize peptides presented by conventional MHC molecules. However, due to the absence of CD4 and CD8 molecules (the basic premise for classification into double negatives) the mechanism that allows DN T cells to recognize one of the classic MHC molecules and maintain antigen specificity was unknown. Ford et al. in 2008 elegantly proposed that just as many lymphocytes could acquire APC molecules by cell–cell contact or by exosomes, in a process called trogocytosis [62,63], DN T cells could also acquire allo-MHC–peptide complexes *in vivo*. Further, using a murine model, they demonstrated that in fact, trogocytosis allows DN T cells to acquire TCR-specific MHC–peptide complexes, and thereby increases their ability to suppress syngeneic responses [64].

A few years later, Voelkl et al. also demonstrated that functionally active antigen-specific DN T cells can recognize antigen restricted to MHC class I, thus contributing to anti-tumour immunity *in vivo* [65]. More recently, Tian et al. proposed that the lymphocyte activating gene 3 (Lag3) is a key molecule that contributes to MHC II antigen recognition. This affects antigen-specific regulation of DN T cells [66], since Lag3 is a transmembrane protein belonging to the immunoglobulin superfamily, which exhibits 100-fold greater avidity for human and mouse MHC II than for the corresponding CD4 molecule, as demonstrated by Huard et al. [67].

Upon activation, regulation of DN T-cell function is a crucial step for maintaining homeostasis. The observations reported in a murine model and human patients with deficiencies in the Fas or Fas ligand (FasL) receptor led to the hypothesis that Fas-mediated apoptosis is crucial for the removal of circulating self-reactive DN T cells, preventing autoimmunity [68]. Zhang et al. also showed that the elimination of self-reactive syngenic CD4⁺ and

CD8⁺ T cells occurs through recognition of allo-MHC peptides presented to DN T cells, which specifically kill T cells that recognize these same antigens [36].

Voelkl and colleagues demonstrated that human DN T cells may display functional characteristics of inducible Treg and that the immunosuppressive effect of these cells only occurs after activation by APC. Cytokines and coinhibitory receptors influence the regulatory function of DN T cells. However, they do not mediate suppression, which is done by direct cell-to-cell contact, by TCR signalling [38].

DN T CELLS IN DISEASES

Despite occurring as a minor T-cell population, DN T cells have been protagonists in the pathogenesis of several human diseases, either by their regulatory function impairing necessary inflammatory effector mechanisms or by mediating cell death and tissue destruction. Thus, these cells appear also as potential targets for immune-based interventions, opening perspectives for alternative strategies to treat human diseases. Below, we will discuss the role of DN T cells in several diseases.

DN T cells in autoimmunity, inflammatory diseases and transplantation

Since their discovery, the intense activation of DN T cells in autoimmune diseases has been demonstrated in several studies [69]. Lymphoproliferation (*lpr*) and generalized lymphoproliferation (*gld*), associated with autoreactivity, appear to be caused by an abnormal type of DN T cells. The *lpr* DN T cells exhibit a peculiar phenotype of poor proliferative capacity and do not produce IL-2 after TCR stimulation; they express B220 (CD45 B-cell isoform) and have a defective Fas pathway. Thus, it makes up an abnormal subset, with 'aberrant' phenotype and functions, different from those seen in normal DN T cells [7].

The effective participation of DN T cells in several autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) [19,70], rheumatoid arthritis (RA) [71], type 1 diabetes [72] and Sjögren's syndrome [73] has been described. Particularly, CD28 co-signalling pathway-independent activation of V γ 9V δ 2 T cells by self-peptide antigens renders the DN T cells with this TCR highly autoreactive [37].

An increased frequency of TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells in the peripheral blood, associated with increased tissue inflammation and tissue damage, has been described in SLE [74]. Furthermore, these cells also infiltrated the kidney of SLE patients, where other cells activate the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-17A, and

induce the production of antibodies [19,75,76]. In paediatric patients with SLE, mixed connective tissue disease or juvenile idiopathic arthritis, DN T cells were shown to be increased: almost 30% of children with these disorders had high frequencies of DN T cells, while only 3.6% of the control group had these changes [77].

High numbers of TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells were detected in synovial fluid of patients with RA. This increase in synovial fluid was accompanied by a decrease in peripheral blood, suggesting that these cells migrated from the circulation into the synovium, where they play a role in the disease [71]. In autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) type Ia, patients have an accumulation of TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells in the periphery as a result of inherited defects in apoptosis [78]. In fact, when investigating the causes of DN T-cell lymphocytosis in adults or children, Liapis et al. found that, in children, the most common causes were autoimmune lymphoproliferative syndrome and $\gamma\delta$ T-reactive lymphocytosis. In adults, granular T-cell lymphocyte (T-LGL) leukaemia, $\gamma\delta$ T-reactive lymphocytosis and hepatosplenic T-cell lymphoma (HSTL) were the most common diseases underlying DN T-cell lymphocytosis. In the same study, they also reported that less common causes included hypereosinophilic syndrome, peripheral T-cell lymphoma and double-negative monoclonal T lymphocytosis of uncertain significance [79].

Patients with Sjögren's syndrome displayed an increased number of DN T cells producing IL-17A in peripheral blood and infiltrating salivary glands that were associated with tissue damage [80–82]. IL-17-producing DN T cells were also associated with inflammation and plaques in the skin of patients with psoriasis, as well as in an experimental model, indicating an important role of these cells in the pathophysiology of the disease [83].

Interestingly, Meng et al. demonstrated that DNT-cell populations were increased in acute stroke patients compared with age-matched healthy individuals.

Immunohistochemical analyses of human and mouse brain lesions (used as a model of cerebral artery occlusion) showed that the infiltrating DN T cells were located mainly near the microglia in the ischaemic brain tissues of both stroke patients. In addition, the authors also demonstrated that DN T cells amplified pro-inflammatory microglia and subsequently increased neuroinflammation, by production of TNF-alpha, an increase in intrinsic FasL and protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (PTPN2) by DN T cells, which regulate CD86 expression in microglia. Consequently, these mechanisms led to the exacerbation of brain damage after ischaemic stroke [84].

On the contrary, Zhang and collaborators identified and characterized the immunoregulatory function of DN T cells by demonstrating that infusion of *in vitro*-activated DN Treg cells leads to a significant increase

in donor-specific skin and heart graft survival in mice [36,85]. Recently, studies showed that human DN T cells were successful in delaying the onset of xenograft rejection using infusion of *ex vivo*-expanded regulatory DN T cells that targeted autologous B and T cells [86]. Also, T DN cells have the ability to suppress B cells, through a perforin-dependent death mechanism [87], which may be relevant in autoimmune processes. Zhang et al. also described a new pathway of peripheral CD4⁺ T-cell differentiation into the DN T-cell phenotype [17], which exhibits the ability to suppress immune responses, and can potentially be used for the treatment of autoimmune diseases such as type 1 diabetes. Studying NOD mice, the same group demonstrated that administration of islet beta cell antigen-specific DN T cells can prevent the development of autoimmune diabetes and promote islet allograft survival [88].

Other studies have shown that the use of regulatory DN T cells can help to improve type 1 diabetes, through the control that these cells exert on cytotoxic CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, or even through the induction of tolerogenic dendritic cells [89]. Beaudoin et al. demonstrated, in a murine NOD model, that DN T cells (iNKT) induce tolerogenic dendritic cells that prevent the differentiation of these T cells into effector T cells in pancreatic lymph nodes [90]. Liu et al. also demonstrated that therapy, *in vitro* and *in vivo*, with the combination of DN T cells and antithymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice [72].

DN T cells and cancer

The establishment and maintenance of tumours involves the evolution of several immunological processes, including the regulation of T-cell function, changes in antigen presentation and production of immunosuppressants, which together culminate in an ineffective anti-tumour immune response [91].

Multiple studies point to a critical anti-tumour activity exhibited by DN T cells. In the context of cellular immunotherapy against malignant tumours [92,93], V γ 9V δ 2 DN T cells have been identified as potent cytolytic mediators [94]. The innate characteristic of recognizing antigenic targets independent of MHC causes TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells to recognize and kill different tumour strains, including ones that are resistant to conventional therapies. In addition, activated TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells secrete large amounts of IFN- γ , an essential cytokine in anti-tumour immune responses, highlighting the possibility of using these cells as a promising immunotherapy against cancer [95].

In vitro studies have shown that human DN T cells, when co-cultured with tumorigenic strains of pancreatic

cancer, reduced the proliferation and infiltration of cancer cells by increasing IFN- γ secretion and FasL expression [96]. DN T cells also showed greater cytotoxicity to lung cancer-derived cells *in vitro*, supporting the hypothesis that activation of DN T cells may be a plausible alternative therapy [97]. In addition, DN T cells showed promising results as *ex vivo* therapy for the treatment of leukaemia [98]. Recently, Ponzetta and co-workers studying the tumour microenvironment and the role of DN T cells found that neutrophils can regulate the function of TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells, which play an essential role in anti-tumour immunity [98,99].

The anti-tumour effects of DN T cells may be associated with FAS ligand–receptor binding, granzyme/perforin-mediated target cell apoptosis and/or cytokine secretion [93]. Of note, the ability of these cells to mediate autoreactivity and the fact that this is one of the main adverse effects of current immune-based therapies in cancer suggest that more studies need to be performed to avoid this potential issue while using DN T cells as therapies.

DN T cells in response to virus and bacteria

The behaviour of the immune system, among other factors, during the treatment of an infection can determine the eradication, maintenance or worsening of the patient's clinical condition. Thus, despite often being related to pathology development, DN T cells also have an important role in fighting infections.

NKT cells make up between 20 and 60%, among lung-resident CD3⁺ lymphocytes [100] where they appear to exert an immunoregulatory role, similar to those observed in DN T cells in tolerance to autografts [101]. However, in cases of infection, such as with the influenza A virus or the *Francisella tularensis* bacterium, they expand rapidly and secrete high amounts of IFN- γ and IL-17A [102]. Thus, the function of DN T cells may change depending on the presence or absence of pathogens.

Clinical trials have shown the involvement of DN T cells in beneficial responses against some viral and bacterial infections. Tuberculosis patients have higher frequencies of activated DN $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells with an inflammatory profile. Due to their expansion against microbial antigens, high frequencies of DN TCR- $\gamma\delta$ ⁺ T cells were found in patients with protective and resistant immunity when compared to more susceptible patients, suggesting a role for these cells in fighting the tuberculosis bacillus [103].

Longitudinal studies following patients with primary HIV infection showed an increased frequency of DN T cells [104]. Petitjean et al. had demonstrated that the increase in DN T cells producing immunosuppressive cytokines (transforming growth factor B1 (TGF- β))

and IL-10) could be involved in the control of harmful immune activation. In patients with primary HIV infection, these facts together predicted the onset of immune activation, marked by an increase in CD8⁺ lymphocytes [105]. In agreement, Sundaravaradan, studying DN T cells in HIV⁺ patients, concluded that these cells exhibit an immunoregulatory and auxiliary profile, similar to CD4⁺ T cells, which seems to contribute to halting the progression of the infection [106]. The data from these studies show that regulatory DN T cells would be important to compensate for reduced levels of CD4⁺ T cells during HIV infection, thereby controlling an exaggerated and harmful immune response. On the contrary, recent studies with HIV-infected humanized bone marrow–liver–thymus mice also reported higher frequencies of DN T cells in the lung than in the blood and spleen in early and late HIV infection. The results of this study showed that HIV is ‘seeded’ into the DN T cells of the pulmonary mucosa soon after infection, and persists in these potential HIV cell reservoirs, even during long-term antiretroviral therapy [107].

Similarly, longitudinal and cross-sectional studies in patients with hepatitis B virus showed that TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T-cell-mediated suppression of activated antigen-specific CD8⁺ T cells compromises the control of viral replication and consequently the seroconversion of hepatitis B antigen. Lower baseline frequencies of TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells anticipated seroconversion in patients with chronic hepatitis B [108].

Clinical studies demonstrated that children with viral pneumonia who had higher frequencies of DN T CD3⁺ HIGH/BRIGHT cells had a milder clinical condition [109]. However, in other respiratory infections, it was found that the subset of $\gamma\delta$ T cells (CD56⁺ V γ 9V δ 2), as well as type I NKT cells, displayed high cytolytic activity in response to influenza A virus infections [110]. Another interesting characteristic is that V γ 9V δ 2 T cells are specifically activated by small phosphoantigens (phosphoAgs) and the pathway that produces the most potent V γ 9V δ 2 agonists is found in several microorganisms [111].

DN T cells and parasitic diseases

Few studies have explored the role of DN T cells in parasitic diseases, with the great majority of the studies focusing on leishmaniasis, trypanosomiasis and malaria, three neglected parasitic tropical diseases caused by infection with *Leishmania sp.*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium sp.*, respectively.

A subset of TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells (V γ 2⁺V δ 2⁺) are rapidly recruited and activated by the blood stage of *Plasmodium*

falciparum, and mediate the death of parasites. This death is dependent on TCR-mediated mechanisms, but not on antigen processing or presentation by APCs. Instead, it used cell-to-cell contact and exocytosis-dependent cytotoxic pathway after recognition of certain ligands or molecules expressed on the surface of infected erythrocytes or merozoites [112–114]. Also, the number of T cells increases during acute infection and remains high during convalescence. Ho and team demonstrated that the elimination of intra-erythrocytic forms of *P. falciparum* occurs through cytotoxic molecules secreted by TCR- $\gamma\delta$ ⁺ T cells [115–117]. Recently, Junqueira et al. also demonstrated the importance of T lymphocytes V γ 9V δ 2 ($\gamma\delta$ 2) in the control of intra-erythrocytic parasites and the schizont form, through the release of granulysin and phagocytosis of the opsonized parasites, in a CD16-dependent mechanism, which shows the importance of these cells in parasite control [118]. It has been shown that V γ 2⁺ V δ 2⁺ DN T cells appear to play a role in preventing primary *Plasmodium* infection in children from an endemic area. However, as children aged, the cell count decreased, as well as the production of pro-inflammatory cytokines in response to malaria antigens. This suggests that repeated malaria infections can lead to tolerance of V γ 2⁺ V δ 2⁺ T cells, which, on the contrary, is related to the decrease in clinical symptoms due to the lower production of cytokines [119].

The expansion of TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells in the blood of patients, dogs and mice infected with *Leishmania*, and the accumulation of this population in the spleen of mice have been shown [120–123]. Mou and collaborators demonstrated that murine DN T cells reactive to *Leishmania* are restricted to MHC II, proliferate *in vitro* and display effector functions with high secretion of inflammatory cytokines and cytotoxic molecules, and little regulatory function. They also found that DN T cells showed rapid expansion and effector function, with IFN- γ production in secondary infections. Such DN T cells, from exposed and cured mice, had high levels of markers related to central memory, CD62L^{hi} CD44^{hi}, suggesting an important role in immunity against recurrent infections [124]. In patients with cutaneous leishmaniasis, the pioneering studies by Antonelli et al. showed that the distribution of DN T cells was inverse to the one observed in healthy people: 75% of DN T cells expressed $\alpha\beta$ chains, and only 25%, the $\gamma\delta$ receptor, while healthy donors had the opposite distribution with ~75% of the DN T cells that express the $\gamma\delta$ receptor, and only 25%, the $\alpha\beta$ receptor. The TCR- $\alpha\beta$ ⁺ DN T cells of infected patients had an inflammatory cytokine secretion profile, whereas TCR- $\gamma\delta$ ⁺ DN T cells had a high regulatory profile, contributing to a balanced immune response [120]. However, *in situ* analysis of skin lesions, from cutaneous leishmaniasis, showed high cytotoxic activity of CD8⁺, DN T and NKT cells, and CD4⁺ lymphocytes [125].

Trypanosoma cruzi infection, which leads to Chagas disease, is strongly associated with the activation of DN T cells in mice and humans. Studies in the murine model have shown that TCR- $\gamma\delta^+$ and NK DN T cells that secrete IFN- γ accumulate in the liver of infected mice. Interestingly, numerous intrahepatic amastigotes were found in infected IFN-deficient mice, corroborating the notion that the liver is protected by an efficient local immunity mediated by DN T cells [126]. Studying the immune response in young and adult rats infected with the CL Brener clone or with the JG strain of *T. cruzi*, Nagib and collaborators observed that both populations of *T. cruzi* caused an expansion of DN T cells during the acute phase. However, while JG strain led to an approximately eightfold increase, the infection with CL Brener led to around 20-fold expansion of DN T cells by Day 15. At Day 120 of the infection with JG strain, the percentage of DN T cells remained higher (13.45%) in comparison with control (1.48%; $p < 0.05$), as well as the serum levels of IFN- γ [127].

In patients with Chagas disease, our group described DN T cells as an important source of anti-inflammatory and inflammatory cytokines, polarized according to the clinical outcome of disease. Infected individuals without clinical manifestations, classified as the indeterminate clinical form, display high frequencies of IL-10⁺ DN T cells, while these cells expressed predominantly inflammatory cytokines in patients with the cardiac clinical form of Chagas disease [128]. We further determined that glycoconjugates derived from *T. cruzi* trypomastigotes, and not proteins nor lipids, were the main stimulators of DN T cells from patients with Chagas disease [129]. Importantly, Passos et al. showed that blocking CD1d-mediated activation of DN T cells shifts the cytokine expression towards a less inflammatory profile in patients with Chagas heart disease. These data suggest that targeting DN T-cell activation may prevent Chagas disease cardiomyopathy [129].

METHODS

A PubMed-based literature search was performed using the search strings “Double negative T cells”, “CD4⁻CD8⁻ T cells” and their combination with “Autoimmune diseases”, “surface expression”, “pathophysiology”, “cytokine”, “inflammatory diseases”, “cancer”, “therapy”, “treatment”, “disease”, “Sjögren's syndrome”, “Systemic lupus erythematosus”, “psoriasis”, “type 1 diabetes” and “parasitic diseases”.

The authors also used their personal collection of PubMed-listed published manuscripts on the topic (that

included manuscripts that were to be found under the aforementioned search strings).

CONCLUSION AND PERSPECTIVE

DN T cells exist in peripheral blood and lymphoid organs in relatively small numbers. However, the MAIT subpopulation represents a substantial fraction in non-lymphoid tissues, appearing predominantly in mucosal tissue, and intestinal and pulmonary epithelia. The immunoregulatory and functional activities of DN T cells have been described in several contexts: graft tolerance, autoimmunity, cancer and infectious diseases. The predominant anti-inflammatory mechanisms attributed to DN T cells are IL-10 secretion, and granzyme/perforin-mediated cytotoxicity. However, in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases, IL-17-producing DN T cells were associated with an adverse effect, associated with the ability to increase inflammation and worsen tissue damage (see Table 2 with indication of the role of DN T cells in different diseases).

The complexity of studying the role of DN T cells in different physiologic and pathologic settings is due, at least partially, to their phenotypic and functional diversity. Recent advances in the field have demonstrated that DN T cells are involved both in regulatory functions and in inflammation, which may be associated with protective or pathogenic activities, depending on the disease. This functional heterogeneity is influenced by a series of factors, including the host immune status, intrinsic characteristics of the infectious agent when relevant, and the cytokine milieu, among others. One of the particularities that makes DN T cells so interesting is precisely their wide-reaching immunoregulatory and functional potential, presenting both down-modulatory and inflammatory functions.

Thus, efforts to elucidate the gaps in knowledge that address the participation of these cells in different pathologies, as well as in protective immune responses, are extremely important. New studies are needed to address mechanisms regarding their physiologic ontogeny, differentiation, regulation and effector activities. Clarifying these issues will not only provide information on the pathogenic and protective mechanisms of human diseases but also further develop the potential use of DN T cells as biomarkers or therapeutic agents. In addition, while the search for phenotypic markers to identify the different DN T-cell subsets requires major efforts, it may emerge as a powerful tool to allow the use of DN T cells as biomarkers associated with disease progression, as well as therapeutic targets.

TABLE 2 Summary of diseases where DN T cells have been described as having an important role in pathogenesis

Disease	Aetiological agent	DN T cell	Role of DN T cells	Model	Reference
Systemic lupus erythematosus	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory	Human	(Crispín et al., 2008)
Rheumatoid arthritis	Autoimmune	$\gamma\delta$ DN T cell	Inflammatory	Human	(Liu et al., 1999)
Sjögren's syndrome	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory	Human	(Hayashi et al., 1994)
Psoriasis	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory	Human and mice	(Brandt et al., 2017)
Hepatitis B	Hepatitis B virus	$\gamma\delta$ DN T cell	Regulatory	Human	(Lai et al., 2014)
Leishmaniasis	<i>Leishmania</i> sp.	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory NKT cells	Human and mice	(Gollob et al., 2008; Ferraz et al., 2017)
Chagas disease	<i>Trypanosoma cruzi</i>	NK T $\gamma\delta$ DN T cells	Inflammatory	Human and mice	(Nagib et al., 2007); (Passos et al., 2017)
Graft against host	Graft	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory	Human	(Zhang et al., 2000; Achita et al., 2018)
Type 1 diabetes	Autoimmune	$\alpha\beta$ DN T cells iNKT cells	Anti-inflammatory	Human and mice	(Zhang et al., 2011, Sørensen et al., 2014, Liu et al., 2016)
Cancer	–	$\alpha\beta$ DN T cells $\gamma\delta$ DN T cell	Anti-tumour	Human	(Li et al., 2020)
Flu	Influenza A virus	$\alpha\beta$ DN T cells NKT cells	Cytotoxic	Mice	(Chang et al., 1992)
Tularaemia	<i>Francisella tularensis</i>	$\alpha\beta$ DN T cells	Cytotoxic	Mice	(Cowley et al., 2010)
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$\alpha\beta$ DN T cells $\gamma\delta$ DN T cell	Inflammatory	Human	(Pinheiro et al., 2012)
HIV infection	HIV	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory	Human	(Petitjean et al., 2012; Sundaravaradan et al., 2012)
Pneumonia	Influenza A virus and bacteria	$\gamma\delta$ DN T cells NKT cells	Inflammatory	Human	(Qin et al., 2012; Wang et al., 2018)
Leishmaniasis	<i>Leishmania</i> sp.	$\gamma\delta$ DN T cell	Regulatory	Human	(Lezama-Dávila and Gallagher, 1995; Antonelli et al., 2006; Gollob et al., 2008; Mou, Z. et al., 2014; Alexandre-Pires et al., 2010; Ferraz et al., 2017)
Malaria	<i>Plasmodium falciparum</i>	$\alpha\beta$ DN T cells	Inflammatory	Human	(Dieli et al., 2001; Antonelli et al., 2006)
Acanthamoebiasis	<i>Acanthamoeba</i> sp.	$\alpha\beta$ DN T cells	Regulatory	Human	(Łanocha-Arendarczyk et al., 2018)
Chagas disease	<i>Trypanosoma cruzi</i>	$\gamma\delta$ DN T cell	Regulatory Anti-inflammatory	Human	(Villani et al., 2010)

Note: In red, diseases in which DN T cells play roles in worsening the disease, and in green, diseases where these cells seem to be protective.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge CNPq, FAPEMIG, INCT-DT and NIH/NIAID for continued support of their work. We also present our apologies to the authors of many papers not cited here due to format limitations and thank all the researchers whose scientific contributions have allowed for great progress towards the understanding of the role of DN T cells in health and disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interests to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TV did the bibliography research and wrote the paper. KG and WOD revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

ORCID

Walderez Ornelas Dutra  <https://orcid.org/0000-0002-7586-9996>

REFERENCES

- Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:463–93.
- Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. The fidelity, occasional promiscuity, and versatility of T cell receptor recognition. *Immunity.* 2008;28:304–14.
- Borst J, van Dongen JJ, Bolhuis RL, Peters PJ, Hafler DA, de Vries E, et al. Distinct molecular forms of human T cell receptor gamma/delta detected on viable T cells by a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 1988;167:1625–44.
- Brenner MB, McLean J, Scheft H, Warnke RA, Jones N, Strominger JL. Characterization and expression of the human alpha beta T cell receptor by using a framework monoclonal antibody. *J Immunol.* 1987;138:1502–9.
- Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature.* 1995;375:795–8.
- Burnet M. Auto-immune disease. I. Modern immunological concepts. *Br Med J.* 1959;2:645–50.
- Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad AR. Double negative (DN) $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol.* 2015;93:305–10.
- Cron RQ, Gajewski TF, Sharrow SO, Fitch FW, Matis LA, Bluestone JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+, CD4-, CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol.* 1989;142:3754–62.
- Casorati G, De Libero G, Lanzavecchia A, Migone N. Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *J Exp Med.* 1989;170:1521–35.
- Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med.* 2005;201:1715–23.
- Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, Knott-Craig CJ, Thompson LF. Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential—differences between men and mice. *J Immunol.* 2006;176:1543–52.
- Pobezinsky LA, Angelov GS, Tai X, Jeurling S, Van Laethem F, Feigenbaum L, et al. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol.* 2012;13:569–78.
- Mixter PF, Russell JQ, Morrisette GJ, Charland C, Aleman-Hoey D, Budd RC. A model for the origin of TCR-alphabeta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals. *J Immunol.* 1999;162:5747–56.
- Johansson M, Lycke N. A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract. *J Immunol.* 2003;170:1659–66.
- Ford MS, Zhang ZX, Chen W, Zhang L. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J Immunol.* 2006;177:2803–9.
- Yamada Y, Fujita M, Suzuki H, Atogami S, Sohda H, Murata K, et al. Established IL-2-dependent double-negative (CD4- CD8-) TCR alpha beta/CD3+ ATL cells: induction of CD4 expression. *Br J Haematol.* 1994;88:234–41.
- Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 2007;109:4071–9.
- Grishkan IV, Ntranos A, Calabresi PA, Gocke AR. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell Immunol.* 2013;284(1–2):68–74.
- Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol.* 2008;181:8761–6.
- Crispín JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol.* 2009;183:4675–81.
- Kappes DJ, He X. CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. *Nat Immunol.* 2005;6:761–6.
- D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol.* 2011;82:333–40.
- Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* 2000;21:573–83.
- Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, et al. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol.* 1999;29:3768–81.
- Krovi SH, Gapin L. Invariant natural killer T cell subsets—more than just developmental intermediates. *Front Immunol.* 2018;9:1393.
- Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol.* 2010;11:197–206.
- Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Taura I, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science.* 1997;278:1623–6.

28. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med.* 2004;199:947–57.
29. Torina A, Guggino G, La Manna MP, Sireci G. The Janus Face of NKT cell function in autoimmunity and infectious diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19:440.
30. Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol.* 1992;149:1211–5.
31. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105:2828–35.
32. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain? *Am J Transplant.* 2014;14:2460–6.
33. Li H, Adamopoulos IE, Moulton VR, Stillman IE, Herbert Z, Moon JJ, et al. Systemic lupus erythematosus favors the generation of IL-17 producing double negative T cells. *Nat Commun.* 2020;11:2859.
34. Rodríguez-Rodríguez N, Apostolidis SA, Fitzgerald L, Meehan BS, Corbett AJ, Martín-Villa JM, et al. Pro-inflammatory self-reactive T cells are found within murine TCR- $\alpha\beta$ (+) CD4(-) CD8(-) PD-1(+) cells. *Eur J Immunol.* 2016;46:1383–91.
35. Rodríguez-Rodríguez N, Apostolidis SA, Penaloza-MacMaster P, Martín Villa JM, Barouch DH, Tsokos GC, et al. Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ + double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells. *J Immunol.* 2015;194:4207–14.
36. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6:782–9.
37. Nedellec S, Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol.* 2010;22:199–206.
38. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41:739–48.
39. Tilloy F, Treiner E, Park SH, Garcia C, Lemonnier F, de la Salle H, et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med.* 1999;189:1907–21.
40. Brozova J, Karlova I, Novak J. Analysis of the phenotype and function of the subpopulations of mucosal-associated invariant T cells. *Scand J Immunol.* 2016;84:245–51.
41. Meierovics A, Yankelevich WJ, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:E3119–28.
42. Parrot T, Gorin JB, Ponzetta A, Maleki KT, Kammann T, Emgård J, et al. MAIT cell activation and dynamics associated with COVID-19 disease severity. *Sci Immunol.* 2020;5:eabe1670.
43. Sobkowiak MJ, Davanian H, Heymann R, Gibbs A, Emgård J, Dias J, et al. Tissue-resident MAIT cell populations in human oral mucosa exhibit an activated profile and produce IL-17. *Eur J Immunol.* 2019;49:133–43.
44. Petley EV, Koay HF, Henderson MA, Sek K, Todd KL, Keam SP, et al. MAIT cells regulate NK cell-mediated tumor immunity. *Nat Commun.* 2021;12:4746.
45. Lu Z, Zhu M, Marley JL, Bi K, Wang K, Zhai M, et al. The combined action of monocytic myeloid-derived suppressor cells and mucosal-associated invariant T cells promotes the progression of cervical cancer. *Int J Cancer.* 2021;148:1499–507.
46. Rudak PT, Choi J, Haeryfar SMM. MAIT cell-mediated cytotoxicity: roles in host defense and therapeutic potentials in infectious diseases and cancer. *J Leukoc Biol.* 2018;104:473–86.
47. Nel I, Beaudoin L, Gouda Z, Rousseau C, Soulard P, Rouland M, et al. MAIT cell alterations in adults with recent-onset and long-term type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2021;64:2306–21.
48. Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, Roccarina D, Rosselli M, Hall A, et al. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. *Hepatology.* 2018;68:172–86.
49. Chiba A, Murayama G, Miyake S. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2018;9:1333.
50. Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and functional plasticity of gamma-Delta ($\gamma\delta$) T cells in inflammation and tolerance. *Int Rev Immunol.* 2014;33:537–58.
51. Kalyan S, Kabelitz D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell Mol Immunol.* 2013;10:21–9.
52. Beetz S, Marischen L, Kabelitz D, Wesch D. Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol Res.* 2007;37:97–111.
53. Qi C, Wang Y, Li P, Zhao J. Gamma delta T cells and their pathogenic role in psoriasis. *Front Immunol.* 2021;12:627139.
54. Muller CKS, Spagnuolo J, Audigé A, Chancellor A, Russenberger D, Scherrer AU, et al. Immunophenotypic characterization of TCR $\gamma\delta$ T cells and MAIT cells in HIV-infected individuals developing Hodgkin's lymphoma. *Infect Agent Cancer.* 2021;16:24.
55. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:467–78.
56. Yang L, Zhu Y, Tian D, Wang S, Guo J, Sun G, et al. Transcriptome landscape of double negative T cells by single-cell RNA sequencing. *J Autoimmun.* 2021;121:102653.
57. Reimann J. Double-negative (CD4-CD8-), TCR alpha beta-expressing, peripheral T cells. *Scand J Immunol.* 1991;34:679–88.
58. Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, Allison JP. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol.* 1989;143:1118–22.
59. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 1992;360:593–7.
60. De Libero G, Mori L. Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:485–96.
61. Sugita M, Moody DB, Jackman RM, Grant EP, Rosat JP, Behar SM, et al. CD1—a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;87:8–14.
62. Joly E, Hudrisier D. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol.* 2003;4:815.
63. Hudson L, Sprent J, Miller JF, Playfair JH. B cell-derived immunoglobulin on activated mouse T lymphocytes. *Nature.* 1974;251:60–2.

64. Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol.* 2008;181:2271–5.
65. Voelkl S, Moore TV, Rehli M, Nishimura MI, Mackensen A, Fischer K. Characterization of MHC class-I restricted TCRalpha+ CD4- CD8- double negative T cells recognizing the gp100 antigen from a melanoma patient after gp100 vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:709–18.
66. Tian D, Yang L, Wang S, Zhu Y, Shi W, Zhang C, et al. Double negative T cells mediate Lag3-dependent antigen-specific protection in allergic asthma. *Nat Commun.* 2019;10:4246.
67. Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol.* 1995;25:2718–21.
68. Mohamood AS, Bargatze D, Xiao Z, Jie C, Yagita H, Ruben D, et al. Fas-mediated apoptosis regulates the composition of peripheral alpha beta T cell repertoire by constitutively purging out double negative T cells. *PLoS One.* 2008;3:e3465.
69. Brandt D, Hedrich CM. TCRαβ + CD3 + CD4 - CD8 - (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018;17:422–30.
70. El-Sayed ZA, El-Owaidy RH, Mohamed NL, Shehata BA. Alpha beta double negative T cells in children with systemic lupus erythematosus: the relation to disease activity and characteristics. *Mod Rheumatol.* 2018;28:654–60.
71. Liu MF, Yang CY, Chao SC, Li JS, Weng TH, Lei HY. Distribution of double-negative (CD4- CD8-, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1999;18:227–31.
72. Liu T, Cong M, Sun G, Wang P, Tian Y, Shi W, et al. Combination of double negative T cells and anti-thymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice. *J Transl Med.* 2016;14:57.
73. Hayashi Y, Haneji N, Hamano H. Pathogenesis of Sjögren's syndrome-like autoimmune lesions in MRL/lpr mice. *Pathol Int.* 1994;44:559–68.
74. Crispin JC, Hedrich CM, Suárez-Fueyo A, Comte D, Tsokos GC. SLE-associated defects promote altered T cell function. *Crit Rev Immunol.* 2017;37:39–58.
75. Sieling PA, Porcelli SA, Duong BT, Spada F, Bloom BR, Diamond B, et al. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J Immunol.* 2000;165:5338–44.
76. Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol.* 1989;143:103–12.
77. Tarbox JA, Keppel MP, Topcagic N, Mackin C, Ben Abdallah M, Baszis KW, et al. Elevated double negative T cells in pediatric autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2014;34:594–9.
78. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 1995;81:935–46.
79. Liapis K, Tsagarakis NJ, Panitsas F, Taparkou A, Liapis I, Roubakis C, et al. Causes of double-negative T-cell lymphocytosis in children and adults. *J Clin Pathol.* 2020;73:431–8.
80. Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:529–37.
81. Manoussakis MN, Georgopoulou C, Zintzaras E, Spyropoulou M, Stavropoulou A, Skopouli FN, et al. Sjögren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2004;50:882–91.
82. Alunno A, Carubbi F, Bartoloni E, Bistoni O, Caterbi S, Cipriani P, et al. Unmasking the pathogenic role of IL-17 axis in primary Sjögren's syndrome: a new era for therapeutic targeting? *Autoimmun Rev.* 2014;13:1167–73.
83. Brandt D, Seron M, Abraham S, Mäbert K, Hedrich CM. TCR. *Clin Immunol.* 2017;181:51–9.
84. Meng H, Zhao H, Cao X, Hao J, Zhang H, Liu Y, et al. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116:5558–63.
85. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc.* 2003;35:2479–80.
86. Achita P, Dervovic D, Ly D, Lee JB, Haug T, Joe B, et al. Infusion of ex-vivo expanded human TCR-αβ. *Clin Exp Immunol.* 2018;193:386–99.
87. Li W, Tian Y, Li Z, Gao J, Shi W, Zhu J, et al. Ex vivo converted double negative T cells suppress activated B cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;20:164–9.
88. Zhang D, Zhang W, Ng TW, Wang Y, Liu Q, Gorantla V, et al. Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4⁺ CD8⁺ T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice. *Diabetologia.* 2011;54:2082–92.
89. Sørensen J, Buschard K, Brogren CH. The preventive role of type 2 NKT cells in the development of type 1 diabetes. *APMIS.* 2014;122:167–82.
90. Beaudoin L, Diana J, Ghazarian L, Simoni Y, Boitard C, Lehuen A. Plasmacytoid dendritic cells license regulatory T cells, upon iNKT-cell stimulation, to prevent autoimmune diabetes. *Eur J Immunol.* 2014;44:1454–66.
91. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015;35(Suppl):S185–98.
92. Soares F, Chen B, Lee JB, Ahmed M, Ly D, Tin E, et al. CRISPR screen identifies genes that sensitize AML cells to double-negative T-cell therapy. *Blood.* 2021;137:2171–81.
93. Li Y, Dong K, Fan X, Xie J, Wang M, Fu S, et al. DNT cell-based immunotherapy: progress and applications. *J Cancer.* 2020;11:3717–24.
94. Caccamo N, Dieli F, Meraviglia S, Guggino G, Salerno A. Gammadelta T cell modulation in anticancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10:27–36.
95. Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting γδ T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res.* 2010;70:10024–7.
96. Lu Y, Hu P, Zhou H, Yang Z, Sun YU, Hoffman RM, et al. Double-negative T cells inhibit proliferation and invasion of human pancreatic cancer cells in co-culture. *Anticancer Res.* 2019;39:5911–8.
97. Fang L, Ly D, Wang SS, Lee JB, Kang H, Xu H, et al. Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of

- DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38:123.
98. Lee J, Minden MD, Chen WC, Streck E, Chen B, Kang H, et al. Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2018;24:370–82.
 99. Ponzetta A, Carriero R, Carnevale S, Barbagallo M, Molgora M, Perucchini C, et al. Neutrophils driving unconventional T cells mediate resistance against murine sarcomas and selected human tumors. *Cell.* 2019;178:346–360.e324.
 100. Chang JC, Zhang L, Distler SG, Ziang G, Kaplan AM. Characterization and function of CD3+ CD4- CD8- TcR-alpha beta bearing cells infiltrating the lung during the immune response. *Reg Immunol.* 1992;4:25–33.
 101. Neyt K, GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Double-negative T resident memory cells of the lung react to influenza virus infection via CD11c(hi) dendritic cells. *Mucosal Immunol.* 2016;9:999–1014.
 102. Cowley SC, Meierovics AI, Frelinger JA, Iwakura Y, Elkins KL. Lung CD4-CD8- double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN-gamma during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J Immunol.* 2010;184:5791–801.
 103. Pinheiro MB, Antonelli LR, Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Spindola-de-Miranda S, Guimarães TM, et al. CD4-CD8- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis. *PLoS One.* 2012;7:e50923.
 104. Singleterry WL, Henderson H, Cruse JM. Depletion of pro-inflammatory CD161(+) double negative (CD3(+)/CD4(-)/CD8(-)) T cells in AIDS patients is ameliorated by expansion of the $\gamma\delta$ T cell population. *Exp Mol Pathol.* 2012;92:155–9.
 105. Petitjean G, Chevalier MF, Tibaoui F, Didier C, Manea ME, Liovat AS, et al. Level of double negative T cells, which produce TGF- β and IL-10, predicts CD8 T-cell activation in primary HIV-1 infection. *AIDS.* 2012;26:139–48.
 106. Sundaravaradan V, Mir KD, Sodora DL. Double-negative T cells during HIV/SIV infections: potential pinch hitters in the T-cell lineup. *Curr Opin HIV AIDS.* 2012;7:164–71.
 107. Meziiane O, Salahuddin S, Pham TNQ, Farnos O, Pagliuzza A, Olivenstein R, et al. HIV infection and persistence in pulmonary mucosal double negative T cells. *J Virol.* 2020;94:e01788-20.
 108. Lai Q, Ma S, Ge J, Huang Z, Huang X, Jiang X, et al. TCR $\gamma\delta$ (+) CD4(-)/CD8(-) T cells suppress the CD8(+) T-cell response to hepatitis B virus peptides, and are associated with viral control in chronic hepatitis B. *PLoS One.* 2014;9:e88475.
 109. Wang Y, Lu W, Li A, Sun Z, Wang L. Elevated CD3 low double negative T lymphocyte is associated with pneumonia and its severity in pediatric patients. *PeerJ.* 2018;6:e6114.
 110. Qin G, Liu Y, Zheng J, Xiang Z, Ng IH, Malik Peiris JS, et al. Phenotypic and functional characterization of human $\gamma\delta$ T-cell subsets in response to influenza A viruses. *J Infect Dis.* 2012;205:1646–53.
 111. Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:539–46.
 112. Behr C, Dubois P. Preferential expansion of V gamma 9 V delta 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of *Plasmodium falciparum*. *Int Immunol.* 1992;4:361–6.
 113. Dantzer KW, Jagannathan P. $\gamma\delta$ T cells in antimalarial immunity: new insights into their diverse functions in protection and tolerance. *Front Immunol.* 2018;9:2445.
 114. Costa G, Loizon S, Guenot M, Mocan I, Halary F, de Saint-Basile G, et al. Control of *Plasmodium falciparum* erythrocytic cycle: $\gamma\delta$ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood.* 2011;118:6952–62.
 115. Ho M, Webster HK, Tongtawe P, Pattanapanyasat K, Weidanz WP. Increased gamma delta T cells in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunol Lett.* 1990;25(1–3):139–41.
 116. Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Da Costa Rocha MO, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:112–8.
 117. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M. Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur J Immunol.* 2004;34:2248–56.
 118. Junqueira C, Polidoro RB, Castro G, Absalon S, Liang Z, Sen Santara S, et al. $\gamma\delta$ T cells suppress *Plasmodium falciparum* blood-stage infection by direct killing and phagocytosis. *Nat Immunol.* 2021;22:347–57.
 119. Jagannathan P, Lutwama F, Boyle MJ, Nankya F, Farrington LA, McIntyre TI, et al. V δ 2+ T cell response to malaria correlates with protection from infection but is attenuated with repeated exposure. *Sci Rep.* 2017;7:11487.
 120. Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimarães LH, Bacellar O, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2006;74:6317–23.
 121. Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol.* 2008;8:1338–43.
 122. Alexandre-Pires G, de Brito MT, Algueró C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;137(3–4):275–83.
 123. Lezama-Dávila CM, Gallagher G. CD4+, CD8+ and CD4- CD8- T cell-subsets can confer protection against *Leishmania m. mexicana* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90:51–8.
 124. Mou Z, Liu D, Okwor I, Jia P, Orihara K, Uzonna JE. MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004396.
 125. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, Lyra MR, Pereira-Da-Silva T, Schubach AO, et al. CD3 + CD4 neg CD8 neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a + cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2017;10:219.

126. Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006;74:2031–42.
127. Nagib PR, Dutra WO, Chiari E, Machado CR. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD4-CD8- T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol*. 2007;116:366–74.
128. Villani FN, Rocha MO, Nunes MoC, Antonelli LR, Magalhães LM, dos Santos JS, et al. *Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect Immun*. 2010;78:4421–30.
129. Passos LS, Villani FN, Magalhães LM, Gollob KJ, Antonelli LR, Nunes MC, et al. Blocking of CD1d decreases *Trypanosoma cruzi*-induced activation of CD4-CD8- T cells and modulates the inflammatory response in patients with Chagas heart disease. *J Infect Dis*. 2016;214:935–44.

How to cite this article: Velikkakam T, Gollob KJ, Dutra WO. Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. *Immunology*. 2022;165:371–385. <https://doi.org/10.1111/imm.13441>