

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Marcos Paulo de Souza Damasio

***ESTUDO DA APOPTOSE COMO MECANISMO DE SUPRESSÃO INDUZIDO POR
CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ DE PACIENTES NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS***

Belo Horizonte

2012

Marcos Paulo de Souza Damasio

***ESTUDO DA APOPTOSE COMO MECANISMO DE SUPRESSÃO INDUZIDO POR
CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ DE PACIENTES NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA
DOENÇA DE CHAGAS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau

Co-orientador: Dr. Rodrigo Correa Oliveira

Belo Horizonte

2012

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia das Interações Celulares-LABIC/Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas-ICB/UFMG

COLABORADORES

Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

Giovane Rodrigo Sousa

Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Walderez Ornelas Dutra

Karine Silvestre Ferreira

Vanessa Alves Azevedo Valente

Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas Gerais

Dra. Ana Thereza Chaves

Ms. Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

Nayara Ingrid de Medeiros

FDA/NIH

Dra. Fernanda Fortes Araújo

Marcos Paulo de Souza Damasio

***ESTUDO DA APOPTOSE COMO MECANISMO DE SUPRESSÃO INDUZIDO POR
CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺DE PACIENTES NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau (orientadora)-UFMG

Dr. Rodrigo Correa Oliveira (co-orientador)-CPqRR

Membro da Banca

Membro da Banca

Belo Horizonte, 23 de Novembro de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, pela vida, pelas infinitas bênçãos e por me guiar em um caminho onde os momentos e as pessoas são muito especiais.

A minha mãe Iara e meu pai Altair pelo grande amor, pelo apoio imprescindível, pelas palavras de incentivo e pelos conselhos que me ajudam a me tornar uma pessoa melhor sempre.

As minhas irmãs Camila e Lorena por estarem sempre ao meu lado.

A toda minha família pelo imenso carinho presente em todos os instantes.

A minha orientadora Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau, agradeço eternamente pela oportunidade de aprendizado, pela paciência, por compartilhar experiências e por me incentivar na realização deste trabalho. Cada ensinamento foi de extrema importância para minha formação profissional e pessoal. Obrigado por ser fonte de conhecimento! Aprendi muito com você e jamais irei me esquecer!

Ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Correa Oliveira, pelo exemplo profissional, pelo apoio e conselhos em diversos momentos.

Ao Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha por compartilhar conhecimentos que vão além da ciência e por permitir vivenciar bons momentos no CTR-DIP-Orestes Diniz. Muito obrigado!

A minha amiga Karine pela cumplicidade e amizade. Obrigado por ser minha irmã e por fazer tudo se tornar mais fácil!

A minha amiga Vanessa pela parceria e pelos dias e dias de ajuda.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia das Interações Celulares, por tudo que vivemos juntos. Vocês são muito especiais para mim!

Ao meu amigo e colaborador Giovane, pela ajuda na realização deste trabalho, pelo companheirismo e pela amizade. Muito obrigado!

A todos do Centro de Pesquisas Rene Rachou, em especial a Ana Thereza, Clari Gandra, Jaquelline Germano, Luciana Castro, Nayara Medeiros e Rafaelle Fares, pela constante disponibilidade em ajudar, pelos conselhos e por cada momento de ensinamento e descontração.

A minha amiga e aluna de iniciação científica Amanda Domingues pelo auxílio, pelo carinho e pela chance de ensinar.

Aos pacientes e funcionários do CTR-DIP-Orestes Diniz.

Ao departamento de pós-graduação em Biologia Celular e a Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

‘Enquanto houver um louco, um poeta e um amante haverá sonho e enquanto houver sonho, amor e fantasia, haverá esperança.’

(William Shakespeare)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através da molécula CTLA-4.....	32
FIGURA 2. Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas granzima B e perforina.....	34
FIGURA 3. Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas CD39 e CD73.....	35
FIGURA 4. Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas CD95 e CD95L.....	36
FIGURA 5. Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas PD1 e PD1-L.....	38
FIGURA 6. Estratégia de análise dos linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ do sangue periférico expressando moléculas de superfície/intracitoplasmáticas.....	49
FIGURA 7. Estratégia de análise do percentual de linfócitos T CD4 ⁺ , linfócitos T CD8 ⁺ e monócitos do sangue periférico expressando caspase 3.....	50
FIGURA 8. Análise do percentual de células T CD4 ⁺ CD25 ^{High} FOXP3 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca.....	53
FIGURA 9. Análise do percentual de células T CD4 ⁺ caspase 3 ⁺ , células T CD8 ⁺ caspase 3 ⁺ e células CD14 ⁺ caspase 3 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca após estimulação por antígenos do T. cruzi.....	54
FIGURA 10. Análise do percentual de células T CD4 ⁺ CD25 ^{High} FOXP3 ⁺ CD39 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca.....	56
FIGURA 11. Análise de correlação entre a frequência de células T CD4 ⁺ CD25 ^{High} FOXP3 ⁺ CD39 ⁺ e de células CD14 ⁺ caspase 3 ⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada, após estimulação in vitro com antígenos do T. cruzi.....	57

FIGURA 12. <i>Análise do percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca.....</i>	58
FIGURA 13. <i>Análise de correlação entre células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ e células CD14⁺ caspase 3⁺ e células CD8⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca, na ausência dos antígenos e após estimulação in vitro com antígenos do T. cruzi.....</i>	58
FIGURA 14. <i>Análise do percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca.....</i>	59
FIGURA 15. <i>Análise de correlação entre células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1⁺ e células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ CD4⁺ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca, após cultura na ausência dos antígenos do T cruzi.....</i>	60
FIGURA 16. <i>Análise do percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca</i>	61
FIGURA 17. <i>Análise de correlação entre células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ e células CD14⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada, após estimulação por antígenos do T cruzi.....</i>	61
FIGURA 18. <i>Análise da intensidade média de fluorescência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca.....</i>	63
FIGURA 19. <i>Análise de correlação entre a intensidade média de fluorescência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ e o percentual de células CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca, após cultura celular na presença dos antígenos do T. cruzi.....</i>	63
FIGURA 20. <i>Análise do percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca</i>	64

FIGURA 21. <i>Análise de correlação entre o percentual células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células CD4⁺ caspase 3⁺ ou células CD8⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada, após cultura celular na presença ou ausência dos antígenos do T cruzi.....</i>	66
FIGURA 22. <i>Análise de correlação entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células CD4⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca, após cultura celular na ausência dos antígenos do T. cruzi.....</i>	67
FIGURA 23. <i>Sumário dos resultados encontrados neste estudo, referentes à atividade supressora de células T reguladoras de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.....</i>	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. <i>Características da população estudada.....</i>	42
TABELA 2. <i>Relação dos anticorpos usados para caracterização das células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e monócitos.....</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- A2A-** Receptor de adenosina
- APAF-1-** Fator de ativação de apoptose 1
- ADP-** Adenosina difosfato
- AMP-** Adenosina monofosfato
- APC-** Alofocianina
- APC-Cy7-** Alofocianina-cianina 7
- AP1-** Proteína ativadora 1
- ATP-** Adenosina trifosfato
- B7.1-** Molécula co-estimulatória
- B7.2-** Molécula co-estimulatória
- BAX-** Proteína X associada a Bcl2
- BAK-** Proteína antagonista de Bcl2
- Bcl-XL-** Proteína antiapoptótica da família de Bcl2
- BH3-** Proteína da família Bcl2
- BID-** Domínio de interação apoptótico de BH3
- BSA-** Albumina sérica bovina
- C-** Citosina
- CAD-** DNase caspase ativada
- CARD-** Pacientes portadores da forma clínica cardíaca da doença de Chagas
- CCR6-** Receptor de quimiocina 6
- CD3-** Marcador de superfície celular de células T
- CD4-** Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD8-** Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD14-** Marcador de superfície de monócitos
- CD25-** Cadeia α do receptor da IL2
- CD28-** Marcador de superfície celular para molécula co-estimulatória
- CD39-** Ectoenzima responsável por degradar ATP
- CD45RO-** Marcador de superfície de linfócitos de memória
- CD62L-** Molécula L-selectina considerada molécula de ativação e adesão de leucócitos

CD73- Ectoenzima responsável por degradar AMP

CD80- Proteína que fornece sinal co-estimulatório para ativação de linfócitos T

CD86- Proteína que fornece sinal co-estimulatório para ativação de linfócitos T

CD95- Receptor de morte celular da superfamília dos receptores de necrose tumoral

CD95L- Membro da Superfamília de Ligantes de Fatores de Necrose Tumoral

CD103- Integrina alfa E

CD127- Receptor da citocina IL-7

CDG- Pacientes portadores da forma clínica cardiodigestiva da doença de Chagas

c-FLIP- Proteína que modula a atividade de FADD

CpQRR- Centro de Pesquisas Rene Rachou

CTLA-4- Molécula de superfície inibidora da ativação celular

CTR-DIP- Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

DC- Células Dendríticas

DED- Domínios de morte celular efetores

DD- Domínio de morte celular

DIG- Pacientes portadores da forma clínica digestiva da doença de Chagas

DISC- Complexo de sinalização intracelular indutor de apoptose

DN- Célula duplo negativa CD4⁻ CD8⁻

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ECG- Ecocardiograma

EDTA- Etilenodiaminotetracético

ENDOG- Proteína mitocondrial liberada após ação da granzima B

FADD- Molécula adaptadora que liga o CD95 a outros receptores de apoptose

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

FL- Fluorescência

FLICE- Proteína Inibitória de FADD

FOXP3- Repressor de transcrição forkhead box P3

FSC- Tamanho

GITR- Receptor induzido por glicorticóide
GITRL- Ligante do receptor GITR
HAS- Hipertensão arterial sistêmica
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR- Molécula de histocompatibilidade de classe II (MHC II)
HtrA2/OMI- Serino protease mitocondrial
ICAD- Inibidor da DNase caspase ativada
ICT- Índice cardio-torácico
IDO- Enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase
IL-Interleucina
IL1- Interleucina 1
IL1-β- Interleucina 1 beta
IL2- Interleucina 2
IL2R- Receptor da interleucina IL2
IL4- Interleucina 4
IL6- Interleucina 6
IL7- Interleucina 7
IL10- Interleucina 10
IL12- Interleucina 12
IL17- Interleucina 17
IL18- Interleucina 18
IL27- Interleucina 27
IL35- Interleucina 35
IND- pacientes portadores da forma clínica indeterminada da doença de Chagas
INF-γ-Interferon gamma
ITAM- Motivo imunoreceptor ativador baseado em tirosina
ITIM- Motivo imunoreceptor inibitório baseado em tirosina
ITSM- Motivo imunoreceptor de troca baseado em tirosina
LVEF- Fração de ejeção ventricular esquerda
LVDD- Diâmetro diastólico ventricular esquerdo
MFF- Solução fixadora
mL- Mililitro
mM- Milimolar

mmHg- Milímetro de mercúrio
NFKB- fator nuclear Kb
NK- células natural killer
nm- Nanometro
PBS- Tampão fosfato salínico
PBS-P- PBS W a 0,5% de saponina
PBS-W- PBS a 0,5% de albumina sérica
PE- Ficoeritrina
PE-Cy7- Ficoeritrina cianina 7
PERCP- Cloreto de peridina clorofila
PERCP-Cy5.5- Cloreto de peridina clorofila cianina 5.5
PD1- Receptor de morte celular programada 1
PD1-L- Ligante 1 do receptor de morte celular programada
PD2-L- Ligante 2 do receptor de morte celular programada
PHA- Mitógeno Fitohemaglutinina
PI3K- Fosfatidilinositol 3 quinase
PTEN- Proteína homóloga de tensina e fosfatase
ROR γ - Fator de transcrição membro da família NR1
RPM- Rotações por minuto
RPMI- Meio de cultura celular
SHP-2- Proteína tirosina fosfatase
SSC- Granulosidade
TCR- Receptor de linfócitos T
TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta
Th1- Células T auxiliares 1
Th2- Células T auxiliares 2
Th3- Célula T auxiliares 3
Th17- Células T auxiliaries 17
TNF- α -Fator de necrose tumoral alfa
Tr1- Célula T reguladora 1
TREG- Células T reguladoras
ZAP-70- Proteína quinase expressa por células linfócitos T e células NK

RESUMO

As células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (Treg) foram descritas como sendo células com capacidade de controlar a resposta imune através da supressão de células apresentadoras de antígeno e células T efectoras. Vários mecanismos supressores induzidos por estas células têm sido propostos na infecção causada pelo protozoário *T. cruzi* como, apoptose e secreção de citocinas. Contudo, o papel das células Treg na doença de Chagas humana ainda não foi estabelecido. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de marcadores de apoptose em células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ de pacientes com as formas clínicas IND e CARD (CCV). Para isso, foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) e em seguida avaliada a frequência de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, bem como a expressão das seguintes moléculas de superfície e intracitoplasmáticas por estas células: CD39, CD95, CD95L, PD1, PD-1L e IL-17. O sangue de indivíduos não infectados (NI) foi utilizado como controle. Os resultados confirmaram a maior frequência de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ em pacientes do grupo IND do que em pacientes dos grupos CARD e NI. A avaliação da expressão de CD39 e CD95L pelas células Treg, indicou maior expressão destas moléculas em pacientes do grupo IND se comparado com pacientes do grupo CARD ou NI. Já as células Treg de pacientes do grupo CARD apresentaram maior intensidade média de fluorescência para o receptor CD95 do que as células Treg de pacientes dos grupos IND ou NI. Observamos também correlação positiva na expressão das moléculas PD1 e PD1-L na superfície das células Treg de pacientes do grupo CARD. Com relação à expressão IL-17, os resultados mostraram maior frequência de células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺IL-17⁺ em pacientes do grupo IND. Por fim, identificamos que os monócitos são as células que mais sofrem apoptose em todos os grupos estudados. Diante disso, os dados permitiram concluir que a citocina IL-17 possui provavelmente papel importante no desenvolvimento da fase crônica da doença de Chagas. Além disso, a expressão diferencial de cada molécula indutora de apoptose e seus receptores sugere que mecanismos supressores distintos possam estar atuando em cada forma clínica da doença de chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, apoptose e células T reguladoras.

ABSTRACT

The regulatory T cells CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ (Treg) were described as cells with the capacity to control the immune response through the suppression of antigen presenting cells and effector T cells. Many mechanisms induced by these cells have been proposed in the *T. cruzi* infection, as apoptosis and cytokines secretion. However, the role of Treg cells in human Chagas disease is not established yet. Then, the aim of this study was to evaluate the expression of apoptotic molecules in regulatory T cells CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ of patients with the clinical forms IND and CARD (CCCV). Thereunto, peripheral blood samples of patients with indeterminate form (IND) and cardiac form (CARD) were collected. Posteriorly, we evaluate the frequency of T cells CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, as well as the expression of the following surface and intracytoplasmic molecules: CD39, CD95, CD95L, PD1, PD-1L e IL-17. Peripheral blood samples of non-infected individuals (NI) were used as control. The results confirmed the higher frequency of T cells CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ in patients of IND group than CARD and NI groups. The evaluation of CD39 and CD95L expression by Treg cells, showed higher expression of those molecules in patients of IND group than patients of CARD or NI groups. However, Treg cells of CARD patients presented higher mean intensity of fluorescence related to CD95 expression than Treg of IND or NI patients. We observed positive correlation in the expression of both PD1 and PD1-L in the surface of Treg of CARD patients. The results also showed higher frequency of T cells CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺IL-17⁺ in patients of the IND group. After all, we identified monocytes as the main cells that undergo apoptosis in the different studied groups. In conclusion, the secretion of IL-17 is probably important in the development of chronic phase of Chagas disease. Moreover, the differential expression of each apoptosis-inducing molecule and their receptors suggest that distinct mechanisms may be presented in each clinical form of Chagas disease.

Keywords: Chagas Disease, apoptosis and regulatory T cells.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1.0-INTRODUÇÃO.....	20
<i>1.1 - A doença de Chagas.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2 - A resposta imune na infecção pelo T. cruzi.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3 - Imunorregulação e as células T reguladoras.....</i>	<i>27</i>
<i>1.4- Os mecanismos de supressão das células T reguladoras.....</i>	<i>30</i>
2.0-JUSTIFICATIVA.....	40
3.0-OBJETIVOS.....	41
<i>3.1-Objetivo Geral.....</i>	<i>41</i>
<i>3.2-Objetivos específicos.....</i>	<i>41</i>
4.0-MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
<i>4.1-Characterização da população de estudo.....</i>	<i>42</i>
<i>4.1.1-Critérios de exclusão.....</i>	<i>43</i>
<i>4.2-Obtenção do antígeno solúvel de Trypanosoma cruzi (TRIPO).....</i>	<i>44</i>
<i>4.3- Análise da expressão de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, células efetoras e monócitos após estimulação in vitro por antígeno do T. cruzi.....</i>	<i>45</i>
<i>4.4-Obtenção e análise dos dados no citômetro de Fluxo.....</i>	<i>47</i>
<i>4.5-Análise Estatística.....</i>	<i>51</i>

5.0-RESULTADOS	52
5.1-Avaliação do percentual de células T reguladoras $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada após estimulação <i>in vitro</i> por antígenos do <i>T. cruzi</i>	52
5.2- Avaliação da apoptose de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e células $CD14^+$ através da expressão de caspase 3 na presença de antígenos do <i>T. cruzi</i> em cada grupo de indivíduos não infectados e de pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de chagas.....	53
5.3- Caracterização de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ quanto a expressão de moléculas indutoras de apoptose e seus receptores do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando a forma clínica indeterminada e cardíaca após estimulação <i>in vitro</i> por antígenos do <i>T. cruzi</i> ...	55
5.4-Avaliação da expressão de IL-17 por células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando a forma clínica indeterminada e cardíaca após estimulação <i>in vitro</i> por antígenos do <i>T. cruzi</i>	64
6.0-SUMÁRIO DOS RESULTADOS	68
7.0-DISCUSSÃO	69
8.0-CONCLUSÃO	77
9.0-REFERÊNCIAS	78
10.0-ANEXO I: PRODUÇÃO CIENTÍFICA	99

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - A Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). Atualmente, a doença afeta cerca de 14 milhões de pessoas e 60 milhões de indivíduos estão em risco de infecção na América Latina (DE ALMEIDA, *et. al.*, 2011). Apesar dos grandes avanços obtidos no controle da transmissão natural, cerca de 50.000 novos casos ocorrem a cada ano e cerca de 21.000 pacientes morrem anualmente de causas relacionadas à doença de chagas (DIAS, *et al.*, 2008; ROCHA, *et. al.*, 2009).

A principal forma de transmissão da doença ao homem é a transmissão vetorial, considerada, ainda hoje, responsável por mais de 70% dos casos em países em que não existe controle vetorial sistemático (COURA & DIAS, 2009). É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos à Argentina (VINHAES & DIAS, 2000). São mais de cem espécies de vetores responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi*, intervindo diretamente na sua veiculação ao ambiente domiciliar (VINHAES & DIAS, 2000). O inseto se torna infectado após se alimentar do sangue de animais ou humano infectado. Uma vez no interior do vetor, os parasitos dividem rapidamente no intestino do inseto antes de serem eliminados nas fezes. Quando o inseto vetor inicia a ingestão de sangue novamente, ele defeca na pele do hospedeiro depositando, desta forma, o *T. cruzi*. O parasito é capaz de infectar o novo hospedeiro se houver ferida na pele - pela picada do inseto ou através de outros cortes ou abrasões ou mesmo através da mucosa dos olhos ou boca. Pode haver a infecção das células abaixo da pele e então entrar na corrente sanguínea e circular para alcançar outros tecidos do corpo (CLAYTON, 2010).

Além da infecção vetorial, outras formas de transmissão podem ocorrer como por transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e em acidentes de laboratório (TOSO, *et. al.*, 2011). Alternativamente, pessoas e animais podem se tornar infectados oralmente através da ingestão de alimentos e bebidas contaminados com as fezes do inseto vetor contendo o parasito (CLAYTON, 2010). Recentemente, ocorreram surtos da doença de Chagas após a ingestão de bebidas, como suco de cana e açaí, contaminados com as formas tripomastigotas. Essa contaminação ocorreu, provavelmente, no momento do preparo dos sucos quando os insetos vetores silvestres infectados foram triturados e/ou suas

fezes contaminaram o alimento. Este evento pode indicar a presença de insetos que albergam o parasito em áreas onde se acreditava já estar controlada a transmissão vetorial. Devido a essas formas de transmissão já detectadas, fica claro que deve existir um controle melhor dessa doença, seja em países onde ela é endêmica, como também nos países onde não existe endemia, uma vez que ela pode se tornar endêmica em decorrência das formas não vetoriais de infecção (STEINDEL, *et. al.*, 2008).

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia, detectada por esfregaço sanguíneo fresco, parasitismo de muitos tipos celulares, principalmente fibras musculares e inflamação (MONCAYO, 2003; TEIXEIRA, *et. al.*, 2006). Frequentemente a fase aguda não é percebida pelos pacientes, visto que 95% dos casos são assintomáticos. Nos casos sintomáticos remanescentes, as manifestações são febre, mal estar, dor muscular, sonolência, cólicas e diarreia, edema, distúrbios respiratórios e cianose. A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* possui curta duração, que dura de seis a oito semanas, que geralmente entra em remissão espontaneamente e inicia-se, então, a fase crônica (MONCAYO, 2003, TEIXEIRA, *et. al.*, 2006).

A fase crônica é caracterizada por escasso parasitismo tecidual e baixa parasitemia (ROCHA, *et al.*, 2009). O diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos parasito-específicos por técnicas como ELISA, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (APT B, *et. al.*, 2008; RODRIGUES, *et. al.*, 2012). Os pacientes nesta fase podem ser classificados, baseado nos aspectos clínicos, como pertencentes à forma: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardiodigestiva (CDG) (WHO, 2000).

A forma clínica IND é observada na maioria dos pacientes (50-60%), que podem permanecer assintomáticos por períodos de tempo longos e variáveis. Esses pacientes apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi* e exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos (silhueta cardíaca, esôfago e cólon) normais (DIAS, 1989). No entanto, exames adicionais e mais sofisticados podem demonstrar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto evolução da morbidade associada à doença como apenas resquícios de processo agudo ou crônico inicial já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica (DIAS, 2000; ROCHA, *et. al.*, 2003). Estudos utilizando biópsias endomiocárdicas de pacientes indeterminados acometidos de morte súbita mostraram a presença de miocardite focal discreta, que se torna mais intensa com a progressão da doença para formas mais severas

(ANDRADE, 2005, ROCHA, *et. al.*, 2009). Os focos inflamatórios que aparecem no coração durante a forma IND da doença de Chagas apresentam um ciclo evolutivo, com atração de células inflamatórias que aparecem como que inibidas no seu potencial agressivo, mas que se acumulam no tecido intersticial acompanhadas por certo grau de fibrose (ANDRADE, 2005). Após algum tempo, as células inflamatórias são removidas por apoptose, enquanto o ligeiro excesso de matriz sofre degradação e reabsorção. Com base nestes dados ultra-estruturais, as lesões da miocardite focal da forma clínica IND foram interpretadas como sujeitas a um ciclo evolutivo, autolimitado, equilibrado pelo aparecimento de algumas lesões e desaparecimento de outras, o que permite a longa sobrevivência e ausência de sintomas do hospedeiro (ANDRADE, 2005).

Entre as diferentes formas clínicas, a forma cardíaca é a mais expressiva manifestação da doença de Chagas, devido a sua severidade. Geralmente esta forma inicia entre a segunda e quarta décadas da vida (COURA, 2007). Cerca de 5 a 15 anos após o início da infecção, aproximadamente, 30 a 40% dos indivíduos podem apresentar arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueios de ramo e tromboembolismo (DE REZENDE, 1979, COURA, 2007). Além disso, o coração dos pacientes cardíacos apresenta hipertrofia cardíaca e dilatação, frequentemente, se tornando duas vezes maior que o coração de um indivíduo não infectado (TEIXEIRA, *et. al.*, 2006, MARCON, *et. al.*, 2011). Estudos microscópicos demonstraram em pacientes da forma clínica cardíaca da doença de Chagas a presença de infiltrado inflamatório e lise de células alvo. Estes infiltrados inflamatórios são formados por macrófagos e linfócitos que migram para os vasos linfáticos dilatados e superfície do epitélio cardíaco. Estas células mononucleares do sistema imune invadem o coração e provocam a lise de células cardíacas não infectadas pelo parasito, visto que apenas 10 a 20% dos casos crônicos apresentam ninhos da forma amastigota em células cardíacas e o parasito é encontrado frequentemente em áreas do miocárdio onde não há infiltrado inflamatório (TEIXEIRA, *et. al.*, 2006). Contudo, a perda de cardiomiócitos e a consequente substituição por tecido fibrótico parecem induzir ruptura das fibras e fascículos do músculo estriado cardíaco. Estas mudanças podem causar insuficiência cardíaca e arritmias ventriculares (TOSTES, *et. al.*, 2005). Danos ao sistema nervoso autônomo, especialmente o ramo parassimpático, podem também contribuir para um pior prognóstico entre esses pacientes (ROCHA, *et. al.*, 2009).

Com relação à forma clínica digestiva da doença, as manifestações clínicas resultam da disfunção do peristaltismo do esôfago e do colón causada pela destruição de plexos

entéricos que conseqüentemente ocasionam o megaesôfago e o megacólon (COURA, 2007). Estas alterações resultam de infiltrados inflamatórios das camadas internas e externas de células musculares lisas da parede do trato digestivo. Desta forma, lesões inflamatórias afetam principalmente neurônios parassimpáticos no interior da parede das vísceras (TEIXEIRA, *et. al.*, 2006). Estudos sugerem que a denervação do trato digestivo levaria a perda da coordenação motora, acalásia esfínteriana, hipertrofia muscular e dilatação, com conseqüente perda do peristaltismo esofágico e falta de relaxamento do esfíncter inferior às deglutições (ANDREOLLO & MALAFAIA, 2009). A prevalência das manifestações digestivas durante a fase crônica da doença varia consideravelmente em diferentes áreas endêmicas (LAGES-SILVA, *et. al.*, 2001). A forma clínica cardiodigestiva é menos comum, estando associada a alterações tanto no sistema cardiovascular como no sistema digestivo (Moncayo, 2003; Andrade, 1999).

Acredita-se que estas diferentes manifestações da doença de Chagas são conseqüência de múltiplos fatores ligados tanto ao parasito (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inoculo) como ao hospedeiro humano (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) (DIAS, 2000).

1.2 - A resposta Imune na infecção pelo *T. cruzi*

A resposta imune do hospedeiro possui papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, causando o controle da parasitemia durante a fase aguda e/ou a participação no desenvolvimento patológico durante a fase crônica (D'ÁVILA, *et. al.*, 2009).

Logo após o início da infecção aguda, componentes do *T. cruzi* incluindo o DNA e a membrana glicoconjugada desencadeiam a resposta inata através de receptores do tipo Toll 2, 4 e 9 em macrófagos e células dendríticas (CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009). Após ativação estas células secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, regulam positivamente a expressão de receptores co-estimulatórios, aumentam a endocitose e a morte intracelular dos parasitos através da secreção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (VESPA, *et. al.*, 1994; CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009). Citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, TNF- α são secretadas e ativam outras células inflamatórias (CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009).

A resistência do hospedeiro na infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* é dependente de ambas as respostas inata e adquirida mediada por macrófagos, células *natural*

killer (NK), células T CD4⁺, células T CD8⁺ e células B (REYES, *et. al.*, 2006). Macrófagos e células dendríticas endocitam os parasitos e elicitam subseqüentemente a resposta adquirida contra o *T. cruzi*. (CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009). Camundongos deficientes em células B ou linfócitos auxiliares e citotóxicos são altamente susceptíveis à infecção (MARINHO, *et. al.*, 1999; TARLETON, *et. al.*, 1992). Vários estudos demonstraram a importância dos anticorpos para a sobrevivência e eliminação dos parasitos. Contudo, tem sido descrito que células B de camundongos infectados agudamente com *T. cruzi* mostraram uma reduzida reatividade a antígenos do parasito *in vitro*. Minoprio *et. al.* (1986) propuseram que a imunossupressão humoral ao parasito observada durante a fase aguda da infecção ocorre devido ao fato de células B específicas para o *T. cruzi* estarem excedidas em número por células policlonais ativadas que produzem anticorpos não específicos e falham ao tentar se ligar em antígenos do parasito (ZUÑIGA, *et. al.*, 2000). Apesar disto, células B produzem diferentes citocinas após estimulação, como interferon- γ (IFN- γ), IL-10 e IL-12 (MENGEL, *et. al.*, 1992; PANG, *et. al.*, 1992). Conseqüentemente, células B podem contribuir com a regulação da diferenciação funcional de células T em células T auxiliares 1 (Th1) ou células T auxiliares 2 (Th2) (CARDILLO, *et. al.*, 2007).

As células B participam da ativação de células T durante a fase aguda da doença de chagas. Desta forma, células T específicas para o *T. cruzi* produtoras de IFN- γ são então geradas e migram junto com outros leucócitos para o sitio de inflamação induzido pelo parasito (TEIXEIRA, *et. al.*, 2002; CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009). IFN- γ tem a capacidade de ativar macrófagos e inibir a replicação intracelular do parasito, através da indução de espécies reativas de nitrogênio (SILVA, *et. al.*, 1992; VESPA, *et. al.*, 1994; ALIBERTI, *et. al.*, 1996; CARDILLO, *et. al.*, 1996; BOGDAN, 2001). O papel protetor do IFN- γ sugere que o controle do parasito é dependente de células Th1 na resposta imune (MARINHO, *et. al.*, 1999). Estas células T inflamatórias levam ao controle, mas não a completa eliminação do parasitismo tecidual e sanguíneo (CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009).

Interessantemente, o parasito está presente em pacientes assintomáticos e pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas (JONES, *et. al.*, 1993; BOCCHI, *et. al.*, 1996; ZHANG & TARLETON, 1999; ELIAS, *et. al.*, 2003). A persistência do parasito depende de uma combinação de fatores, incluindo liberação de moléculas que interferem com a resposta imune. Alguns estudos demonstraram que o *T. cruzi* suprime a ativação de linfócitos, um evento que depende da quantidade de parasitos (DOS REIS, *et. al.*, 2011). Além disso, a depleção de células T pode ser observada durante o pico da parasitemia. Desta

forma, a manutenção do parasito em tecidos do hospedeiro é o resultado de estratégias evasivas utilizadas pelo *T. cruzi*.(MAYA, *et. al.*, 2010).

Durante infecção crônica, a resposta imune adaptativa tem sido considerada por décadas como a mais importante. Porém, estudos recentes sugerem a importância da resposta imune inata como mecanismo regulatório no controle da morbidade. Souza *et. al.* (2007) relataram a capacidade do *T.cruzi* em induzir a expressão diferencial de moléculas co-estimuladoras por monócitos nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Monócitos de pacientes nas formas clínicas indeterminada e cardíaca após estimulação com *T. cruzi* apresentaram aumentada expressão de CD80 e reduzida expressão de CD86 apenas por monócitos dos pacientes da forma clínica cardíaca (SOUZA, *et. al.*, 2007). Além disso, os monócitos dos pacientes na forma clínica cardíaca após estimulação com *T. cruzi* expressam altos níveis de TNF- α e podem estar relacionados com a resposta inflamatória (SOUZA, *et. al.*, 2004).

Vitelli-Avellar *et. al.* (2005) demonstraram frequência aumentada de células NK em pacientes com a forma clínica indeterminada, sugerindo possível papel protetor desta população celular. A capacidade citotóxica das células NK pode então contribuir com o controle do parasitismo tecidual em pacientes com a forma clínica indeterminada, evitando a resposta deletéria relatada em pacientes com a forma clínica cardíaca e realizada pelas células T CD8⁺.

Com relação à resposta imune celular, pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca apresentam alta frequência de células T ativadas na corrente sanguínea (DUTRA, *et. al.*, 1994). Além disso, células T ativadas são o principal componente do infiltrado inflamatório de pacientes cardíacos (REIS, *et. al.*, 1993). Existem fortes evidências do envolvimento dessas células no desenvolvimento da patologia (DUTRA & GOLLOB, 2008). Villani *et. al.* (2010) mostraram que as células T CD4⁺CD8⁻ (DN) apresentam papel importante na doença de Chagas, uma vez ocorre expansão desta população celular de pacientes com as formas clínicas indeterminada ou cardíaca após estimulação com *T. cruzi*. Contudo, células T DN $\alpha\beta$ produzem citocinas inflamatórias em ambas às formas clínicas da doença e as células T DN $\gamma\delta$ apresentam expressão aumentada de IL-10 em pacientes com a forma clínica indeterminada (VILLANI, *et. al.*, 2010).

O infiltrado cardíaco de pacientes com a forma clínica cardíaca apresenta uma razão de 2:1 de células T CD8⁺ em relação às células T CD4⁺, sugerindo o papel da citotoxicidade no dano tecidual cardíaco (HIGUCHI, *et. al.*, 1993). Vitteli-Avelar *et. al.* (2006)

demonstraram que linfócitos T CD8⁺ de pacientes com a forma clínica indeterminada possuem um elevado potencial migratório, o que seria importante no controle do parasitismo tecidual. Além disso, pacientes com a forma clínica indeterminada apresentam maior frequência de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ do que indivíduos não infectados e pacientes com a forma clínica cardíaca (VITTELI-AVELAR, *et. al.*, 2006). Porém, estes pacientes também apresentam maior atividade de células da imunidade inata (VITTELI-AVELAR, *et. al.*, 2006). Os pacientes com a forma clínica cardíaca também apresentam maior frequência de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ se comparado com indivíduos não infectados (VITTELI-AVELAR, *et. al.*, 2006). Além disso, pacientes na fase crônica da doença de chagas apresentam percentual aumentado de células T CD8⁺CD28⁻ (DUTRA, *et. al.*, 1996). Estudos mostram que a expressão de CD28 está relacionada com a função citotóxica exacerbada (AZUMA, *et. al.*, 1993). Desta forma, Menezes *et. al.* (2004) identificaram correlação negativa entre a produção de citocinas inflamatórias e a frequência de células T CD8⁺CD28⁺ em pacientes com a forma clínica cardíaca, ou seja, quanto menor a frequência destas células, maior a expressão de citocinas inflamatórias (MENEZES, *et. al.*, 2004).

Estudos também demonstraram que os linfócitos T CD4⁺ de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de chagas são os maiores produtores de IFN- γ (GOMES, *et. al.*, 2003). Outros trabalhos demonstraram em pacientes com a forma clínica cardíaca, que quanto maior o grau de acometimento do coração, maior é a relação IFN- γ /IL-10 após a estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por antígenos de *T. cruzi*. No entanto, pacientes portadores da forma clínica indeterminada apresentam os menores valores da relação IFN- γ /IL-10 quando comparados aos demais grupos de pacientes (GOMES, *et. al.*, 2003). Outros estudos também relatam uma expressão diferencial de citocinas inflamatórias em lesões cardíacas, especialmente TNF- α e IFN- γ (REIS, *et. al.*, 1993; HIGUCHI, *et. al.*, 1993). Considerando a natureza de longa duração da cardiopatia chagásica e o fato de pacientes com a forma clínica indeterminada também serem capazes de produzir citocinas inflamatórias, apesar da ausência da detecção de patologia, é claro que mecanismos imunorreguladores estão presentes durante a infecção e podem influenciar na evolução clínica da doença (DUTRA & GOLLOB, 2008).

1.3 - Imunorregulação e as células T reguladoras

O sistema imune possui potentes mecanismos para eliminação de microrganismos patogênicos e células infectadas e mecanismos reguladores em paralelo para manter células efetoras sobre controle durante condições fisiológicas e após ativação induzida por um processo inflamatório. A regulação efetiva do processo inflamatório é necessária para reduzir dano tecidual causado por uma ativação imune excessiva (KONDĚLKOVÁ, 2010).

Em 2003, um subtipo de célula T chamadas de células T reguladoras (Treg) foi identificado como parte essencial para o controle de processos inflamatórios. (KONDĚLKOVÁ, 2010). Recentemente tem se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante infecções (RAGHAVAN & HOLMGREN, 2004). A presença de células T co-expressando CD4 e altos níveis da molécula CD25 foi descrita como sendo células caracterizadas como anérgicas em respostas a estímulos policlonais, com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular (BAECHER-ALLAN, *et. al.*, 2001).

Outras moléculas também podem ser utilizadas para o estudo destas células e caracterização de seu fenótipo regulador. Dentre essas moléculas destacam-se CTLA-4, CD103, CD62L, CD45RO (BAECHER-ALLAN, *et. al.*, 2001). Além disso, o receptor induzido por glicocorticóide (GITR), da família do TNFR (SHIMIZU, *et. al.*, 2002; YI, *et. al.*, 2006), a baixa expressão de uma subunidade do receptor de IL-7, chamada de CD127 e o fator de transcrição FOXP3 (FONTENOT, *et. al.*, 2003; KONDĚLKOVÁ, *et. al.*, 2010) são marcadores adicionais. A alta expressão do gene FOXP3 em células CD4⁺CD25^{high} e a baixa expressão deste gene em células T virgens e em células T CD4⁺CD25⁻ recém ativadas, sugerem que a expressão de FOXP3 é fator determinante no desenvolvimento das células T reguladoras (FONTENOT, *et. al.*, 2003; KHATTRI, *et. al.*, 2003; HORI & SAKAGUCHI, 2004). Esta função foi claramente demonstrada em animais “knockout” para FOXP3, visto que ocorre perda da regulação e desenvolvimento de doença autoimune (HORI, *et. al.*, 2003; FONTENOT, *et. al.*, 2003).

Existem duas populações de células T reguladoras: as induzidas (ou adaptativas) e as naturais (ou constitutivas) (MILLS, 2004). A população de células T reguladoras induzidas inclui diferentes subtipos de células T: células T reguladoras 1 (Tr1), que secretam altos níveis de IL-10, nenhuma secreção de IL-4 e nenhum ou baixos níveis de IFN- γ , além de não expressarem FOXP3 e as células T helper 3 (Th3), que secretam altos níveis de TGF- β

(MILLS, 2004). Acredita-se que as células Th3 e Tr1 sejam a mesma célula secretando diferentes citocinas dependendo do estado de ativação, sítio de ativação e localização tecidual (BATTAGLIA, *et. al.*, 2002).

A função primária das células T reguladoras foi originalmente definida como prevenção de doenças auto-imunes através da manutenção da tolerância (SAKAGUCHI, *et. al.*, 1995). No decorrer dos anos, várias funções adicionais têm sido sugeridas, entre elas está à supressão de processos alérgicos e asma, indução de tolerância quanto a antígenos alimentares, prevenção ou limitação da reatividade a antígenos próprios e patógenos, supressão de células efectoras e consequente redução da intensidade de inflamação e manutenção da homeostase antígeno específica de células T (CORTHAY, 2009; LAW, *et. al.*, 2009).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado o duplo papel das células T reguladoras, por um lado controlando a exacerbação da inflamação e o dano tecidual e por outro lado auxiliando na persistência do patógeno (MILLS, 2004). O equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores pode determinar o progresso da infecção e em alguns casos ser mutuamente benéfico para o parasito e para o hospedeiro (MENDEZ, *et. al.*, 2004). Estes dados são confirmados através de estudos feitos em modelos de camundongos infectados com *Plasmodium yoelli*, onde a depleção de células T reguladoras protege o camundongo da morte, pois restaura o número de células efectoras contra o parasito, controlando a infecção (HISAEDA, *et. al.*, 2004). Estudos realizados em camundongos infectados com *Candida albicans* mostram ainda que a redução de células T reguladoras induz um melhor controle da infecção, entretanto, aumenta a inflamação patológica gastrointestinal (MONTAGNOLI, *et. al.*, 2002).

Por outro lado, em algumas situações o aumento no número de células T reguladoras pode conduzir para a reativação da doença. Estudos demonstram que em camundongos portadores da infecção crônica por *Leishmania*, a transferência de células T reguladoras purificadas derivadas de outros camundongos, também na fase crônica da infecção, é suficiente para disparar a reativação da doença e inibição da resposta efectora de memória (MENDEZ, *et. al.*, 2004). Estudos adicionais em camundongos portadores da infecção por *Leishmania* confirmam que a produção de IL-10 por células T reguladoras contribui diretamente para a persistência do parasito através da modulação da função de células apresentadoras de antígeno ou inibição da produção de citocinas por células do tipo Th1, sugerindo que o equilíbrio estabelecido entre células T reguladoras e efectoras nos sítios da

infecção crônica podem refletir estratégias de sobrevivência tanto do parasito quanto do hospedeiro (BELKAID, *et. al.*, 2002).

Com relação à infecção pelo *T. cruzi*, Kotner & Tarleton (2007) relataram que camundongos infectados com *T. cruzi* apresentam células T reguladoras no sangue periférico e em todos os tecidos linfóides e não linfóides por eles analisados, como tecido muscular, baço e linfonodos. Outro estudo demonstrou que as células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ migram para o coração de camundongos infectados com *T. cruzi* e suprimem células T $CD4^+$ e $CD8^+$ (MARIANO, *et. al.*, 2008). Além disso, ao bloquear moléculas específicas expressas pelas células T reguladoras como CD25 ou GITR ocorre aumento da mortalidade dos animais. O bloqueio da molécula GITR causa também aumento da migração de células $CD4^+$ e $CD8^+$, aumenta a produção de TNF- α e o parasitismo tecidual (MARIANO, *et. al.*, 2008). Desta forma, as células T reguladoras demonstram estar envolvidas no controle da inflamação cardíaca, replicação do parasito e resistência do hospedeiro à infecção (MARIANO, *et. al.*, 2008).

Na doença de chagas humana, observa-se que pacientes com a forma clínica indeterminada apresentam frequência aumentada de células $FOXP3^+$ no tecido cardíaco, se comparado com indivíduos não infectados e pacientes com a forma clínica cardíaca (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2011b). Ao avaliar a cinética de expressão de FOXP3 em células T reguladoras na presença e ausência do antígeno *T. cruzi*, um estudo revelou expressão diferencial deste marcador em células de pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de chagas, sendo que as células T reguladoras dos pacientes com a forma clínica cardíaca da doença apresentaram expressão reduzida de FOXP3 após o terceiro dia de estímulo em comparação com as células T reguladoras dos pacientes com a forma clínica indeterminada (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012).

Corroborando com a maior expressão de FOXP3 no tecido cardíaco de pacientes com a forma clínica indeterminada, pacientes com esta forma clínica também apresentam maior frequência de células T reguladoras $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ no sangue periférico (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2007, 2011, 2012). Portanto, com o intuito de avaliar a atividade supressora destas células, De Araújo *et. al.* (2012) demonstraram que PBMC de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de chagas são capazes de proliferar após estímulo com mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e em menor magnitude na presença das células T reguladoras. Contudo, antígenos inespecíficos não são capazes de aumentar a

frequência deste fenótipo celular em ambas as formas clínicas da doença de chagas, como ocorre após estímulo com antígeno *T. cruzi* (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012).

Ao relacionar parâmetros clínicos com a frequência de células T reguladoras, é possível observar uma correlação positiva entre a frequência das células T reguladoras e dois parâmetros clínicos de função cardíaca: fração de ejeção ventricular esquerda (LVEF) e o diâmetro diastólico ventricular esquerdo (LVDD). Estes parâmetros distintos estão diretamente e inversamente correlacionados com a melhor função cardíaca, respectivamente. De Araújo *et. al.* (2012) demonstraram correlação positiva entre a elevada LVEF e a maior frequência de células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ e correlação negativa entre o baixo LVDD e a alta frequência de células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$. Estes resultados sugerem que as células T reguladoras apresentam um papel imunorregulatório importante que leva a melhor função cardíaca em pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de chagas (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012). Contudo, os estudos deixam uma questão sem resposta: Quais são os mecanismos envolvidos na imunorregulação mediada por células T reguladoras na doença de Chagas e qual sua associação com o desenvolvimento da patologia desta infecção (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012).

1.4 - Os Mecanismos de supressão das células T reguladoras

Existem vários estudos relacionados aos mecanismos de supressão utilizados pelos linfócitos T reguladores. Diante destes trabalhos, torna-se claro que as células Treg não utilizam apenas um mecanismo de supressão, mas têm um arsenal de mecanismos reguladores à disposição. Estes podem ser divididos em quatro mecanismos de ação, tais como: citocinas inibitórias, citólise, ruptura metabólica e modulação da função das células apresentadoras de antígeno (APC) (WORKMAN, *et. al.*, 2009).

As citocinas inibitórias IL-10, TGF- β e IL-35 são expressas pelos linfócitos T reguladores e são consideradas o principal mecanismo de supressão utilizado por essas células (WORKMAN, *et. al.*, 2009). As citocinas IL-10 e TGF- β são bem conhecidas por suas atividades reguladoras, podendo ser produzidas por células T reguladoras $CD4^+CD25^{high}$ ou indiretamente por T $CD4^+CD25^-$ em situações de tolerância à infecções (LIU, *et. al.*, 2003).

Recentemente foi demonstrado que células T reguladoras também são capazes de secretar IL-17 (BERIOU, *et. al.*, 2009; VOO, *et. al.*, 2009). De acordo com Voo *et. al.*

(2009) o tecido linfóide humano possui uma subpopulação de células T reguladoras CD4⁺FOXP3⁺ que expressam CCR6 e tem a capacidade de produzir IL-17 após ativação. Estas células co-expressam FOXP3 e o fator de transcrição ROR γ t críticos para diferenciação e função de células T reguladoras e células Th17. Estudos demonstraram que estas células CD4⁺FOXP3⁺ produtoras de IL-17 mantêm a função supressora (VOO, *et. al.*, 2009).

Várias moléculas de superfície possuem papel como mediadoras da resposta supressora mediada por células T reguladoras. CD25, uma subunidade do receptor de IL2 (IL2R) está suprarregulado em células T efectoras e é constitutivamente expresso em altos níveis em células T reguladoras. Apesar de indispensável na homeostase de células T CD4⁺CD25^{high}, a elevada expressão de IL2R pode privar células T efectoras de IL-2 e assim inibir a proliferação destas células (JOSEFOWICZ, *et. al.*, 2012).

Outro mecanismo utilizado pelas células T reguladoras para suprimir células alvo é através da molécula CTLA-4. A expressão desta molécula nas células T CD4⁺CD25^{high} leva a inibição da ativação de células T por indução de um sinal negativo que coincide com a estimulação do TCR ou por co-estimulação inibitória competitiva devido à alta afinidade em ligar-se B7-1 e B7-2 quando comparado com CD28 (BAECHER-ALLAN, *et. al.*, 2001). CTLA-4 bloqueia a transmissão de sinal do TCR através da inibição da formação de ZAP-70, levando a uma mobilização de cálcio reduzida, o que limita a capacidade de proliferação das células T. Entre outros mecanismos propostos está a indução da atividade da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que degrada triptofano (WING, *et. al.*, 2010; MCGRATH & NAJAFIAN, 2012). A falta desse aminoácido essencial tem sido mostrada como causa da inibição da ativação de células T e, conseqüentemente, a apoptose dessas células (FALLARINO, *et. al.*, 2003).

Além disso, as células T reguladoras também podem controlar a função das células apresentadoras de antígeno através do CTLA-4 (FIGURA 1) (WING, *et. al.*, 2010). TANG *et. al.* (2006) mostraram que células T reguladoras in vivo formam duradouras interações com as células dendríticas (DCs) logo após entrarem nos linfonodos, e isso enfraquece a capacidade das DCs para, subseqüentemente, ativar células T efectoras, indicando que, in vivo, células Treg naturais podem inibir a resposta das células T indiretamente, pela modulação da função das APCs.

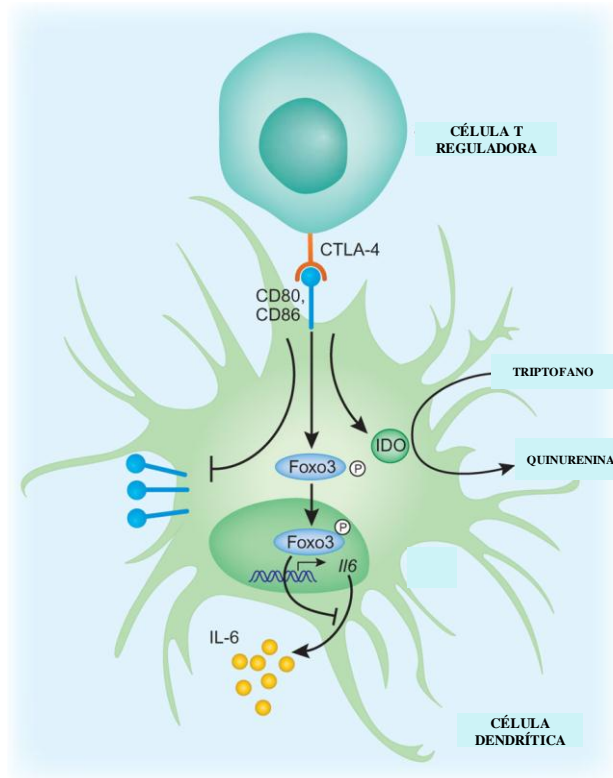


FIGURA 1: Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através da molécula CTLA-4. A interação do CTLA-4 de células T reguladoras pode desencadear a sinalização através de CD80/CD86 em células apresentadoras de antígeno. Além da modulação da expressão de CD80/CD86, estes sinais podem ativar a idoleamina 2-3 dioxigenase (IDO), que gera o mediador imunossupressor quinurenina. Estes sinais podem também promover a localização do fator de transcrição FOXO, que suprime a ativação de genes codificadores de IL-6 e a fosforilação do fator de necrose tumoral P. Modificado de WING et. al., 2003.

Células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ expressam altos níveis do receptor de fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide (GITR). GITR é um receptor que pertence a família dos receptores de TNF e é seletivamente ativado por seu ligante GITRL. O contato entre GITR expresso por células T reguladoras e GITRL modula a função das células dendríticas. Desta forma, modulando a atividade de células dendríticas pode alterar indiretamente a atividade de células T efetoras. Por outro lado, a interação entre GITR e GITRL de células T reguladoras e células T efetoras pode gerar 4 efeitos distintos: inibição por um curto período de tempo da atividade supressora de células T reguladoras por impedir a expressão de moléculas necessárias para atividade supressora; diminuição da sensibilidade de células T efetoras a supressão causada por células T reguladoras; indução de uma deleção parcial de células T $CD4^+CD25^{high}$ e promoção da proliferação de células T reguladoras

funcionalmente ativas (KRAUSZ, *et. al.*, 2007). Contudo, o bloqueio de GITR, utilizando anti-GITR inibe a função supressora de células T reguladoras *in vitro* e causa indução de autoimunidade (YANG, 2008).

Uma das moléculas altamente expressas em células CD4⁺CD25^{high} e que tem sua expressão reduzida via GITR é a granzima B (GONDEK, *et. al.*, 2005). Granzima B é uma serino protease, descoberta em 1986, secretada principalmente por células NK e células T citotóxicas. Contudo, estudos recentes mostraram que células humanas CD4⁺ também são capazes de sintetizar granzima B e perforina. Além disso, outros estudos demonstraram a alta expressão de granzima B em células T reguladoras ativadas (GONDEK, *et. al.*, 2005; ZHOU, 2010).

Uma questão interessante é como a granzima B pode causar apoptose de células alvo (FIGURA 2). Caspases 2, 3, 7, 8, 9 e 10 são substratos da granzima B. Desta forma, elas podem amplificar e conduzir a via de sinalização da apoptose (ZHOU, 2010). Contudo, a apoptose não pode ser completamente bloqueada utilizando inibidores de caspase. Isto sugere que existe uma via apoptótica independente de caspase entre células efectoras e células alvo. O domínio de interação apoptótico BH3 da proteína chamada de BID é alvo direto da granzima B. BID destrói a integridade da membrana externa mitocondrial e causa a liberação do citocromo C, endonuclease G e da serino protease mitocondrial HtrA2/OMI, moléculas pró-apoptóticas quando clivadas pela granzima B (ZHOU, 2010). HtrA2 /OMI é uma serino protease que pode bloquear a proteína inibidora de apoptose. Estudos também demonstraram que a granzima B é capaz de romper a membrana mitocondrial através de vias independentes de caspase e BID. A proteína X associada com Bcl-2 (BAX) e a proteína antagonista de Bcl-2 (BAK) estão relacionadas ao dano mitocondrial mediado por BID (ZHOU, 2010). No entanto, fibroblastos de camundongos com deficiência de BID, BAX e BAK podem ter a transmembrana mitocondrial rompida após tratamento com granzima B e perforina. Isto sugere que a granzima B realiza sua função apoptótica através de duas vias independentes de caspase. Uma via que necessita da participação de BID e outra via de ação direta sem a participação de mediadores citosólicos (ZHOU, 2010).

A granzima B pode, também, ativar diretamente nucleases apoptóticas responsáveis pela fragmentação do DNA. A proteína mitocondrial ENDOG que é liberada após a ação de granzima B via BID pode levar ao dano no DNA oligonucleosomal. Desta forma, a granzima B pode causar a fragmentação do DNA mesmo quando a ativação de caspases está inibida (ZHOU, 2010).

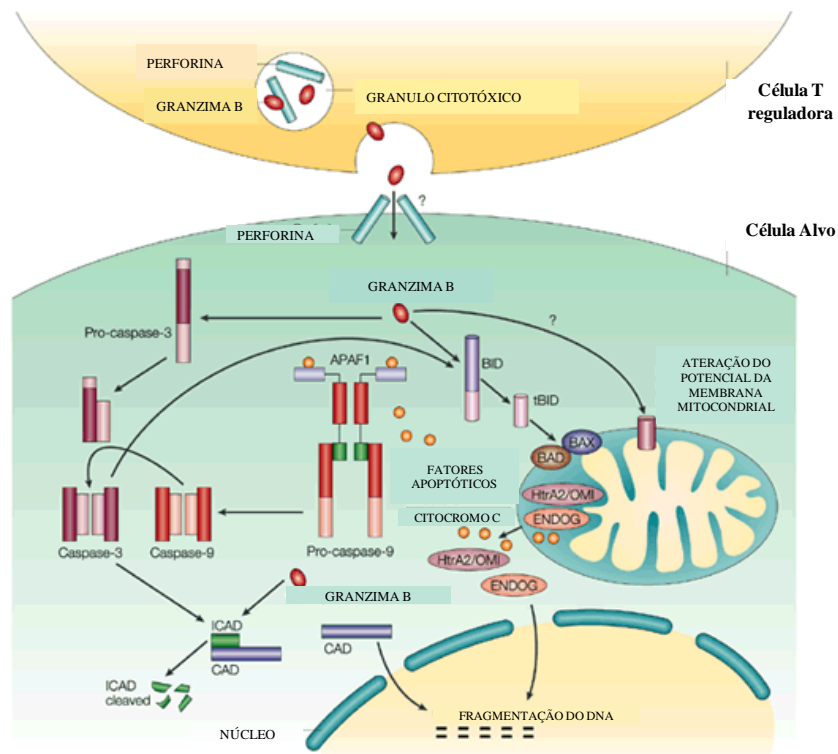


FIGURA 2: Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas granzima B e perforina. A granzima B entra no citosol da célula alvo por um mecanismo pouco conhecido que envolve a perforina. Dois alvos da granzima B são BID (Domínio de interação agonista de morte celular-BH3) e pro-caspase 3. Após a clivagem do BID, ocorre a destruição da membrana mitocondrial e causa a liberação do citocromo c (essencial para ativação da caspase 9), HtrA2/OMI (que bloqueia os inibidores da apoptose) e ENDOG (que ativa o dano ao DNA). O citocromo c liberado se liga a APAF1 que recruta pro-caspase 9. Desta forma, a caspase 9 é ativada e pode ativar parcialmente a caspase 3. A caspase 3 parcialmente ativada pode finalizar sua ativação. Granzima B também pode romper o potencial da membrana mitocondrial e clivar diretamente ICAD (inibidor de CAD). CAD então é responsável por causar a fragmentação do DNA. Modificado de LIEBERMAN, 2003.

As células T reguladoras expressam as moléculas de superfície CD39 e CD73. Estas moléculas são duas ectoenzimas altamente expressas por células T CD4⁺CD25^{high} (JOSEFOWICZ, *et. al.*, 2012). CD39 é responsável pela hidrólise de ATP extracelular, formando ADP ou AMP. Já a molécula CD73 é responsável por degradar AMP, formando adenosina. Através da interação entre adenosina e o receptor de adenosina A_{2A} ocorre a inibição de células dendríticas, bem como de células T ativadas (FIGURA 3) (SCHMIDT, *et. al.*, 2012).

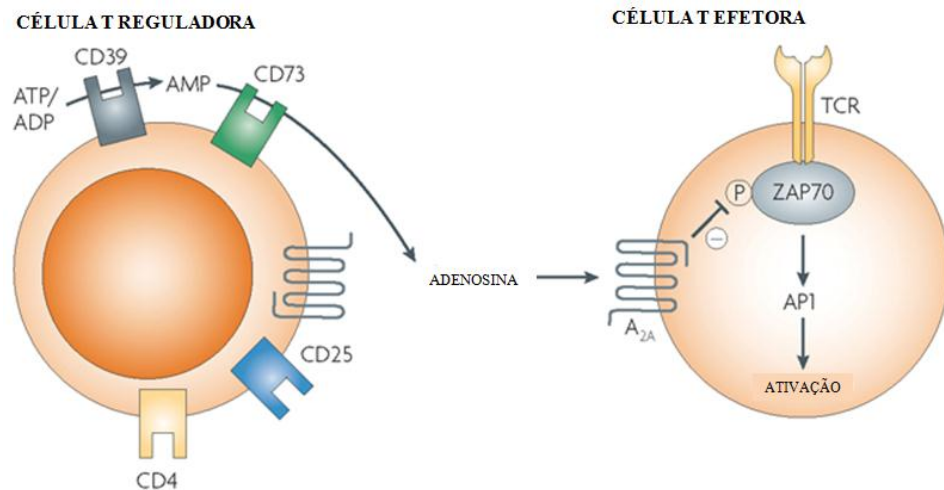


FIGURA 3: Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas CD39 e CD73. Células T reguladoras produzem adenosina após a degradação sequencial de ATP/ADP via CD39 e CD73. Adenosina ativa receptores A_{2A} em células T efetoras e inibem a sinalização mediada pelo receptor de células T (TCR) evitando a fosforilação de ZAP-70 e ativação do fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP1). Esta redução na sinalização mediada pelo TCR causa a redução na produção da citocina IL-2 e na expressão de CD25, resultando na redução da proliferação de células T efetoras. Modificado de HASKÓ, *et. al.*, 2008.

Outras moléculas também descritas por estarem associadas com a função das células Treg em induzir apoptose de células alvo são CD95, CD95L (STRAUSS, *et. al.*, 2009). Células CD4⁺CD25^{high} humanas expressam CD95 (FAS) e CD95L (FASL). Portanto, a utilização desta via pelas células T reguladoras como mecanismo de supressão é esperada e baseada nas suas características fenotípicas. A supressão mediada por FAS e FASL resulta na apoptose de células efetoras. Além disso, células T reguladoras podem se tornar susceptíveis a apoptose mediada por FAS/FASL durante a interação com células T efetoras (STRAUSS, *et. al.*, 2009).

A interação entre FAS/FASL causa rapidamente a junção de um complexo de sinalização intracelular indutor de apoptose (DISC), que contém protease de cisteína aspartato específica, adaptador/ativador de FADD e seu modulador c-FLIP (proteína inibitória FLICE). A interação entre FAS e FADD requer ligação de domínios homotípicos de “domínios de morte” (DD), que estão presentes em ambas as regiões intracelulares de FAS e FADD. O recrutamento da caspase 8 pelo FADD é mediado pela interação homotípica de “domínios de morte efetores” (DED) que estão presentes em ambas as proteínas. A ativação da caspase 8 no complexo de sinalização intracelular indutor de

apoptose ocorre em duas etapas. Primeiro, o recrutamento de FADD para a região intracelular do FAS promove dimerização e alteração conformacional da caspase 8, o que permite a caspase 8 obter completa atividade enzimática. Segundo, a caspase 8 ativa passa por um processo auto-proteolítico, que permite a enzima deixar o DISC e ter acesso a substratos em outros compartimentos celulares. Desta forma, a caspase 8 ativa pode ativar caspases efetoras, tais como caspase 3 e caspase 7 e isto pode contribuir diretamente com a apoptose pela proteólise de certas proteínas celulares (FIGURA 4). É importante citar que em algumas células humanas a ativação de FAS também causa o recrutamento da caspase 10 para o DISC e em certas células a ativação de caspase 10 contribui na via da apoptose. Durante as últimas etapas do processo de apoptose, caspases efetoras realizam a proteólise de proteínas celulares vitais, tais como componentes estruturais e também podem ativar certos processos que desmontam constituintes celulares não proteicos (GUICCIARDI & GORES, 2009; STRASSER, *et. al.*, 2010).

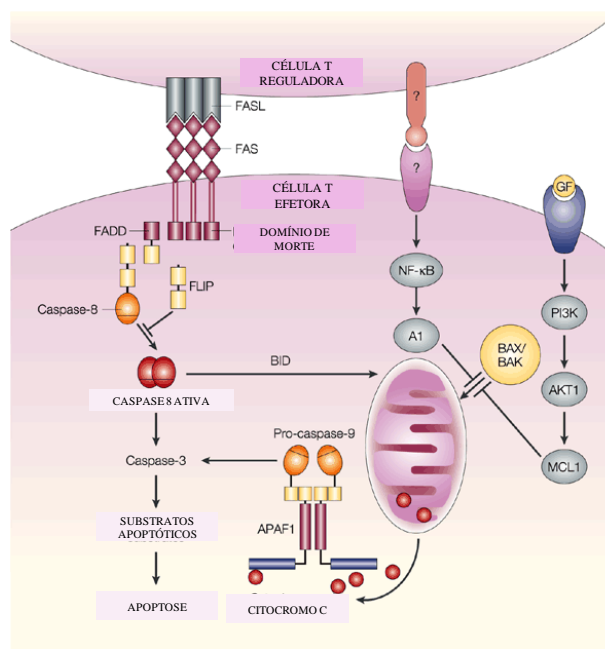


FIGURA 4: Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas CD95 e CD95L. A interação de CD95 com CD95L leva a ativação da caspase 8 que é responsável por clivar outras caspases efetoras. As caspases efetoras, por fim, irão causar a ruptura de proteínas celulares, levando a célula a apoptose. Modificado de POPE, 2002.

A molécula de morte programada 1 (PD-1) expressa por células CD4⁺CD25^{high} também têm emergido como importante na regulação imune. PD-1 é uma molécula co-estimuladora negativa da família do CD28, expresso principalmente por células ativadas T, B e células da linhagem mieloide. A interação de PD-1 com seus ligantes pode regular negativamente a ativação de células T. A sinalização ocorre através do contato entre PD-1 com o ligante de morte programada 1 (PD1L) ou o ligante de morte programada 2 (PD2L), que são expressos por um grande número de células, incluindo células mielóides, linfóides e não-linfóides. A interação entre PD-1/PD1L ou PD-1/PD2L inibe a ativação de células T e a produção de citocinas, especialmente IL-2 e IFN- γ (WANG, *et. al.*, 2009; GUTIERREZ, *et. al.*, 2011).

Enquanto ambos, PD1-L e PD2-L possuem caudas citoplasmáticas curtas e sem motivos de sinalização conhecidos, o domínio citoplasmático de PD-1 possui dois motivos estruturais. Próximo à membrana celular está um motivo chamado de imunoreceptor inibitório baseado em tirosina (ITIM) e distante da membrana celular está o outro motivo chamado de imunoreceptor ativador baseado em tirosina (ITAM). A interação do PD-1 com um dos seus ligantes resulta na fosforilação de domínios de tirosina citoplasmáticos e o recrutamento de SHP-2, uma tirosina fosfatase específica para a região C-terminal do ITSM que contém tirosina. Assim SHP-2 desfosforila o TCR associado a CD3 e o ZAP-70, resultando na inibição da sinalização. Especificamente, a ativação de fosfatidilinositol 3 quinase é bloqueada, o que afeta a regulação positiva do gene de sobrevivência celular Bcl-xL e reduz a produção de IL-2 (FIGURA 5) (RILEY, 2009; FRANCISCO, *et. al.*, 2010; HOFMEYER, *et. al.*, 2011).

PD-1 é altamente expresso por células T de pacientes com infecções virais e contribui para a deficiência na capacidade proliferativa e prejuízo da função efetora (WANG, *et. al.*, 2009). A regulação positiva de PD-1 e seus ligantes não facilita apenas a persistência de patógenos em infecções crônicas, mas também está associada com a evasão imune e resposta tumoral do hospedeiro. Estudos mostraram que o bloqueio da interação entre PD-1 e PD1L restaurou a resposta de células T CD8⁺ efetoras em infecções crônicas (WANG, *et. al.*, 2009). Além disso, o bloqueio desta via impede a regulação imune mediada por células T reguladoras *in vitro* e a indução da tolerância *in vivo* (WANG, *et. al.*, 2009; BROWN, *et. al.*, 2010). Outro estudo envolvendo camundongos com cardiomiopatia dilatada e deficiência de PD-1 demonstrou redução do movimento das paredes cardíacas e

espaço ventricular esquerdo aumentado em ambas às fases diastólica e sistólica, resultando na redução da fração de ejeção (OKAZAKI & HONJO, 2007).

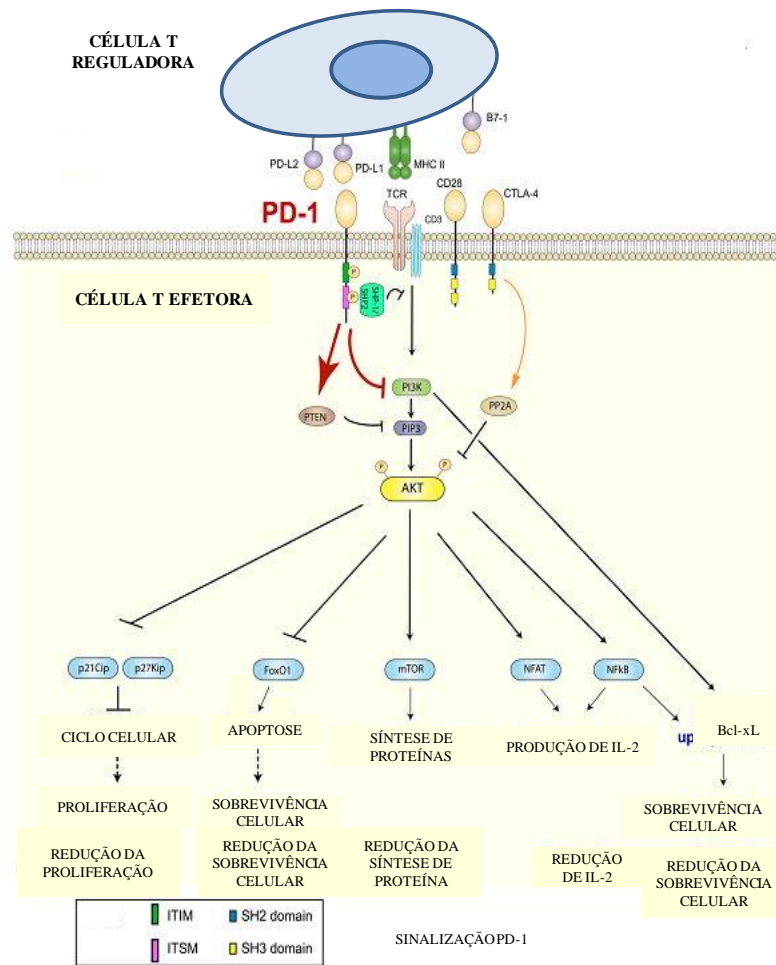


FIGURA 5: Mecanismo de supressão induzido pelas células T reguladoras através das moléculas PD1 e PD1-L. A interação de PD1 com PD1L causa a fosforilação do ITIM e do ITSM do PD1. A ligação entre ITSM e SHP-1 ou SHP-2 resulta na desfosforilação de moléculas de sinalização próximas e aumentam a expressão de PTEN. Isto reduz a ativação das vias de PI3K e Akt. A via de sinalização de PD1 pode resultar na diminuição da proliferação de células T, indução da apoptose, além da redução na síntese de proteínas e de IL-2. Modificado de FRANCISCO, et. al., 2010.

É importante citar que nenhum dos mecanismos de supressão mencionados pode ser considerado individualmente no controle da imunidade mediada por células T reguladoras. Além disso, o programa supressor dependente de FOXP3 implementado pelas células T CD4⁺CD25^{high} mantém a verificação de vários tipos de resposta imune efetora a antígenos próprios e patógenos (JOSEFOWICZ, et. al., 2012). Contudo, não está claro se células T

reguladoras implementam um programa universal para limitar diferentes tipos de imunidade ou modulam programas de supressão adaptados para inibir uma classe particular de resposta imune. Nos últimos anos, evidências experimentais têm sugerido que distintos mecanismos supressores são característicos em tecidos específicos e reações inflamatórias (JOSEFOWICZ, *et. al.*, 2012).

2.0 - JUSTIFICATIVA:

Recentemente, tem sido relatado que a atividade imunossupressora mediada por células T reguladoras que suprimem/modulam a proliferação e ativação de células T efetoras, apresentam uma nova dimensão na identificação dos mecanismos de regulação celular. Estudos *in vitro* utilizando células T reguladoras de camundongos e humanos favorecem a hipótese de que os mecanismos pelos quais estas células exercem supressão dependem do contato celular e/ou dependem da produção de citocinas. Outros trabalhos demonstram que a apoptose via granzima e perforina seria um possível mecanismo supressor induzido por essas células (APPAY, *et. al.*, 2002; GONDEK, *et. al.*, 2005).

Apesar de inúmeros estudos, em vários modelos, o papel das células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ na doença de Chagas humana ainda não foi completamente estabelecido. Estudos realizados por nosso grupo mostraram que as células Treg de pacientes com a forma clínica IND são capazes de suprimir a proliferação celular, entretanto o mecanismo utilizado por essas células parece não ser via IL-10 ou CTLA-4 (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012). Diante disso, o trabalho visou avaliar a apoptose como possível mecanismo envolvido na atividade imunossupressora das células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ em pacientes com doença de Chagas apresentando diferentes graus de acometimento cardíaco. Nossa hipótese foi que células T reguladoras utilizam a apoptose como mecanismo para suprimir a atividade de células efetoras nos indivíduos indeterminados. Desta forma, são responsáveis pela menor resposta inflamatória e ausência de manifestações clínicas. Por outro lado, as células reguladoras de pacientes cardíacos morrem por apoptose ou se diferenciam em outra subpopulação de célula T, ocasionando maior resposta inflamatória nestes pacientes.

3.0 - OBJETIVOS:

3.1 - Objetivo Geral:

Avaliar a apoptose como possível mecanismo envolvido na atividade imunossupressora das células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ em pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca (CCCV).

3.2 - Objetivos específicos:

Em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de chagas, avaliar:

- O perfil fenotípico das células T reguladoras através da expressão de moléculas de superfície (CD4, CD25, CD39, CD95, CD95L, PD-1 e PD1-L) e moléculas intracitoplasmáticas (FOXP3, IL-17) após estimulação in vitro com antígenos do *T. cruzi*;
- A apoptose de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos através da expressão de caspase 3 ativa após estimulação in vitro com antígenos do *T. cruzi*;
- A co-expressão de moléculas indutoras de apoptose e seus ligantes por células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺;
- A correlação entre a expressão de moléculas associada com a apoptose em células T reguladoras, com a frequência de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos em apoptose.

4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Caracterização da população de estudo:

A população estudada neste trabalho constou de pacientes portadores da fase crônica da doença de chagas e indivíduos não-infectados (NI), com a idade variando entre 29-70 anos (TABELA 1). Estes pacientes foram provenientes do Ambulatório de referência em doença de chagas do Centro de treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e parasitárias (CTR-DIP) do hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente pelo Professor Manoel Otávio da Costa Rocha.

Antes de iniciar a coleta de amostras da população de estudo, este projeto foi aprovado pelos Comitês de ética do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG). (CAAE - 0025.0.245.000.08) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE - 0.502.0.203.000-11)

TABELA 1: Características da população estudada

Forma Clínica	Sigla	Total de indivíduos	Sexo M/F	Idade
Não infectados	NI	10	4/6	29-55
Indeterminada	IND	10	5/5	30-70
Cardíaca	CARD	10	7/3	30-70

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: diagnóstico sorológico de doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (Elisa, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta), idade compreendida entre 15 e 70 anos; presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo; níveis de tensão arterial dentro de faixa da normalidade (sistólica < 140 mmHg e diastólica < 90 mmHg); ausência de evidências clínicas e complementares como acometimento cardíaco não-chagásico, e ausência de condições clínicas que possam alterar a

função cardiocirculatória; conclusão dos exames propostos; consentimento voluntário de participação na pesquisa.

Os pacientes que preencherem os critérios de inclusão foram selecionados e agrupados da seguinte forma:

Grupo 1: Constituído por pacientes portadores da forma clínica indeterminada. Os critérios utilizados para definição destes pacientes foram: positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ ou sinais da moléstia; eletrocardiograma convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Grupo 2: Constituído por pacientes com a forma clínica cardíaca grau V. Os indivíduos separados apresentavam todas (ou parciais) manifestações anteriormente descritas, porém possuíam aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole ($Ved > 55$ mm) e uma silhueta cardíaca aumentada (índice cárdio-torácico – ICT – acima de 0.5 mm).

Grupo 3: Constituído por indivíduos não-infectados, definidos por apresentarem no mínimo dois resultados negativos, além de ausência de indícios clínicos e epidemiológicos do diagnóstico de doença de Chagas.

4.1.1 - Critérios de exclusão:

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

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

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

Os pacientes avaliados neste estudo foram voluntários e assinaram um Termo de Consentimento. Todas as dúvidas referentes à pesquisa foram esclarecidas, inclusive quanto à doação de sangue.

4.2 - Obtenção do antígeno solúvel de *Trypanosoma cruzi* (TRIPO)

As formas tripomastigotas foram obtidas de cultura de células Vero mantidas em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitos da cepa Y foram lavados 3 vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completando-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvejen a 20.000 rpm 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subseqüentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50000g durante 60 minutos a 4°C contra PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0.45µm e mantido em pequenas alíquotas (1mL) a -70°C até o uso.

4.3 - Análise da expressão de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, células efectoras e monócitos após estimulação in vitro por antígeno do *T. cruzi*

O sangue periférico dos pacientes que participaram deste estudo foi coletado em tubo Vacutainer estéril contendo o anticoagulante heparina (Becton Dickinson, CA, USA). Alíquotas de 1 mL de sangue total foram adicionadas em tubos de polipropileno de 12 mL (Falcon, E.U.A). É importante salientar que esse procedimento foi realizado em quadruplicata. As células do sangue periférico foram incubadas na presença de meio RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A), recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença de antígenos solúveis das formas tripomastigotas (TRIPO) do *T. cruzi*, na concentração final de 25µg/mL, recebendo a denominação de cultura estimulada. Os tubos foram previamente incubados durante 18 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific E.U.A). Em seguida, foram adicionados a todos os tubos de cultura 20µL de Brefeldina A (SIGMA, E.U.A), 1mg/mL (concentração final de 10µg/mL). As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições acima. A utilização da Brefeldina assegura a retenção das citocinas no interior das células, uma vez que essa substância mantém a citocina no complexo de Golgi. Após a incubação, 220µL de EDTA (SIGMA, E.U.A) 20mM, obtidos de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM) foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foram adicionados as amostras de sangue 3mL de PBS-W e estas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 2 mL. Foram transferidos 200µl deste sangue para tubos de poliestireno de 5mL (FALCON, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes, como mostrado na TABELA 2 e em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (FLS - BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi emborcado e 300µl de solução fixadora - MFF adicionada aos tubos.

Para a detecção de citocinas intracitoplasmáticas foram acrescentados aos tubos 2,5ml de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20µL de anticorpos anti-citocina PE, diluídos 1:50 em PBS P aos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1mL de PBS-P e em seguida, com 1mL de PBS-W. No final, foram adicionados 300µl de solução fixadora MFF. As amostras contendo suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACSCANTO II - BD, E.U.A). Foram analisados em torno de 100.000 eventos dentro da população de linfócitos totais.

TABELA 2 - Relação dos anticorpos usados para a caracterização das células T CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e monócitos

Nome	Clone	Concentração	Função
CD4 PERCP-CY5.5	SK3	1,5µg	Identificação de linfócitos T auxiliares
CD4 FITC	SK3	0,5µg	Identificação de linfócitos T auxiliares
CD25 APC	2A3	12µg	Receptor da cadeia de IL-2, associado com CD122 e CD132
CD25 V450	M-A251	0,5µg	Receptor da cadeia de IL-2, associado com CD122 e CD132
FOXP3 PE-CY7	PCH101	0,125µg	Fator de transcrição altamente expresso por células T reguladoras
FOXP3 APC	236A/E7	0,125µg	Fator de transcrição altamente expresso por células T reguladoras
PD-1 FITC	MIH4	0,5µg	Receptor de PD-1L/PD2L. A interação com os ligantes resulta na inibição da proliferação secreção de citocinas
PD-1L PE-CY7	MIH1	0,2mg	Inibe a proliferação e altera a síntese de citocinas após interação com seu receptor PD1
CD39 PE	TU66	0,5µg	Ectoenzima que degrada ATP a AMP, e pode colaborar com a apoptose de células através de

CD95 (FAS) FITC	DX2	0,5µg	adenosina pericelular Após interação com CD95L eventos causam a apoptose de células que expressam esta molécula
CD95L (FAS-L) PE	NOK-1	0,25µg	Induz apoptose de células que expressam o receptor CD95
IL-17 PERCP-CY5.5	SCPL1362	0,5µg	Citocina pró-inflamatória que fornece resposta imune protetora contra alguns patógenos
CD8 FITC	G42-8	0,5mg	Identificação de linfócitos T citotóxicos
CD14 PERCP	MφP9	25µg	Identificação de monócitos no sangue periférico
CASPASE 3 PE	C92-605	0,5µg	Protease que identifica células em apoptose

4.4 - Obtenção e análise dos dados no citômetro de Fluxo

O citômetro de fluxo (FACSCANTO II - BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com três lasers, laser azul (488nm), laser vermelho (633nm) e laser violeta (605nm) que permitem a avaliação básica de 10 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3), fluorescência do tipo 4 (FL4), fluorescência do tipo 5 (FL5), fluorescência do tipo 6 (FL6), fluorescência do tipo 7 (FL7), fluorescência do tipo 8 (FL8). FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7, FL8 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PERCP (PERCP-Cy5.5), PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Pacific blue (V450) e AmCyan. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram realizadas através de um sistema de computador e do *software* “FlowJo” que fornece o perfil de células de acordo com tamanho e granulosidade.

A análise de células T reguladoras (FIGURA 6) foi feita segundo protocolo proposto por BAECHER-ALLAN et. al. (2001). Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (FIGURA 6A). Em seguida, gráficos de FL3 (CD4)

versus FL6 (CD25) foram construídos para identificar a população $CD4^+CD25^{high}$ (R2) (FIGURA 6B).

O próximo passo constituiu na combinação das populações de R1 e R2, uma vez que foi pedido o histograma de FL4 (FOXP3) dentro da população R2 (FIGURA 6C). Então, foi realizada a identificação de células FL4 positivas (R3) e negativas (R4). Na população de células R3 foram pedidos outros histogramas para os seguintes marcadores: PD-1, PD-1L, CD39 (FIGURA 6D), CD95, CD95L e IL-17 na população de células $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ (R3).

Na análise de linfócitos T $CD4^+$, linfócitos T $CD8^+$ ou monócitos expressando caspase 3 ativa foi selecionada a população de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ ou monócitos versus SSC (FIGURAS 7A, 7B e 7C respectivamente) e logo após foi pedido o histograma de FL2 (caspase 3) (FIGURA 7D).

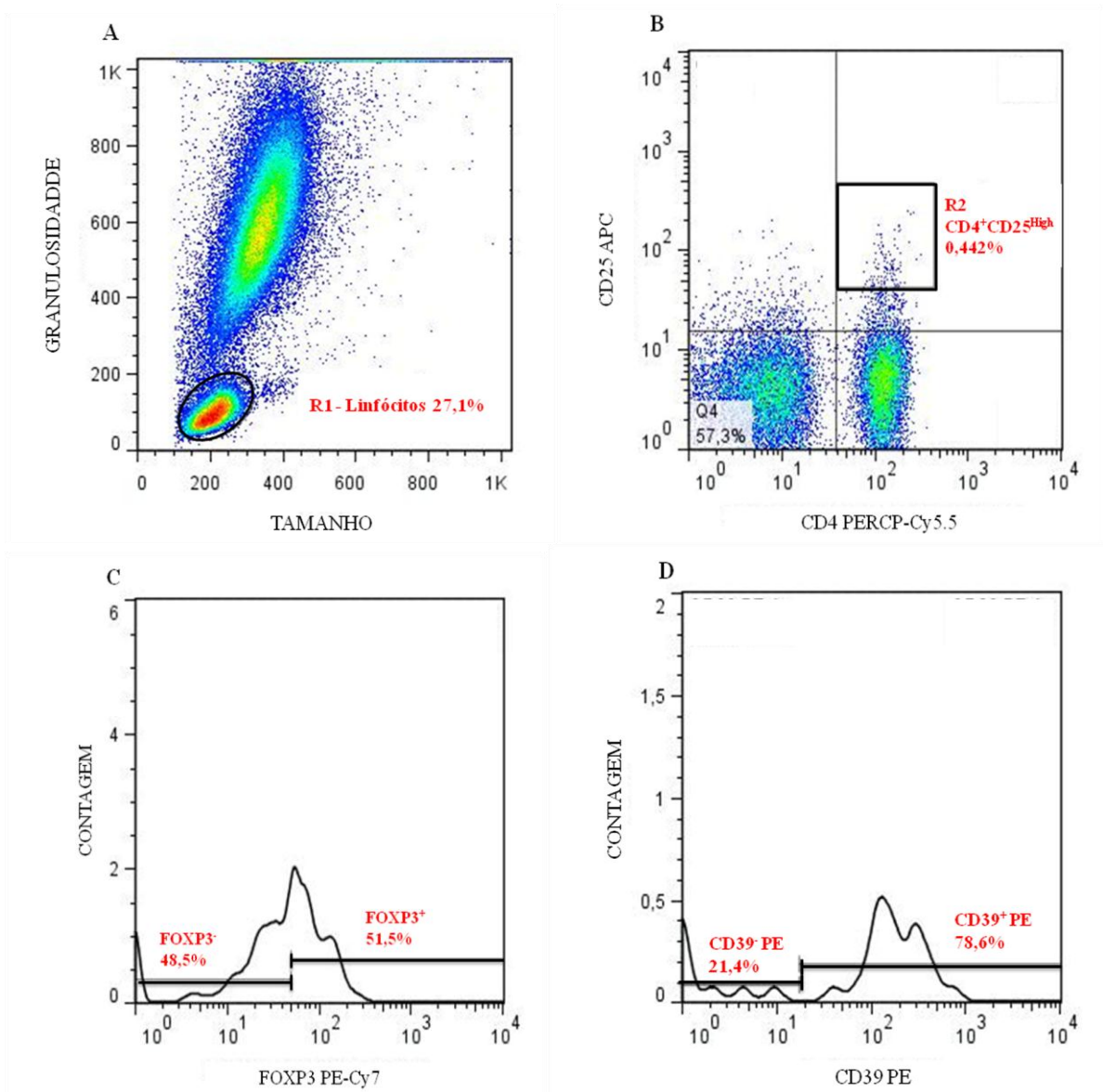


FIGURA 6: Estratégia de análise dos linfócitos T $CD4^+CD25^{high}$ $FOXP3^+$ do sangue periférico expressando moléculas de superfície/intracitoplasmáticas por citometria de fluxo através de gráficos de distribuição de pontos coloridos artificialmente pelo software Flow Jo.

A figura 6A representa o perfil celular obtido no contexto pós-estímulo, característico de gráficos de tamanho versus granulosidade. A figura 6B representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 3 ($CD4 - PerCP-Cy 5.5$) versus fluorescência 5 (anti- $CD25 - APC$), abordagem utilizada para delimitar a população celular de interesse, $CD4^+CD25^{High}$. A figura 6C demonstra o perfil celular obtido pelo gráfico de histograma de ($FOXP3 - PE-Cy7$). A figura 6D demonstra o perfil celular obtido pelo gráfico de histograma de ($CD39 - PE$), abordagem utilizada para verificar os níveis de expressão da molécula indutora de apoptose $CD39$.

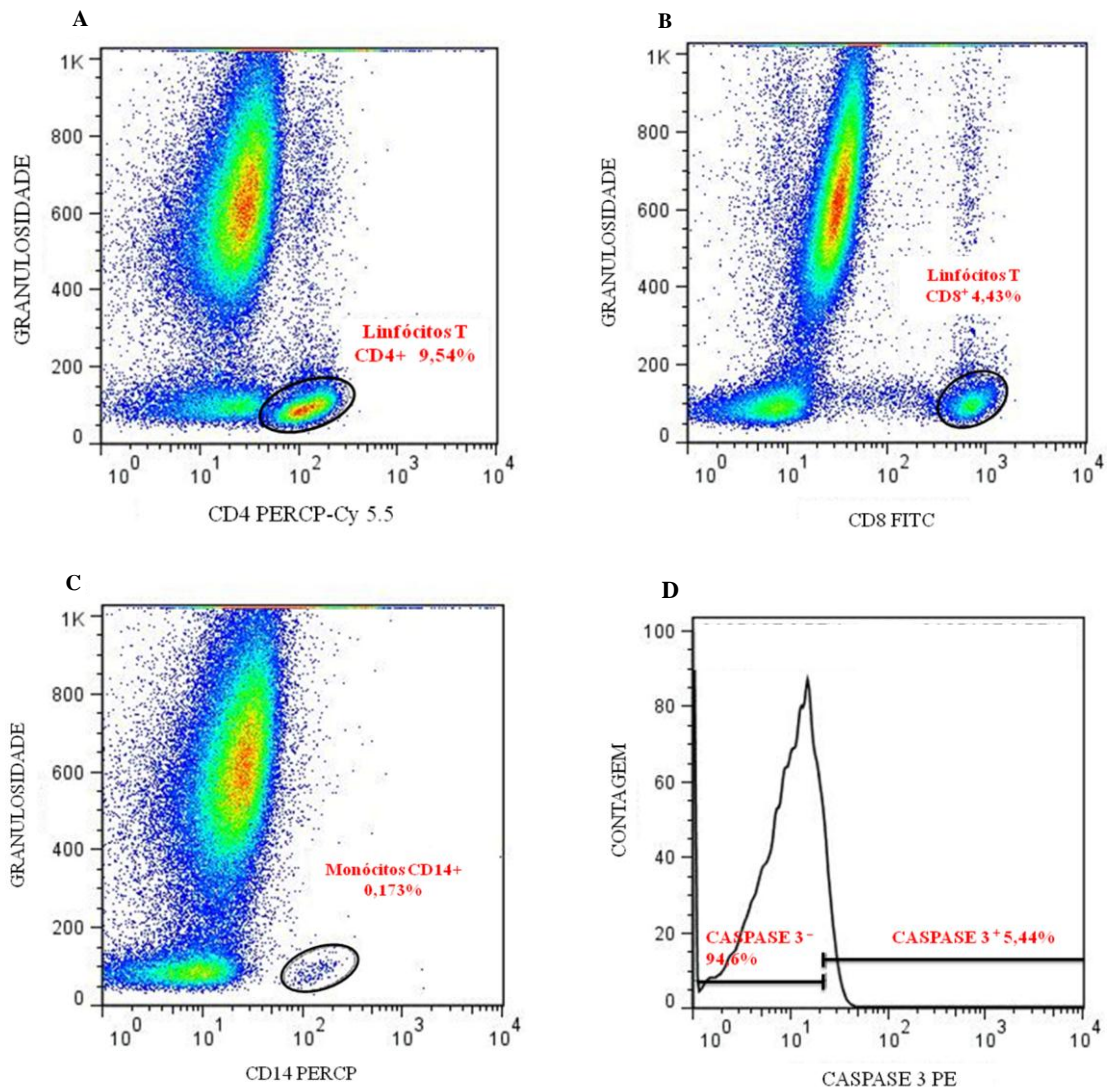


FIGURA 7: Estratégia de análise do percentual de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e monócitos do sangue periférico expressando caspase 3 ativa por citometria de fluxo através de gráficos de distribuição de pontos coloridos artificialmente pelo software Flow Jo.

A figura 7A representa o perfil celular obtido no contexto pós-estímulo, característico de gráficos de FL3 (CD4) versus granulosidade. A figura 7B representa o perfil celular obtido no contexto pós-estímulo, característico de gráficos de FL1 (CD8) versus granulosidade. A figura 7C representa o perfil celular obtido no contexto pós-estímulo, característico de gráficos de FL3 (CD14) versus granulosidade. A figura 7D demonstra o perfil celular obtido pelo gráfico de histograma de (CASPASE 3 - PE). Abordagem utilizada para verificar os níveis de expressão da molécula caspase 3 por linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos.

4.5 - Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste t não pareado, com objetivo de detectar diferenças entre os grupos comparando expressão de moléculas entre culturas não estimuladas e entre culturas estimuladas. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para detectar diferenças entre culturas estimuladas e não estimuladas. Todas as análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 e o nível de significância definido foi de $p < 0,05$ (San Diego,CA). Foram realizadas também análises de correlação, utilizando o teste de spearman, para avaliar correlação entre a frequência de expressão de moléculas indutoras de apoptose e seus receptores, bem como entre estas moléculas e a apoptose de linfócitos T e monócitos através do programa JUMP 5.0.1 (SAS Institute Inc, Cary, USA).

5.0 - RESULTADOS

Os dados obtidos no presente estudo serão apresentados na seguinte ordem: Avaliação do percentual de células T reguladoras CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺; avaliação da apoptose de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos na presença e ausência de estímulo in vitro por antígenos do *T. cruzi* (TRIPO); caracterização das células T reguladoras quanto a expressão de moléculas indutoras de apoptose e seus receptores, além da expressão da citocina intracitoplasmática IL-17 em cada forma clínica e entre as diferentes formas clínicas estudadas.

5.1 - Avaliação do percentual de células T reguladoras CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada após estimulação in vitro por antígenos do *T. cruzi*

Células T reguladoras expressam o marcador de superfície CD25 e o fator de transcrição FOXP3. Entretanto, a expressão de CD25 na superfície de células T não é suficiente para determinar o perfil fenotípico das células T reguladoras, uma vez que esta molécula está presente também em outras populações de células T ativadas (BAECHER-ALLAN, *et. al.*, 2001). Além disso, o fator de transcrição FOXP3 foi descrito como principal marcador de identificação das células T reguladoras (KONDĚLKOVÁ, *et. al.*, 2010).

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ no grupo IND em relação ao grupo NI e ao grupo CARD após cultura na ausência de estímulo (FIGURA 8A). O mesmo foi observado ao avaliar a frequência destas células após cultura na presença do estímulo com antígeno de *T. cruzi* (FIGURA 8B).

Estes resultados sugerem que as células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ participam da resposta imune ao *T. cruzi* e possuem papel importante no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de chagas.

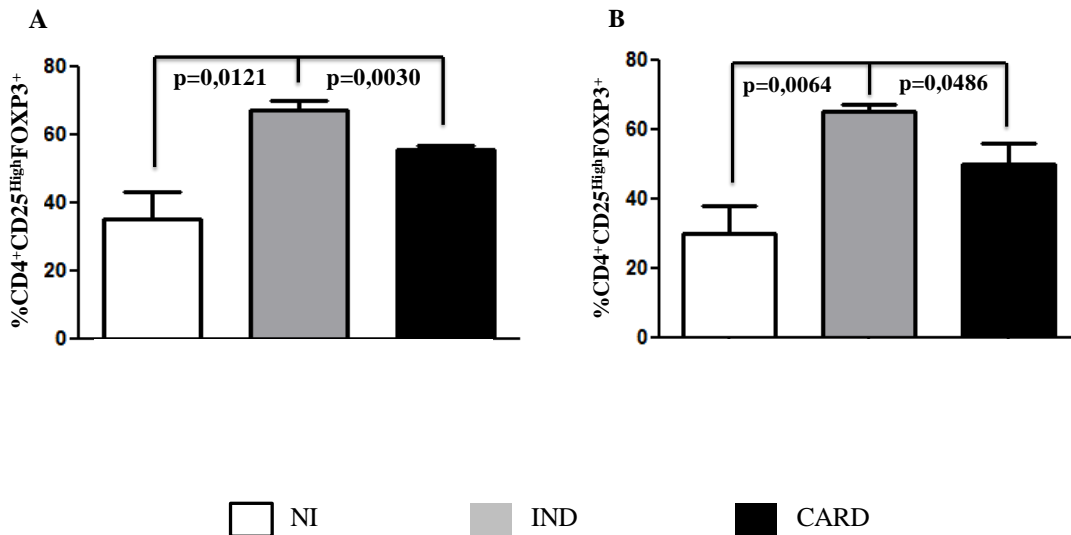


FIGURA 8: Análise do percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ após estimulação in vitro por antígenos de *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo *p* valor.

5.2 - Avaliação da apoptose de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células CD14⁺ através da expressão de caspase 3 na presença de antígenos do *T. cruzi* em cada grupo de indivíduos não infectados e de pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca da doença de chagas

A avaliação do percentual de cada população celular estudada expressando caspase 3 após cultura estimulada por antígenos do *T. cruzi* nos indivíduos do grupo NI mostrou que o percentual de células CD14⁺ caspase 3⁺ é maior do que o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺. Maior também é o percentual de células T CD8⁺ caspase 3⁺ em relação ao percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺ no grupo NI (FIGURA 9A).

Com relação aos pacientes do grupo IND, também foi observado maior percentual de células CD14⁺ caspase 3⁺ do que células T CD4⁺ caspase 3⁺ e maior percentual de células T CD8⁺ caspase 3⁺ do que células T CD4⁺ caspase 3⁺ na cultura estimulada com antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 9B). Por fim, os resultados mostraram que pacientes do grupo CARD apresentaram maior frequência de células CD14⁺ caspase 3⁺ em relação às células T CD4⁺ caspase 3⁺ na cultura estimulada com antígeno de *T. cruzi* (FIGURA 9C).

Desta forma, os resultados mostram que o percentual de células CD14⁺ caspase 3⁺ é maior do que a frequência de células T CD4⁺ caspase 3⁺ e/ou células T CD8⁺ caspase 3⁺ em todos os grupos estudados. Assim, a apoptose destas células pode estar relacionada com uma tentativa de suprimir a atividade inflamatória nas diferentes formas clínicas e assim controlar uma possível resposta imune exacerbada.

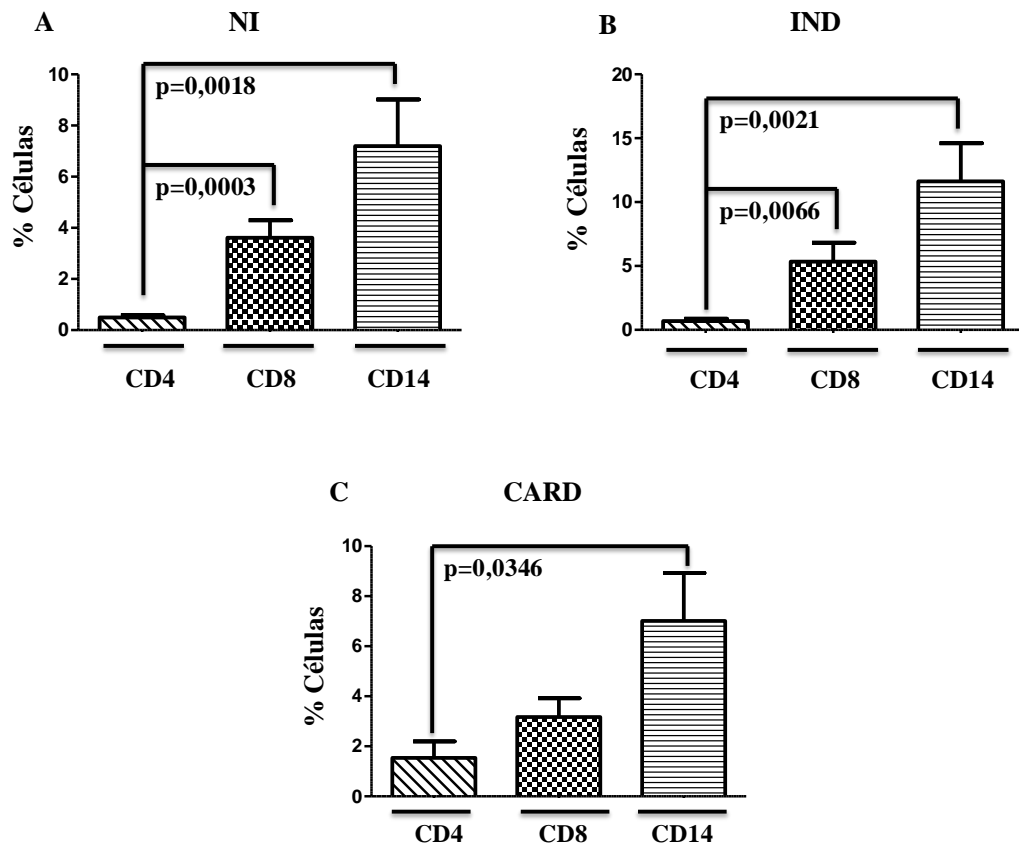


FIGURA 9: Análise do percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺, células T CD8⁺ caspase 3⁺ e células CD14⁺ caspase 3⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10) após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. (A) representa o percentual de cada população celular de indivíduos não infectados (B) representa o percentual de cada população celular de pacientes do grupo IND (C) representa o percentual de cada população celular de pacientes do grupo CARD. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo *p* valor.

5.3 - Caracterização de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ quanto a expressão de moléculas indutoras de apoptose e seus receptores do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando a forma clínica indeterminada e cardíaca após estimulação in vitro por antígenos do *T. cruzi*

Após observar diferença no percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ entre indivíduos não infectados e pacientes com as diferentes formas clínicas e ao considerar o papel supressor das células T reguladoras, foi avaliada a expressão de diferentes moléculas indutoras de apoptose e seus ligantes, tais como CD39, PD-1/PD-1L e CD95/CD95L (FIGURAS 10, 12, 14, 16, 18). Em paralelo, foram feitas correlações entre a expressão das moléculas indutoras de morte celular e a apoptose de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ (FIGURAS 11, 13, 15, 17, 19).

A avaliação da expressão da molécula indutora de apoptose CD39 na superfície de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ mostrou um aumento significativo dessas células no grupo IND em relação ao grupo NI e uma redução no grupo CARD em relação ao grupo IND após cultura na ausência dos antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 10A). Foi observada também uma redução significativa no percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ no grupo CARD em relação ao grupo IND após estimulação in vitro com antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 10B).

Com o intuito de verificar se a presença da molécula CD39 em células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ poderia estar associado com a indução de apoptose em linfócitos T e monócitos após estimulação in vitro por antígenos do *T. cruzi*, análises de correlação foram realizadas entre a frequência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e a frequência de linfócitos T e monócitos caspase 3⁺. Correlação positiva e estatisticamente significativa foi observada entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e a frequência de células CD14⁺ caspase 3⁺ em pacientes do grupo indeterminado após estimulação in vitro por antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 11). Não foram observadas outras correlações estatisticamente significativas entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e a apoptose de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ nas diferentes formas clínicas estudadas e considerando a presença ou ausência de estimulação com antígeno *T. cruzi*.

A frequência aumentada de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ em pacientes do grupo IND, bem como a correlação positiva entre estas células e o percentual de células CD14⁺ caspase 3⁺ sugere que a expressão de CD39 seja um possível mecanismo indutor de

apoptose utilizado pelas células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ de pacientes com a forma clínica indeterminada.

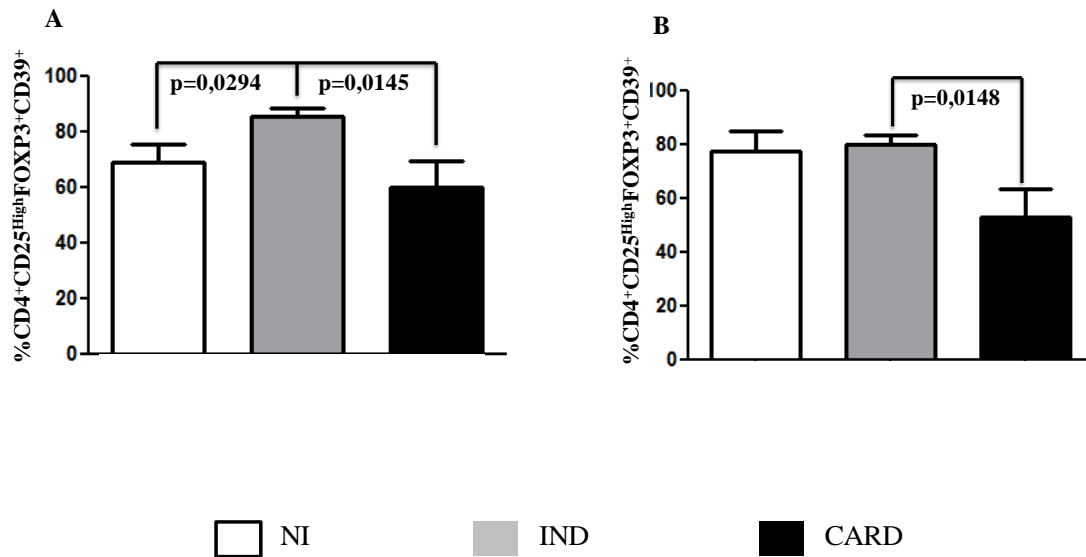


FIGURA 10: Análise do percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD39^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD39^+$ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD39^+$ após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo *p* valor.

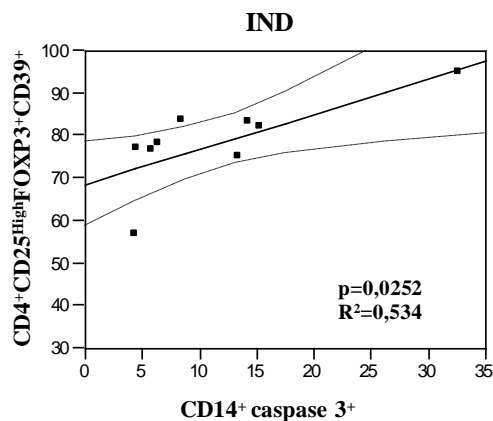


FIGURA 11: Análise de correlação entre a frequência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e de células CD14⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND = 10), após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. O gráfico representa correlação positiva e estatisticamente significativa entre percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e a apoptose de monócitos de indivíduos do grupo IND após estimulação *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*. A diferença estatisticamente significativa (p<0,05) está representada pelo **p** valor.

Quanto a expressão de PD-1L em células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados considerando a cultura não estimulada e estimulada com os antígenos do *T. cruzi* (Figura 12A e 12B).

Entretanto, nas análises de correlação entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ com o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺, CD8⁺ caspase 3⁺ e CD14⁺ caspase 3⁺, observa-se correlação negativa e estatisticamente significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ e o percentual de células CD14⁺ caspase 3⁺ por pacientes do grupo CARD após cultura na ausência do antígeno de *T. cruzi* (FIGURA 13A). Foi verificado ainda correlação negativa e estatisticamente significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ e o percentual de células T CD8⁺ caspase 3⁺ por pacientes do grupo CARD após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 13B).

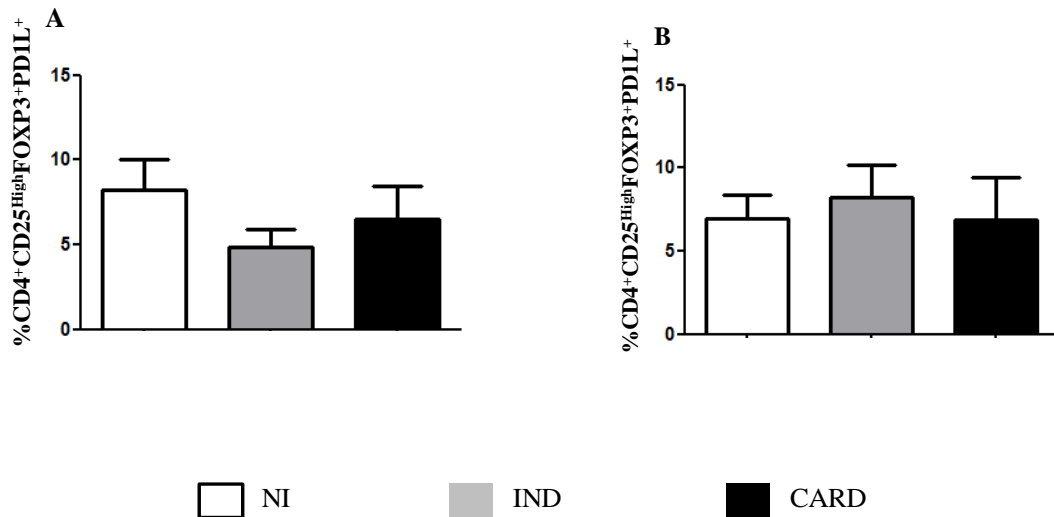


FIGURA 12: Análise do percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ após estimulação in vitro com antígenos do *T. cruzi*.

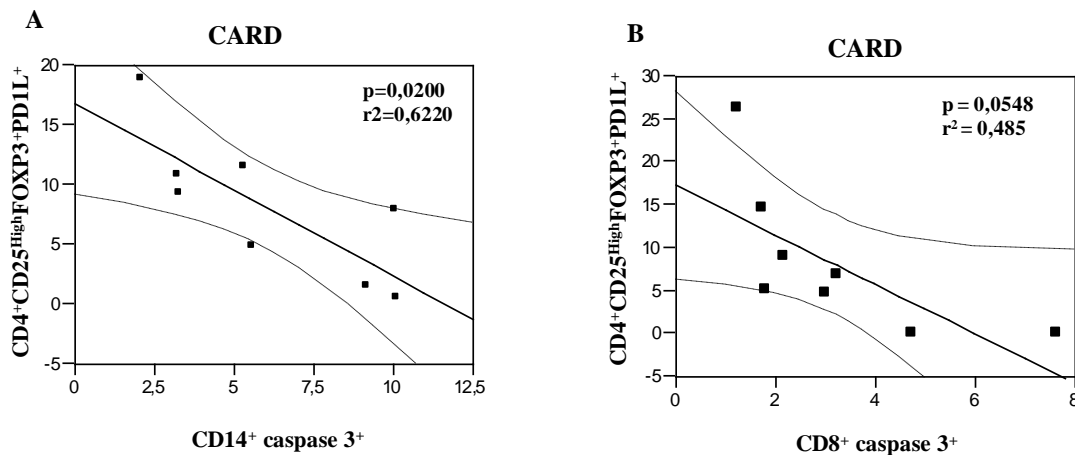


FIGURA 13: Análise de correlação entre células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ e células $CD14^+$ caspase 3⁺ e células $CD8^+$ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD = 10), na ausência dos antígenos e após estimulação in vitro com antígenos do *T. cruzi*. (A) representa correlação negativa estatisticamente significativa entre percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ e o percentual de células T $CD14^+$ caspase 3⁺ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa correlação negativa e estatisticamente significativa entre percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ e o percentual de células T $CD8^+$ caspase 3⁺ após estimulação com antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão representada pelo *p* valor.

Com relação à expressão do receptor de PD-1, por células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$, foi observado aumento significativo no percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ pelo grupo CARD comparado com o grupo NI na ausência de estímulo por antígenos de *T. cruzi* (FIGURA 14A). Porém, não foram observadas diferenças estatísticas no percentual de células $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ entre os grupos após a estimulação por antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 14B).

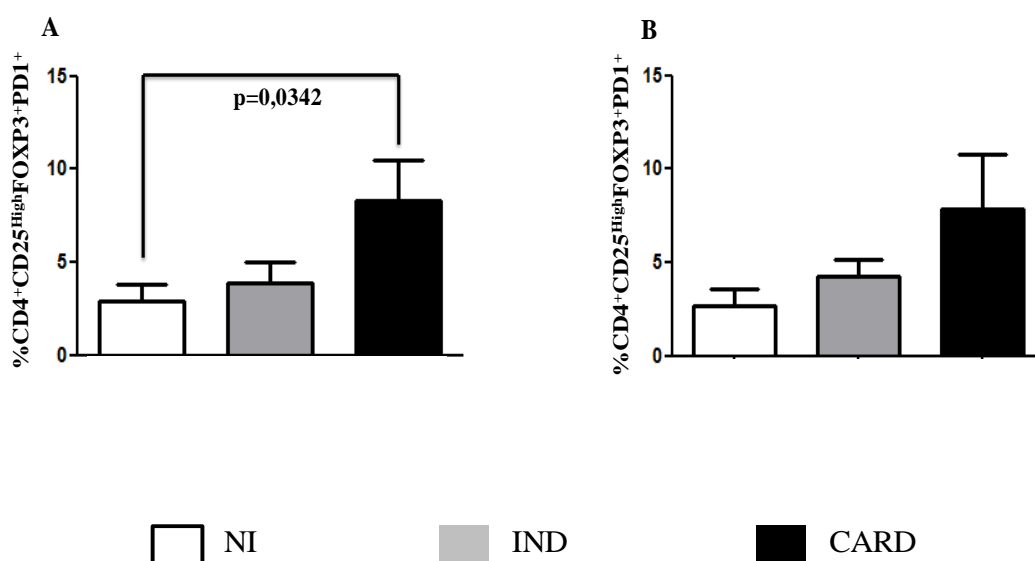


FIGURA 14: Análise do percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo *p* valor.

Foi observada ainda correlação positiva e estatisticamente significativa entre o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1^+$ e o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+PD-1L^+$ pelo grupo CARD na cultura não estimulada com antígeno (FIGURA 15). Este resultado sugere que a expressão das duas moléculas PD-1 e PD-1L pelas células T reguladoras de pacientes na forma clínica Cardíaca possa ser um mecanismo de “suicídio”, o que reduziria a frequência e conseqüentemente a atividade supressora desta população celular e ocasionaria menor controle da resposta inflamatória.

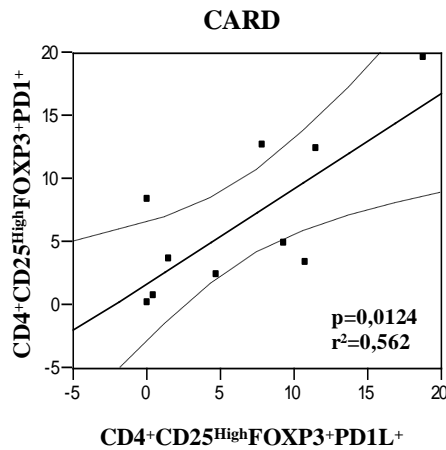


FIGURA 15: Análise de correlação entre células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1⁺ e células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺PD-1L⁺ de pacientes com a forma clínica cardíaca (CARD = 10), após cultura na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) está representada pelo *p* valor.

Outro mecanismo supressor avaliado foi a expressão CD95L (FAS-L) e seu receptor CD95 (FAS) pelas células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺. A interação de FAS/FAS-L ativa a via das caspases e induz assim a apoptose das células que expressam o receptor CD95.

A análise da expressão de CD95L na superfície das células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ não mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos na ausência (FIGURA 16A) ou presença dos antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 16B). Ao correlacionar o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ e o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺, CD8⁺ caspase 3⁺ e CD14⁺ caspase 3⁺ na presença ou ausência dos antígenos do *T. cruzi*, foi observada correlação positiva e estatisticamente significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ e o percentual de células T CD14⁺ caspase 3⁺ de pacientes do grupo IND na presença dos antígenos do parasito (FIGURA 17). Isto indica outro provável mecanismo supressor das células T reguladoras no controle da inflamação em pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de chagas.

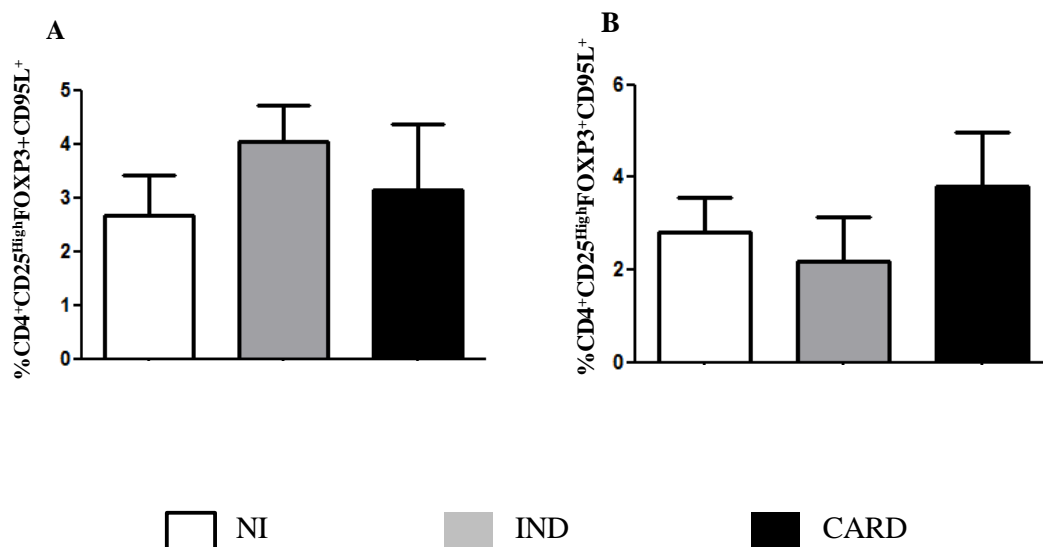


FIGURA 16: Análise do percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo **p** valor.

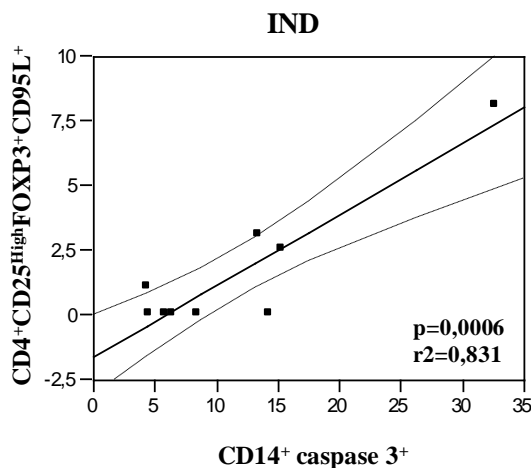


FIGURA 17: Análise de correlação entre células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ e células $CD14^+$ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND = 10), após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. O gráfico representa correlação positiva e estatisticamente significativa entre o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ e o percentual de células $CD14^+$ caspase 3⁺ de indivíduos do grupo IND após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) está representada pelo **p** valor.

Em seguida, foi avaliada a intensidade média de fluorescência do receptor de CD95L, CD95, uma vez que esta molécula é expressa constitutivamente na superfície de células T. A análise dos dados mostrou aumento estatisticamente significativo de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ na ausência do estímulo por antígenos do *T. cruzi* ao comparar pacientes do grupo NI e CARD e entre pacientes do grupo IND e CARD (FIGURA 18A). As células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ de pacientes do grupo CARD foram as que apresentaram maior intensidade média de fluorescência se comparado com os outros grupos. Também foi observado um aumento na intensidade média de fluorescência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ na presença de estímulo por antígenos do *T. cruzi* entre os grupos NI e IND, entre os grupos NI e CARD e entre os grupos IND e CARD (FIGURA 18B).

A maior intensidade média de fluorescência das células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ de pacientes do grupo CARD sugere que estas células podem estar morrendo por apoptose e assim contribuindo com a menor atividade destas células em pacientes na forma clínica cardíaca da doença de Chagas.

Ao correlacionar a intensidade média de fluorescência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ com o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺, células T CD8⁺ caspase 3⁺ e células CD14⁺ caspase 3⁺ na presença ou ausência dos antígenos do *T. cruzi*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Porém, foi encontrada uma correlação negativa e estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95⁺ e o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95L⁺ na presença do antígeno em pacientes do grupo CARD (FIGURA 19). Este resultado mostra que ocorre aumento na expressão de CD95 e redução na expressão de CD95L, ou seja, existe uma tendência das células T reguladoras de pacientes do grupo CARD de não causar a morte celular e sim sofrer apoptose. Além disso, a correlação negativa indica que este não seria um mecanismo de “suicídio” das células T reguladoras.

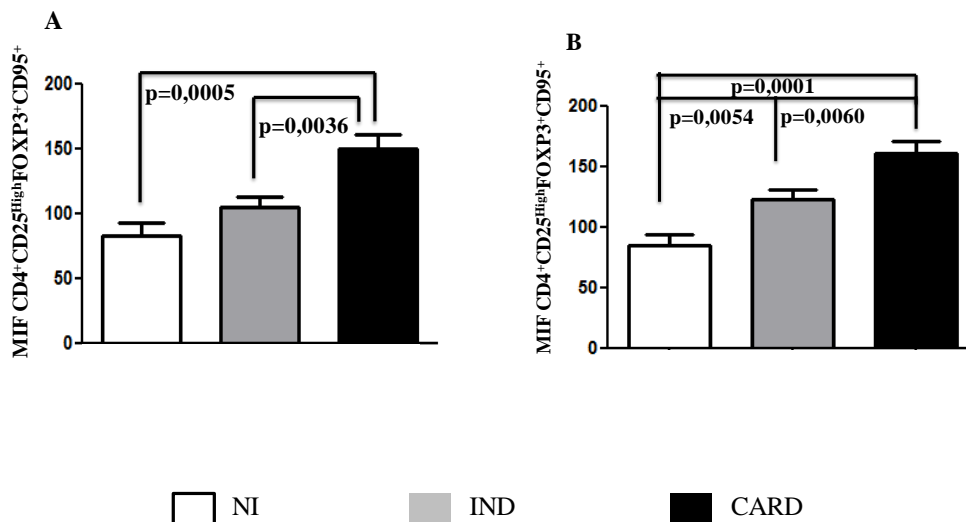


FIGURA 18: Análise da intensidade média de fluorescência de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95^+$ após cultura na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95^+$ após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo **p** valor.

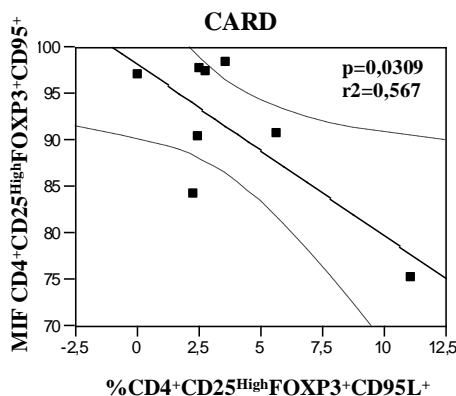


FIGURA 19: Análise de correlação entre a intensidade média de fluorescência de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95^+$ e o percentual de células $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD = 10), após cultura celular na presença dos antígenos do *T. cruzi*. O gráfico representa correlação negativa e estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95^+$ e o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+CD95L^+$ de indivíduos do grupo CARD após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) está representada pelo **p** valor.

5.4 - Avaliação da expressão de IL-17 por células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes apresentando a forma clínica indeterminada e cardíaca após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*

Estudos recentes mostraram que células T reguladoras $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ são capazes de secretar IL-17 e manter a atividade supressora (VOO, *et. al.*, 2009). Contudo, pouco se sabe sobre o papel desta citocina na doença de chagas. Diante disso, avaliamos o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ no sangue periférico de pacientes nas diferentes formas clínicas da doença de chagas.

A análise dos dados obtidos neste estudo mostra que pacientes do grupo IND possuem maior frequência de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ tanto após cultura não estimulada ou estimulada por antígenos do *T. cruzi*, quando comparado aos pacientes do grupo CARD (FIGURA 20).

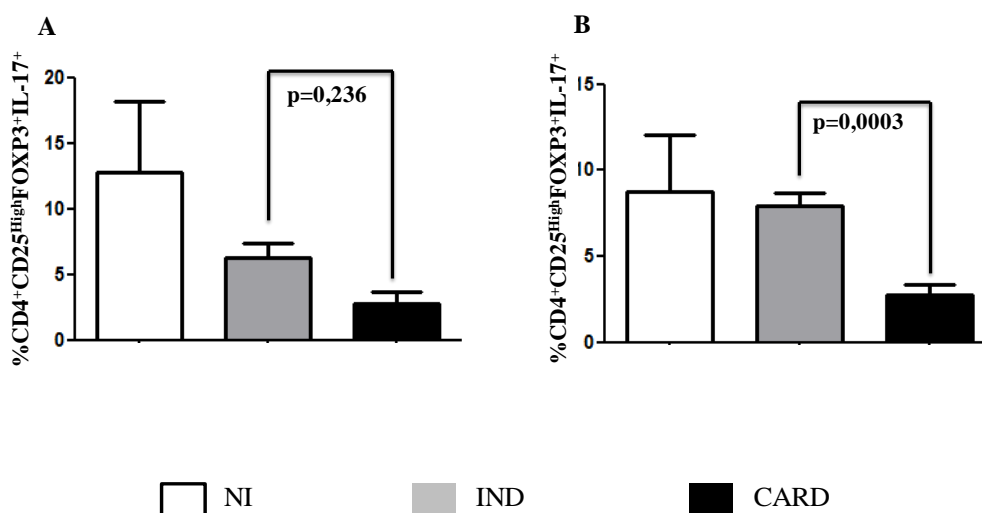


FIGURA 20: Análise do percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI = 10) e pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND = 10) e cardíaca (CARD = 10). (A) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ após cultura na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ após cultura na presença dos antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelo *p* valor.

Os resultados mostraram ainda correlação positiva estatisticamente significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD4⁺ capase 3⁺ de pacientes do grupo IND tanto na ausência quanto na presença de estímulo por antígenos do *T. cruzi* (FIGURAS 21A e 21B). Também foi observada correlação positiva e estatisticamente significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD8⁺ capase 3⁺ de pacientes do grupo IND na ausência de estímulo com antígeno do *T. cruzi* (FIGURA 21C).

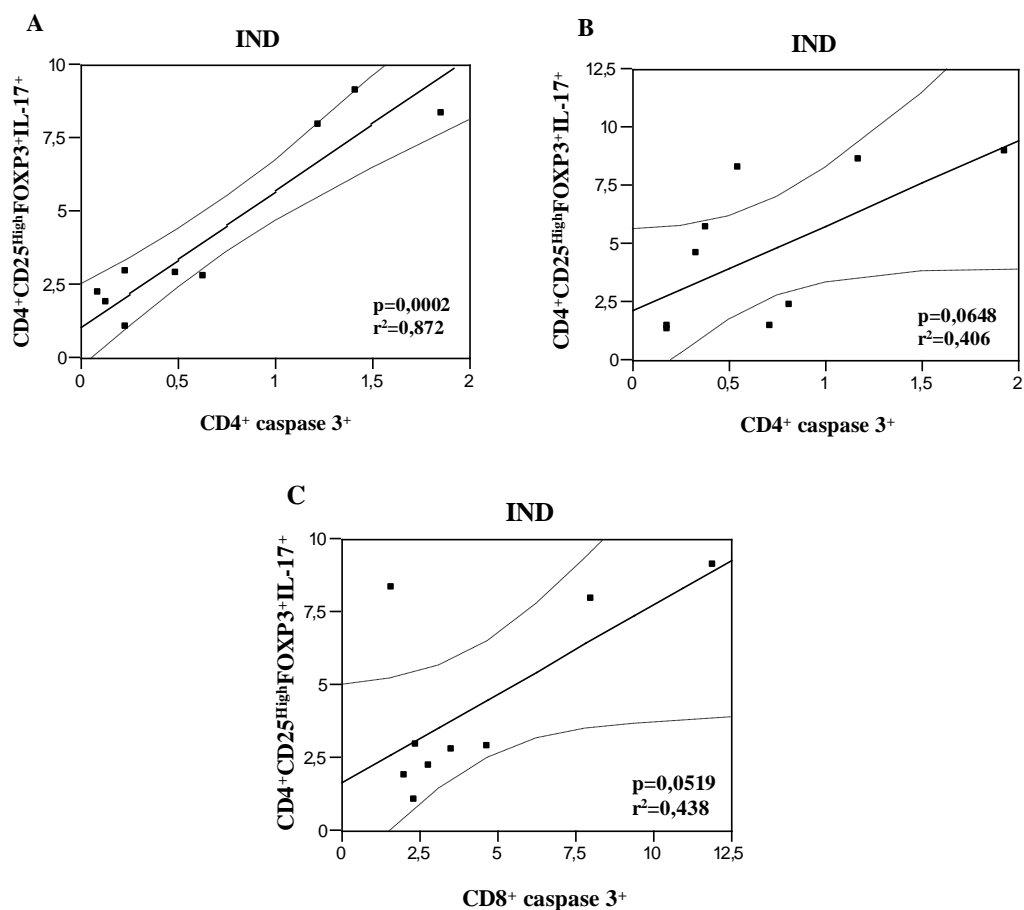


FIGURA 21: Análise de correlação entre o percentual células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células CD4⁺ caspase 3⁺ ou células CD8⁺ caspase 3⁺ de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND = 10), após cultura celular na presença ou ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (A) representa correlação positiva estatisticamente significativa entre percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺ na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. (B) representa correlação positiva estatisticamente significativa entre percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD4⁺ caspase 3⁺ após estimulação por antígenos do *T. cruzi*. (C) representa correlação positiva estatisticamente significativa entre percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD8⁺ caspase 3⁺ na ausência de estímulo por antígenos do *T. cruzi*. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelo *p* valor.

No grupo CARD, foi observada correlação positiva entre o percentual de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺IL-17⁺ e o percentual de células T CD8⁺ caspase 3⁺ na ausência de estímulo por antígenos do *T. cruzi* (FIGURA 22).

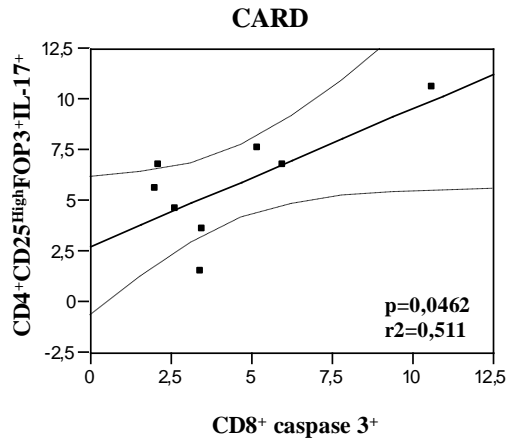


FIGURA 22: Análise de correlação entre o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ e o percentual de células $CD4^+$ caspase 3^+ de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD = 10), após cultura celular na ausência dos antígenos do *T. cruzi*. O gráfico representa correlação positiva estatisticamente significativa entre o percentual de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ e o percentual de células T $CD8^+$ caspase 3^+ de indivíduos do grupo CARD na ausência de estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) está representada pelo *p* valor.

Diante dos resultados de maior frequência de células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+IL-17^+$ em pacientes do grupo IND e das correlações positivas anteriormente descritas, pode-se perceber que estas células estão provavelmente relacionadas com menor resposta inflamatória e portanto com o desenvolvimento da forma clínica indeterminada da doença de chagas.

6.0 - SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Baseado na literatura, os resultados obtidos neste estudo podem ser resumidos na figura abaixo (FIGURA 23).

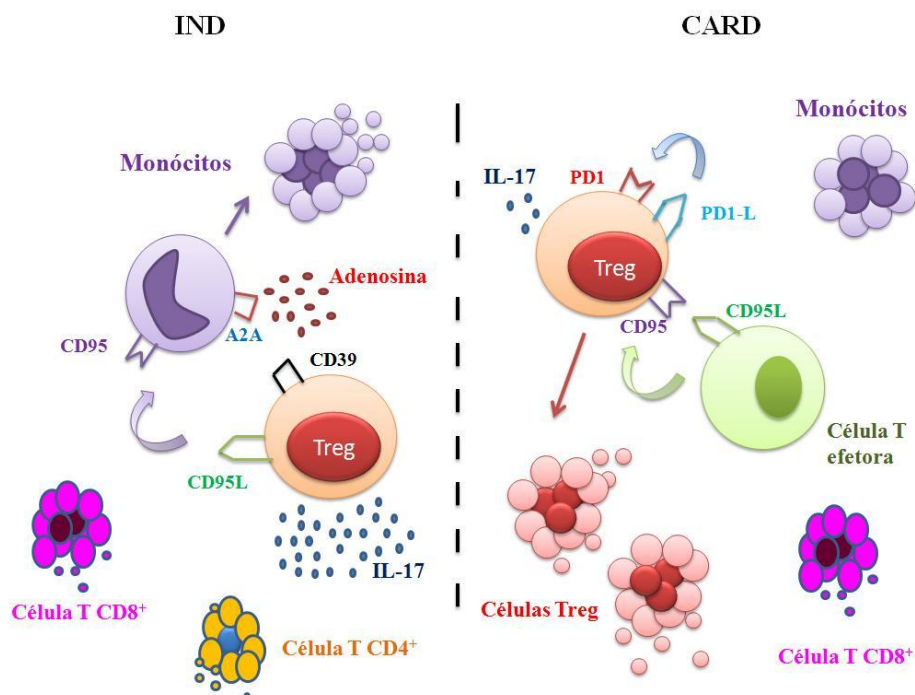


FIGURA 23: Sumário dos resultados encontrados neste estudo, referente a atividade supressora de células T reguladoras de pacientes com as formas clínica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Células T reguladoras de pacientes com a forma clínica indeterminada induzem a apoptose de monócitos e células T efetoras através da expressão das moléculas CD39, responsável por gerar adenosina pericelular e através da interação entre CD95 e CD95L. Além disso, a maior expressão de IL-17 também parece ter papel importante em pacientes com a forma clínica indeterminada. Por outro lado, as células T reguladoras de pacientes com a forma cardíaca sofrem apoptose através da expressão da molécula CD95 e através da interação entre PD1 e PD1-L, ambos expressos na superfície das células T reguladoras. Contudo, independente do mecanismo de supressão, os monócitos são as células que mais sofrem apoptose nas diferentes formas clínicas.

7.0 - DISCUSSÃO

Entre os fatores que envolvem a doença de Chagas, o mais intrigante está relacionado à evolução clínica diferencial entre indivíduos cronicamente infectados. Sabe-se que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* desencadeia vários mecanismos que levam ao desenvolvimento da resposta imune inata e adquirida. No entanto, as evidências experimentais em modelo experimental e no homem mostram que os mecanismos são ainda pouco definidos.

A resposta imune inicial durante a infecção humana pelo *T. cruzi* (aguda recente, aguda tardia e crônica recente) não é completamente entendida, apesar da sua função crucial no direcionamento das diferentes formas clínicas da infecção crônica. Estudos demonstram que o *T. cruzi* induz uma forte ativação do sistema imune durante a fase aguda e que os diferentes mecanismos imunes induzidos durante os estágios iniciais da infecção representam componentes essenciais da atividade imune presente na fase crônica (ANDRADE, 1991; BRENER & GAZZINELLI, 1997; MARINHO, *et. al.*, 1999; SATHLER-AVELAR, *et. al.*, 2003; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). De fato, a infecção pelo *T. cruzi* causa alterações no sistema imune, como a ativação policlonal e a imunossupressão (MINOPRIO, *et. al.*, 1986, 1987; D'IMPERIO LIMA, *et. al.*, 1986) verificada na fase aguda, podendo assim alterar os processos de regulação.

A resposta imune contra diferentes patógenos pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro. Neste contexto, tem se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante diversas infecções (MILLS, 2004). A identificação de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ e sua função tem sido objeto de intenso estudo devido ao seu papel crítico na manutenção da autotolerância, bem como na defesa contra patógenos (SAKAGUCHI, *et. al.*, 1995; SAKAGUCHI, 2004; PICCIRILLO, 2008). Além disso, os mecanismos de supressão utilizados pelas células T reguladoras CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ ainda não estão bem esclarecidos (SHEVACH, 2009).

A regulação da resposta imune por células T reguladoras *in vivo* é um processo complexo envolvendo múltiplos mecanismos de supressão. Alguns autores defendem a hipótese de que as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ suprimem células efetoras através do contato celular pela molécula CTLA-4 (READ, *et. al.*, 2000; TAKAHASHI, *et. al.*, 2000; MALOY & POWRIE, 2001; BATTAGLIA, *et. al.*, 2002). Adicionalmente, estudos demonstram que o mecanismo de supressão das células TCD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ parece

envolver a indução de apoptose de células efetoras (STRAUSS, *et. al.*, 2009; CZYSTOWSKA, *et. al.*, 2010). Por outro lado, outros autores defendem a hipótese de que IL-10 e TGF- β também podem estar envolvidos no efeito supressor *in vivo* das células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} (HARA, *et. al.*, 2001; LIU, *et. al.*, 2003).

Apesar de não existirem evidências a respeito dos mecanismos supressores induzidos por essa população celular na doença de Chagas, nossos dados mostram que pacientes com a forma clínica IND apresentam um aumento significativo no percentual de células T CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ quando comparado aos pacientes com a forma clínica CARD e indivíduos não infectados (FIGURAS 8A e 8B). Este resultado está de acordo com dados anteriores encontrados pelo nosso grupo (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012), o que demonstra a participação importante destas células no controle da resposta imune induzida pelo parasito e consequentemente da patogênese chagásica.

Uma vez que foi observado uma frequência diferencial de células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ nos pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, questionamos se a apoptose seria um mecanismo de imunorregulação induzido pelas células T reguladoras na doença de chagas.

A ocorrência de apoptose e os mecanismos que participam da modulação desse fenômeno estão bem documentados na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (HAREL-BELLAN, *et. al.*, 1983; LOPES, *et. al.*, 1995a; LOPES, *et. al.*, 1995b; LOPES & DOSREIS, 1996; MARTINS, *et. al.*, 1998; LOPES, *et. al.*, 1999; SILVA, *et. al.*, 2005; SILVA, *et. al.*, 2007; GUILLERMO, *et. al.*, 2007; GUILLERMO, *et. al.*, 2008; DOSREIS & LOPES, 2009), embora não se saiba se os mecanismos apoptóticos podem estar presentes no estabelecimento, no desenvolvimento, e/ou controle das formas graves da doença de Chagas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi compreender melhor os mecanismos imunorreguladores envolvidos no controle da miocardiopatia, através da avaliação da apoptose como mecanismo supressor induzido pelas células T reguladoras CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ nas diferentes formas clínicas da doença de chagas.

Avaliamos a expressão da ectoenzima CD39 por células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ (FIGURA 10). Observamos maior expressão desta molécula por células T reguladoras de pacientes com a forma clínica indeterminada em relação aos pacientes com a forma clínica cardíaca (FIGURAS 10A e 10B). Além disso, observamos uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a frequência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD39⁺ e a frequência de células CD14⁺ caspase 3⁺ em pacientes do grupo IND após estimulação

(FIGURA 11). Isto sugere que provavelmente esse seria um mecanismo envolvido na supressão de monócitos e assim no controle da resposta inflamatória em pacientes com a forma clínica indeterminada.

Diversos estudos descrevem a relação entre a expressão de CD39 com a supressão da resposta imune em diversas patologias. Segundo Tang *et. al.* (2012), pacientes assintomáticos infectados pelo vírus da hepatite B apresentam maior frequência de células T reguladoras expressando CD39 do que pacientes com a hepatite B crônica ativa. Outro trabalho relatou o mecanismo supressor relacionado com a expressão de CD39 a progressão da infecção de pacientes pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (NIKOLOVA, *et. al.*, 2011). Com relação à doença de chagas, Santos *et. al.* (2009) demonstraram que o *Trypanosoma cruzi* expressa enzimas ectonucleotidasas (família do CD39) e que este mecanismo seria responsável pela infectividade e virulência do parasito, uma vez que cliva o ATP e reduz a resposta inflamatória infecção. Já Souza *et. al.* (2012) avaliou os níveis de ATP, AMP e adenosina no soro de pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de chagas, com o intuito de verificar a atividade da enzima ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (CD39) e da enzima ecto-adenosina deaminase (responsável por clivar adenosina) em linfócitos. Este estudo demonstrou que pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de chagas possuem baixos níveis séricos de ATP e altos níveis de AMP e adenosina. Desta forma, os dados de Souza *et. al.* (2012) corroboram com o resultado encontrado neste estudo e indicam também associação do mecanismo supressor que envolve a expressão de CD39 com a adaptação do hospedeiro ao parasito e a prevenção do progresso clínico da doença (SOUZA, *et. al.*, 2012).

A interação entre PD-1 e PD-1L é outro mecanismo supressor utilizado pelas células T reguladoras que tem sido relatado no desenvolvimento de diversas patologias (SHARPE, *et. al.*, 2007). Estudos demonstraram a relação deste mecanismo com o escape de células tumorais (IWAI, *et. al.*, 2002; HIRANO, *et. al.*, 2005). Segundo Malaspina *et. al.* (2011), pacientes com quelite actínica possuem maior frequência de células T co-expressando PD-1 no sangue periférico e em amostras de tecido do que indivíduos do grupo controle. Desta forma, estas células teriam sua atividade suprimida e as células tumorais não seriam eliminadas (MALASPINA, *et. al.*, 2011). Além disso, o bloqueio de PD-1 em células de pacientes com melanoma aumentou a resposta citotóxica antígeno específica e elevou a resistência a inibição mediada por células T reguladoras, um vez que limitou a capacidade supressora destas células (WANG, *et. al.*, 2009).

Nossos dados não mostraram diferença na expressão de PD-1L entre as diferentes formas clínicas ou entre cada forma clínica e os indivíduos não infectados (FIGURA 12). Contudo, identificamos maior expressão de PD-1 por células T reguladoras de pacientes com a forma clínica CARD do que indivíduos não infectados (FIGURA 14). Observamos também correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão de PD-1 e PD-1L por células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ de pacientes da forma clínica cardíaca da doença de chagas (FIGURA 15). Isto pode indicar que as células T reguladoras de pacientes na forma clínica cardíaca estariam morrendo por apoptose devido a interação entre o PD-1L e seu receptor PD-1, ambos expressos pela mesma célula T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$. Observamos também que o aumento na expressão de PD-1L por células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ se correlaciona negativamente com a apoptose de monócitos, linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ em pacientes do grupo CARD (FIGURA 13). Estes resultados cooperam com a apoptose de células T reguladoras e conseqüentemente menor supressão de outras células alvo.

Tarrio *et. al.* (2012) avaliaram miocardite aguda em camundongos e verificou que a deficiência de PD-1 causou aumento o infiltrado inflamatório rico em neutrófilos e linfócitos T $CD8^+$. Este mesmo estudo identificou *in vitro* que a ausência de PD-1 aumentou a atividade supressora de linfócitos T contra células endoteliais do miocárdio. Desta forma, PD-1 possui papel importante limitando a resposta de células T no coração (TARRIO, *et. al.*, 2012). Na miocardite aguda induzida pelo *T. cruzi* em camundongos foi observado que existe uma elevada expressão de PD-1 e seus ligantes em células T e em células apresentadoras de antígenos. Camundongos tratados com anticorpos para bloquear PD-1, PD-1L e PD-2L apresentaram resposta inflamatória cardíaca aumentada, redução da parasitemia e do parasitismo tecidual, mas aumento da mortalidade dos camundongos (GUTIERREZ, *et. al.*, 2011). Ao confrontar estas informações com os resultados encontrados neste trabalho, pode-se considerar a expressão de PD-1/PD-1L como uma importante tentativa de supressão da resposta imune e controle da resposta inflamatória cardíaca.

Outros estudos indicam que a interação entre CD95 (FAS) e CD95-L (FAS-L) também apresenta papel importante no controle da miocardite induzida pelo *T. cruzi* (DE OLIVEIRA, *et. al.*, 2007; RODRIGUES, *et. al.*, 2008). A deficiência de CD95-L em camundongos mostrou redução significativa no infiltrado cardíaco e menor morte de cardiomiócitos (DE OLIVEIRA, *et. al.*, 2007). Em outro estudo utilizando camundongos identificou-se maior expressão de CD95 e CD95-L em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ de

camundongos infectados com *T. cruzi* ao comparar com camundongos não infectados. Além disso, este mesmo trabalho mostrou que o bloqueio desta via de supressão utilizando anti-CD95-L reduziu a morte de linfócitos T CD4⁺, bloqueou completamente apoptose de linfócitos T CD8⁺ e restaurou a capacidade de proliferação de linfócitos T CD8⁺ e reduziu a parasitemia na infecção aguda (GUILLERMO, *et. al.*, 2007).

Células T reguladoras de humanos expressam baixos níveis de CD95-L e esta expressão estaria relacionada com a expressão de FOXP3, visto que o gene que codifica a síntese de FOXP3 se localiza próximo do gene codificador para a molécula CD95L (WEISS, *et. al.*, 2011). Nossos dados não mostraram diferenças com relação à expressão de CD95-L por células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ entre os diferentes grupos estudados (FIGURA 16). Porém, diferente do estudo conduzido por Guillermo *et. al.* (2007), identificamos correlação positiva e estatisticamente significativa entre a frequência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺CD95-L⁺ e a apoptose de monócitos em pacientes com a forma clínica indeterminada (FIGURA 17). Isto indica que em pacientes com a forma clínica indeterminada as células T reguladoras poderiam estar causando preferencialmente a apoptose de monócitos. Desta forma, este mecanismo também seria responsável junto com a expressão de CD39 por reduzir a resposta inflamatória característica da forma clínica indeterminada.

Neste trabalho observamos maior intensidade média de fluorescência de CD95 em células T reguladoras de pacientes com a forma clínica cardíaca do que em pacientes com a forma clínica indeterminada (FIGURA 18). Identificamos também que em pacientes da forma clínica cardíaca ocorre um aumento na intensidade média de fluorescência de CD95 e redução na expressão de CD-95L pelas células T reguladoras (FIGURA 19). Assim, existe uma tendência para apoptose de células T reguladoras de pacientes da forma clínica cardíaca devido à interação entre CD95 expresso na superfície das células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ e o CD95L expresso por outras células indutoras da apoptose. A apoptose de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ em pacientes com a forma clínica cardíaca está de acordo com a menor frequência destas células observadas em pacientes desta forma clínica se comparado com pacientes com a forma clínica indeterminada (FIGURA 8).

Segundo Weiss *et. al.* (2011) células T reguladoras de camundongos e humanos estariam sujeitas ao controle homeostático através da estimulação de CD95, o que controlaria a atividade supressora destas células. Relatos recentes mostraram que a expressão de CD95-L por células T CD4⁺ em tumores pode reduzir o número de células T

reguladoras e que a morte dessas células *in vitro* seria dependente da expressão de CD95 (GRITZAPIS, *et. al.*, 2010). Na colite induzida por medicamento também foi identificada a apoptose de células T reguladoras no tecido inflamado através da expressão de CD95 por estas células e CD95-L por um tipo celular não identificado (REARDON, *et. al.*, 2008). Porém, esta constante eliminação de células T reguladoras via CD95 e CD95-L pode resultar em hiperatividade do sistema imune (WEISS, *et. al.*, 2011).

Estudos de cinética de expressão de FOXP3 por células TCD4+CD25^{high}, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que pacientes apresentando a forma clínica IND mantêm a expressão de FOXP3 após estimulação *in vitro* por antígenos do *T.cruzi*, enquanto os pacientes do grupo CARD apresentam uma diminuição da expressão dessa molécula após o terceiro dia de cultura (DE ARAUJO, *et al.*, 2012). Desta forma, estes dados corroboram com a hipótese de apoptose das células T reguladoras de pacientes com a forma clínica cardíaca seja pela expressão de CD95 (FIGURA 18) e/ou por um possível mecanismo de suicídio através da expressão de ambas as moléculas PD1 e PD1-L (FIGURA 15).

O envolvimento das citocinas no controle e/ou desenvolvimento da cardiopatia chagásica é bem estudado (BAHIA-OLIVEIRA, *et. al.*, 1998; FERREIRA, *et. al.*, 2003; GOMES, *et. al.*, 2003; TALVANI, *et. al.*, 2004; ARAÚJO-JORGE, *et. al.*, 2008; CUNHA-NETO, *et. al.*, 2009; D'ÁVILA, *et. al.*, 2009). De Araújo *et. al.* (2012) mostraram que células T reguladoras de pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de chagas expressam mais IL-10 do que as células T reguladoras de indivíduos não infectados. Com relação aos pacientes com a forma clínica cardíaca, as células T reguladoras destes pacientes expressam mais IFN- γ , TNF- α e IL-6 do que as células T reguladoras de pacientes com a forma clínica indeterminada (DE ARAÚJO, *et. al.*, 2012). Recentemente foi relatado que as células T reguladoras são capazes de secretar IL-17 e manter a capacidade supressora (BERIOU, *et. al.*, 2009; VOO, *et. al.*, 2009). A IL-17 tem emergido como uma citocina importante na resposta imune em diversas patologias e seu papel protetor tem sido descrito em infecções bacterianas e fúngicas (MIYAZAKI, *et.al.*, 2010; MAI, *et. al.*, 2011; PAPPU, *et. al.*, 2011).

Diferentes estudos relatam a interação entre IL-17 e a apoptose de vários tipos celulares. Na síndrome coronariana aguda a IL-17 está envolvida na patogênese da aterosclerose, pois promove a secreção do fator Von willebrand e este induz a apoptose de células endoteliais vasculares (ZHU, *et. al.*, 2011). Outro estudo demonstrou que diferentes

concentrações de IL-17 estão relacionadas com apoptose de neutrófilos de indivíduos saudáveis (ZHANG, et. al., 2006).

Na doença de chagas, camundongos agudamente infectados pelo *T. cruzi* apresentaram elevada produção de IL-17 por células NK, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos T $\gamma\delta$. Animais deficientes em IL-17 apresentaram também redução nos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-6, fator que contribuiu com aumento na parasitemia e mortalidade. Neste caso, IL-17 mostrou controlar a produção de citocinas por células T, reduzir a ativação de neutrófilos e ser um fator protetor para o hospedeiro (MIYAZAKI, et. al., 2010). Guedes et. al. (2012) demonstrou maior expressão de IL-17 por células T CD4⁺ de pacientes com cardiomiopatia chagásica suave do que por células T CD4⁺ de indivíduos não infectados. Além disso, o mesmo trabalho mostrou correlação positiva e significativa entre a frequência de células T CD4⁺IL-17⁺ e a frequência de células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺ (GUEDES, et. al., 2012).

No presente estudo identificamos que pacientes com a forma clínica indeterminada apresentam maior produção de IL-17 por células T reguladoras se comparado com pacientes com a forma clínica cardíaca (FIGURA 20). Observamos também relação entre o aumento nos níveis de IL-17 e o aumento na frequência de células T CD4⁺ caspase 3⁺ ou células T CD8⁺ caspase 3⁺ em pacientes com a forma clínica indeterminada (FIGURA 21). Já nos pacientes com a forma clínica cardíaca o aumento nos níveis de IL-17 foi acompanhado do aumento na frequência de células T CD8⁺ caspase 3⁺ (FIGURA 22). Estes dados sugerem que a produção de IL-17 na doença de chagas humana pode ser um fator protetor, como descrito por Miyazaki et. al. (2010) no modelo experimental. A produção de IL-17 pode ser responsável pelos menores níveis de IFN- γ observados em pacientes na forma clínica indeterminada e assim controlar a resposta inflamatória. Além disso, os altos níveis de IL-17 podem estar relacionados com a apoptose de células T efectoras.

Dos Reis et. al. (2009) observou a apoptose de linfócitos T CD4⁺ após estimular as células de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Ao utilizar a droga pan inibidora de caspases, com o intuito de inibir a apoptose na doença de Chagas experimental, ocorreu a inibição da expressão de caspase 3 e redução da apoptose de células T e B (DOS REIS, et. al., 2009). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que entre as populações celulares avaliadas, os monócitos são as células que mais sofrem apoptose na presença do estímulo com os antígenos do *T. cruzi* em todos os grupos estudados (FIGURA 9).

Os monócitos são células responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de patógenos e por produzir espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e quimiocinas. Porém, a produção destes mediadores inflamatórios é potencialmente prejudicial para o hospedeiro, sendo, portanto fortemente controlada por mecanismos reguladores (STEEVELS & MEYAARD, 2011). Diante disso, a maior apoptose de monócitos do que de outras populações celulares nos diferentes grupos estudados, indica que esta pode ser uma população celular alvo das células T reguladoras nas diferentes formas clínicas, que através de diversos mecanismos tenta controlar a resposta imune não apenas reduzindo a atividade inflamatória dos monócitos, mas também diminuindo a capacidade de apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T efetores. Porém, nos pacientes com a forma clínica cardíaca, a supressão dos monócitos parece não ser suficiente e outros mecanismos como a apoptose das células T reguladoras podem colaborar com a não eficiência do sistema imune em controlar a inflamação. O estudo das células T reguladoras no contexto da infecção tem mostrado que essas células formam um componente essencial para a proteção do hospedeiro através de sua atividade de limitar uma resposta imune exagerada. Entretanto, a presença destas células pode também ser prejudicial para o hospedeiro uma vez que podem auxiliar na persistência do patógeno suprimindo a resposta imune efetora contra o parasito (MILLS, 2004). A indução da apoptose como mecanismo supressor induzido pelas células T reguladoras pode ser importante para impedir uma resposta imune exagerada montada contra o *T. cruzi* como observado nos pacientes com a forma clínica indeterminada. No entanto mecanismos que envolvem estas células parecem estar também relacionados com a progressão da doença para a forma clínica cardíaca.

O papel das células T reguladoras na infecção pelo *T. cruzi* ainda não foi estabelecido, neste estudo observamos diferenças quanto à frequência destas células e a expressão fenotípica de moléculas relacionadas a apoptose entre os grupos de pacientes com a forma clínica indeterminada e cardíaca ou entre as distintas formas clínicas e o grupo de indivíduos não infectados. A expressão diferencial de cada molécula indutora de apoptose e seus receptores sugere que mecanismos supressores distintos possam estar atuando em cada forma clínica da doença de chagas.

8.0 - CONCLUSÃO

Os resultados adquiridos com o desenvolvimento deste trabalho trouxeram um melhor entendimento sobre o papel das células T reguladoras, bem como sobre a apoptose como mecanismo de supressão induzidos por estas células e avaliada através da expressão de moléculas indutoras de morte celular e seus receptores. A partir dos dados apresentados neste estudo, conclui-se, que diferentes mecanismos indutores de apoptose parecem estar relacionados com o desenvolvimento da forma clínica indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas. Desta forma, a indução da apoptose pelas células T reguladoras de pacientes com a forma clínica indeterminada seria responsável por controlar o desenvolvimento da miocardiopatia. No entanto, a apoptose das células T reguladoras de pacientes com a forma clínica cardíaca levaria a menor frequência destas células e consequentemente reduzida capacidade de regulação da resposta imune e assim maior morbidade neste grupo.

Estes achados reforçam a importância das células T reguladoras no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de chagas, sugerindo que a resposta imune contra o *T. cruzi* pode ser regulada através de distintos mecanismos supressores, entretanto os mecanismos presentes nos pacientes com a forma clínica cardíaca parecem reduzir a atividade das células T reguladoras ou não serem suficientes para controlar resposta inflamatória.

9.0 - REFERÊNCIAS

ALIBERTI JC, CARDOSO MA, MARTINS GA, GAZZINELI RT, VIEIRA LQ, SILVAS JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):1961-7.

ANDRADE, ZA. A forma indeterminada da doença de chagas em tempos de controle do *Triatoma infestans* / The indeterminate form of Chagas disease in times of *Triatoma infestans* control. *Rev. patol. trop*; 34(2):105-111, maio-ago. 2005.

ANDRADE ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:71-80.

ANDRADE ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol*. 1991 Feb;142(2):126-9.

ANDREOLLO, NA and MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. *ABCD, arq. bras. cir. dig.* [online]. 2009, vol.22, n.4, pp. 185-191. ISSN 0102-6720.

APPAY V, ZAUNDERS JJ, PAPAGNO L, SUTTON J, JARAMILLO A, WATERS A, EASTERBROOK P, GREY P, SMITH D, MCMICHAEL AJ, COOPER DA, ROWLAND-JONES SL, KELLEHER AD. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol*. 2002 Jun 1;168(11):5954-8.

APT B W, HEITMANN G I, JERCIC L MI, JOFRÉ M L, MUÑOZ C Del V P, NOEMÍ H I, SAN MARTÍN V AM, SAPUNAR P J, TORRES H M, ZULANTAY A I. [Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease]. *Rev Chilena Infectol*. 2008 Oct;25(5):380-3.

ARAÚJO-JORGE TC, WAGHABI MC, SOEIRO MDE N, KARAMIDAS M, BAILLY S, FEIGE JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Oct-Dec;19(5-6):405-13.

AZUMA M, PHILLIPS JH, LANIER LL. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol.* 1993 Feb 15;150(4):1147-59.

BAECHER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1245-53.

BAHIA-OLIVEIRA LM, GOMES JA, ROCHA MO, MOREIRA MC, LEMOS EM, LUZ ZM, PEREIRA ME, COFFMAN RL, DIAS JC, CANÇADO JR, GAZZINELI G, CORRÊA-OLIVEIRA R. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):127-31. PubMed PMID: 9686189.

BATTAGLIA M, BLAZAR BR, RONCAROLO MG. The puzzling world of murine T regulatory cells. *Microbes Infect.* 2002 Apr;4(5):559-66.

BELKAID Y, PICCIRILLO CA, MENDEZ S, SHEVACHS EM, SACKS DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 2002 Dec 5;420(6915):502-7.

BERIOU G, COSTANTINO CM, ASHLEY CW, YANG L, KUCHROO VK, BAECHER-ALLAN C, HAFLER DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 2009 Apr 30;113(18):4240-9.

BOCCHI EA, BELLOTI G, MOCELIN AO, UIP D, BACAL F, HIGUCHI ML, AMATONETO V, FIORELLI A, STOLF NA, JATENE AD, PILEGGI F. Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. *Ann Thorac Surg.* 1996 Jun;61(6):1727-33.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2(10):907-16.

BRENER Z, GAZZINELLI RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997 Oct;114(2):103-10.

BROWN KE, FREEMAN GJ, WHERRY EJ, SHARPE AH. Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol.* 2010 Jun;22(3):397-401.

CARDILLO F, POSTOL E, NIHEI J, AROEIRA LS, NOMIZO A, MENGEL J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. Immunology. 2007 Dec;122(4):584-95.Epub 2007 Jul 16.

CARDILLO F, VOLTARELLI JC, REED SG, SILVA JS. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells.Infect Immun. 1996 Jan;64(1):128-34.

CLAYTON J. Chagas disease 101. Nature. 2010 Jun 24;465(7301):S4-5.

CORTHAY A. How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. 2009 Oct;70(4):326-36.

COURA JR, VIÑAS PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010 Jun 24;465(7301):S6-7.

COURA JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.

CUNHA-NETO E, NOGUEIRA LG, TEIXEIRA PC, RAMASAWMY R, DRIGO SA, GOLDBERG AC,FONSECA SG, BILATE AM, KALIL J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:252-8.

CZYSTOWSKA M, STRAUSS L, BERGMANN C, SZAJNIK M, RABINOWICH H, WHITESIDE TL. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin 2 (IL-2). J. Mol. Med. 88: 577-588, 2010.

D'AVILA DA, GUEDES PM, CASTRO AM, GONTIJO ED, CHIARI E, GALVÃO LM. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Feb;104(1):100-5.

DE ALMEIDA EA, RAMOS JÚNIOR AN, CORREIA D, SHIKANAI-YASUDA MA. Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop. 2011 Nov-Dec;44(6):762-70.

DE ARAÚJO FF, CORRÊA-OLIVEIRA R, ROCHA MO, CHAVES AT, FIUZA JA, FARES RC, FERREIRA KS, NUNES MC, KEESEN TS, DAMASIO MP, TEIXEIRA-CARVALHO A, GOMES JA. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. Immunobiology. 2012 Aug;217(8):768-77. (Artigo publicado)

DE ARAÚJO FF, DA SILVEIRA AB, CORREA-OLIVEIRA R, CHAVES AT, ADAD SJ, FIUZA JA, FARES RC, FERREIRA KS, FUJIWARA RT, SILVA GOMES JA. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. Hum Pathol. 2011b Feb;42(2):299-301.

DE ARAUJO FF, GOMES JA, ROCHA MO, WILLIAMS-BLANGERO S, PINHEIRO VM, MORATO MJ, CORREA-OLIVEIRA R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Front Biosci. 2007 May 1;12:2797-806.

DE OLIVEIRA GM, DINIZ RL, BATISTA W, BATISTA MM, BANI CORREA C, DE ARAÚJO-JORGE TC, HENRIQUES-PONS A. Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by Trypanosoma cruzi infection. Am J Pathol. 2007 Jul;171(1):79-86.

DE REZENDE, J.C.M. Chagas disease of the digestive tract (author's transl). Rev. Med. Chil. 107(1):71-2, 1979.

DIAS JC, DIAS E, MARTINS-FILHO OA, VITELLI-AVELAR D, CORREIA D, LAGES E, PRATA A. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Sep-Oct;41(5):505-6. Erratum in: *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Nov-Dec;41(6):696.

DIAS JC. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2000;16 Suppl 2:43-59.

DIAS JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989 Jul-Sep;22(3):147-56.

D'IMPERIO LIMA MR, EISEN H, MINOPRIO P, JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):353-6.

DOSREIS, GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 44(2), 84-90. 2011.

DOSREIS GA, LOPES MF. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(4):259-62.

DUTRA WO, GOLLOB KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Jun;21(3):287-92.

DUTRA WO, MARTINS-FILHO OA, CANÇADO JR, PINTO-DIAS JC, BRENER Z, GAZZINELLI G, CARVALHO JF, COLLEY DG. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1996 Jan;43(1):88-93.

DUTRA WO, MARTINS-FILHO OA, CANÇADO JR, PINTO-DIAS JC, BRENER Z, FREEMAN JÚNIOR GL, COLLEY DG, GAZZINELI G, PARRA JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol*. 1994 Apr;6(4):499-506. PubMed PMID: 8018591.

ELIAS FE, VIGLIANO CA, LAQUENS RP, LEVIN MJ, BEREK C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Feb;68(2):242-7.

FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, ORABONA C, VACCA C, BIANCHI R, BELLADONNA ML, FIORETTI MC, ALEGRE ML, PUC CETTI P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206-12.

FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.

FERREIRA RC, IANNI BM, ABEL LC, BUCK P, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Apr;98(3):407-11.

FRANCISCO LM, SAGE PT, SHARPE AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:219-42.

GOLGHER D, GAZZINELLI RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*. 2004 Aug;37(5):399-409.

GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, MARTINS-FILHO OA, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1185-93.

GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, BUSEK SC, TEIXEIRA MM, SILVA JS, CORREA-OLIVEIRA R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7960-6.

GONDEK DC, LU LF, QUEZADA SA, SAKAGUCHI S, NOELLE RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1783-6.

GUEDES PM, GUTIERREZ FR, SILVA GK, DELLALIBERA-JOVILIANO R, RODRIGUES GJ, BENDHACK LM, RASSI A Jr, RASSI A, SCHMIDT A, MACIEL BC, MARIN NETO JA, SILVA JS. 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.* 2012;6(4):e1630.

GUICCIARDI ME, GORES GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009 Jun;23(6):1625-37.

GUILLERMO LV, PEREIRA WF, DE MEIS J, RIBEIRO-GOMES FL, SILVA EM, KROLL-PALHARES K, TAKIYA CM, LOPES MF. Targeting Caspases in Intracellular Protozoan Infections. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2008 Sep 10:1-30.

GUILLERMO LV, SILVA EM, RIBEIRO-GOMES FL, DE MEIS J, PEREIRA WF, YAGITA H, DOSREIS GA, LOPES MF. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Leukoc. Biol.* 2007.

GUTIERREZ FR, MARIANO FS, OLIVEIRA CJ, PAVANELLI WR, GUEDES PM, SILVA GK, CAMPANELLI AP, MILANEZI CM, AZUMA M, HONJO T, TEIXEIRA MM, ALIBERTI JC, SILVA JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. *Infect Immun.* 2011 May;79(5):1873-81.

GRITZAPIS AD, VOUTSAS IF, LEKKA E, PAPAMICHAIL M, BAXEVANIS CN. Peptide vaccination breaks tolerance to HER-2/neu by generating vaccine-specific FasL(+) CD4(+) T cells: first evidence for intratumor apoptotic regulatory T cells. *Cancer Res.* 2010 Apr 1;70(7):2686-96.

HARA M, KINGSLEY CI, NIIMI M, READ S, TURVEY SE, BUSHELL AR, MORRIS PJ, POWRIE F, WOOD KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol.* 166(6):3789-96. 2001.

HAREL-BELLAN A, JOSKOWICZ M, FRADELIZI D, EISEN H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1983.

HASKÓ G, LINDEN J, CROSTEIN B, PACHER P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Sep;7(9):759-70.

HIGUCHI Mde L, GUTIERREZ PS, AIELLO VD, PALOMINO S, BOCCHI E, KALIL J, BELLOTTI G, PILEGGI F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.

HIRANO F, KANEKO K, TAMURA H, DONG H, WANG S, ICHIKAWA M, RIETZ C, FLIES DB, LAU JS, ZHU G, TAMADA K, CHEN L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):1089-96.

HISAEDA H, MAEKAWA Y, IWAKAWA D, OKADA H, HIMENO K, KISHIHARA K, TSUKUMO S, YASUTOMO K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):29-30.

HOFMEYER KA, JEON H, ZANG X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:451694.

HORI S and SAKAGUCHI S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2004 Jul;6(8):745-51.

HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

IWAI Y, ISHIDA M, TANAKA Y, OKAZAKI T, HONJO T, MINATO N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12293-7.

JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):348-57.

JOSEFOWICZ SZ, LU LF, RUDENSKY AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-64.

KHATTRI R, COX T, YASAYKO SA, RAMSDELL F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):337-42.

KONDĚLKOVÁ K, VOKURKOVÁ D, KREJSEK J, BORSKÁ L, FIALA Z, CTIRADC A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2010;53(2):73-7.

KOTNER J, TARLETON R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 2007 Feb;75(2):861-9.

KRAUSZ LT, BIANCHINI R, RONCHETTI S, FETTUCCIARI K, NOCENTINI G, RICCARDI C. GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation. *ScientificWorldJournal.* 2007 May 1;7:533-66.

LAGES-SILVA E, CREMA E, RAMIREZ LE, MACEDO AM, PENA SD, CHIARI E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):435-41.

LAW JP, HIRSCHKORN DF, OWEN RE, BISWAS HH, NORRIS PJ, LANTERI MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A.* 2009 Dec;75(12):1040-50. Erratum in: *Cytometry A.* 2010 Feb;77(2):203.

LIEBERMAN J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003 May;3(5):361-70.

LIU H, HU B, XU D, LIEW FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5012-7.

LOPES MF, NUNES MP, HENRIQUE-PONS A, GIESE N, MORSE HC 3rd, DAVIDSON WF, ARAÚJO-JORGE TC, DOS REIS GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(1):81-89.

LOPES MF, DOS REIS GA. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: selective triggering of CD4+ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infect Immun.* 1996; 64(5):1559-1564.

LOPES MF, CUNHA JM, BEZERRA FL, GONZALES MS, GOMES JE, LAPA E SILVA JR, GARCIA ES, DOS REIS GA. *Trypanosoma cruzi*: both chemically induced and triatomine-derived metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host. *Exp Parasitol.* 1995; 80(2):194-204.

LOPES MF, DA VEIGA VF, SANTOS AR, FONSECA ME, DOS REIS GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 1995; 154(2):744-752.

MAI J, WANG H, YANG XF. Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Front Biosci.* 2010 Jun 1;15:986-1006.

MALASPINA TS, GASPAROTO TH, COSTA MR, DE MELO EF Jr, IKOMA MR, DAMANTE JH, CAVASSANI KA, GARLET GP, DA SILVA JS, CAMPANELLI AP. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Jul;60(7):965-74.

MALOY KJ, POWRIE F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):816-22.

MARCON GE, DE ALBUQUERQUE DM, BATISTA AM, ANDRADE PD, ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, TEIXEIRA MA, COSTA SC. Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011Feb;106(1):85-91.

MARIANO FS, GUTIERREZ FR, PAVANELLI WR, MILANEZI CM, CAVASSANI KA, MOREIRA AP, FERREIRA BR, CUNHA FQ, CARDOSO CR, SILVA JS. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. *Microbes Infect.* 2008 Jun;10(7):825-33.

MARINHO CR, D'IMPÉRIO LIMA MR, GRISOTTO MG, ALVAREZ JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):308-18.

MARTINS GA, CARDOSO MGA, ALIBERTI JCS, SILVA JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunol Lett. 1998; 63:113-120.

MAYA JD, ORELLANA M, FERREIRA J, KEMMERLING U, LÓPEZ-MUÑOZ R, MORELLO A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biol Res. 2010;43(3):323-31.

MCGRATH MM, NAJAFIAN N. The role of coinhibitory signaling pathways in transplantation and tolerance. Front Immunol. 2012;3:47.

MENDEZ S, RECKLING SK, PICCIRILLO CA, SACKS D, BELKAID Y. Role for CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. J Exp Med. 2004 Jul 19;200(2):201-10.

MENEZES CA, ROCHA MO, SOUZA PE, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin Exp Immunol. 2004 Jul;137(1):129-38.

MENGEL J, DARÉ L, DARÉ GM, DELGADO M, NOMIZO A, SILVA JS, CAMPOS-NETO A. An activated murine B cell lymphoma line (A-20) produces a factor-like activity which is functionally related to human natural killer cell stimulatory factor. Eur J Immunol. 1992 Dec;22(12):3173-8.

MILLS KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol. 2004 Nov;4(11):841-55.

MINOPRIO PM, COUTINHO A, JOSKOWICZ M, D'IMPERIO LIMA MR, EISEN H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand J Immunol. 1986 Dec;24(6):669-79.

MIYAZAKI Y, HAMANO S, WANG S, SHIMANOE Y, IWAKURA Y, YOSHIDA H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1150-7.

MONCAYO A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jul;98(5):577-91.

MONTAGNOLI C, BACCI A, BOZZA S, GAZIANO R, MOSCI P, SHARPE AH, ROMANI L. B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2002 Dec 1;169(11):6298-308.

NIKOLOVA M, CARRIERE M, JENABIAN MA, LIMOU S, YOUNAS M, KÖK A, HUË S, SEDDIKI N, HULIN A, DELANEAU O, SCHUITEMAKER H, HERBECK JT, MULLINS JI, MUHTAROVA M, BENSUSSAN A, ZAGURY JF, LELIEVRE JD, LÉVY Y. CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog.* 2011 Jul;7(7):e1002110. doi:10.1371/journal.ppat.1002110.

OKAZAKI T, HONJO T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007 Jul;19(7):813-24.

PANG Y, NORIHISA Y, BENJAMIN D, KANTOR RR, YOUNG HA. Interferon-gamma gene expression in human B-cell lines: induction by interleukin-2, protein kinase C activators, and possible effect of hypomethylation on gene regulation. *Blood.* 1992 Aug 1;80(3):724-32.

PAPPU R, RAMIREZ-CARROZZI V, SAMBANDAM A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology.* 2011 Sep;134(1):8-16. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03465.x.

PAULSEN M, JANSSEN O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun Signal.* 2011 Apr 8;9:7.

PICCIRILLO CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*. 2008 Sep;43(3):395-401.

POPE RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jul;2(7):527-35.

RAGHAVAN S, HOLMGREN J. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 May 1;44(2):121-7.Review. PubMed PMID: 15866205.

READ S, MALMSTRÖM V, POWRIE F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):295-302.

REARDON C, WANG A, MCKAY DM. Transient local depletion of Foxp3+ regulatory T cells during recovery from colitis via Fas/Fas ligand-induced death. *J Immunol*.2008 Jun 15;180(12):8316-26.

REIS DD, JONES EM, TOSTES S Jr, LOPES ER, GAZZINELLI G, COLLEY DG, MCCURTLEY TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 May;48(5):637-44. PubMed PMID:8517482.

REYES JL, TERRAZAS LI, ESPINOZA B, CRUZ-ROBLES D, SOTO V, RIVERA-MONTOYA I,GÓMEZ-GARCÍA L, SNIDER H, SATOSKAR AR, RODRÍGUEZ-SOSA M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 2006 Jun;74(6):3170-9.

RILEY JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):114-25.

ROCHA MO, NUNES MC, RIBEIRO AL. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:159-66.

ROCHA MO, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* 2003 Jan 1;8:e 44-54.

RODRIGUES V Jr, AGRELLI GS, LEON SC, SILVA TEIXEIRA DN, TOSTES S Jr, ROCHA-RODRIGUES DB. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas'disease. *Microbes Infect.* 2008 Jan;10(1):29-37.

RODRIGUES MM, OLIVEIRA AC, BELLIO M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*:Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res.* 2012;2012:507874.

SAKAGUCHI S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.

SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

SANTOS RF, PÔSSA MA, BASTOS MS, GUEDES PM, ALMEIDA MR, DEMARCO R, VERJOVSKI-ALMEIDA S, BAHIA MT, FIETTO JL. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(3):e387.

SATHLER-AVELAR R, LEMOS EM, REIS DD, MEDRANO-MERCADO N, ARAÚJO-JORGE TC, ANTAS PR, CORRÊA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA-CARVALHO A, ELÓI-SANTOS SM, FAVATO D, MARTINS-FILHO OA. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 2003 Dec;58(6):655-63.

SCHMIDT A, OBERLE N, KRAMMER PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012;3:51.

SHARPE AH, WHERRY EJ, AHMED R, FREEMAN GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007 Mar;8(3):239-45.

SHEVACH EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009 May;30(5):636-45.

SHIMIZU J, YAMAZAKI S, TAKAHASHI T, ISHIDA Y, SAKAGUCHI S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002 Feb;3(2):135-42.

SILVA EM, GUILLERMO LV, RIBEIRO-GOMES FL, DE MEIS J, NUNES MP, SENRA JF, SOARES MB, DOSREIS GA, LOPES MF. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(3):738-746.

SILVA EM, GUILLERMO LV, RIBEIRO-GOMES FL, DE MEIS J, PEREIRA RM, WU Z, CALEGARI-SILVA TC, SEABRA SH, LOPES UG, SIEGEL RM, DOSREIS GA, LOPES MF. Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 2005; 174(10):6314-6321.

SILVA JS, MORRISSEY PJ, GRABSTEIN KH, MOHLER KM, ANDERSON D, REED SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* 1992 Jan 1;175(1):169-74.

SOUZA PE, ROCHA MO, MENEZES CA, COELHO JS, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. Infect Immun. 2007 Apr;75(4):1886-94.

SOUZA PE, ROCHA MO, ROCHA-VIEIRA E, MENEZES CA, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas'disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5283-91.

SOUZA VDO C, SCHLEMMER KB, NOAL CB, JAQUES JA, ZIMMERMANN CE, LEAL CA, FLECK J, CASALI EA, MORSCH VM, SCHETINGER MR, LEAL DB. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas'disease. Parasitol Int. 2012 Dec;61(4):690-6.

STEEVELS TA, MEYAARD L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. Eur J Immunol. 2011 Mar;41(3):575-87. doi: 10.1002/eji.201041179.

STEINDEL M, KRAMER PACHECO L, SCHOLL D, SOARES M, DE MORAES MH, EGER I, KOSMANN C, SINCERO TC, STOCO PH, MURTA SM, DE CARVALHO-PINTO CJ, GRISARD EC. Characterization of Trypanosoma cruzi isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Jan;60(1):25-32.

STRASSER A, JOST PJ, NAGATA S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity. 2009 Feb 20;30(2):180-92.

STRAUSS L, BERGMANN C, WHITESIDE TL. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. J Immunol. 2009 Feb 1;182(3):1469-80.

TAKAHASHI T, TAGAMI T, YAMAZAKI S, UEDE T, SHIMIZU J, SAKAGUCHI N, MAK TW, SAKAGUCHI S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303-10.

TALVANI A, ROCHA MO, BARCELOS LS, GOMES YM, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 1;38(7):943-50.

TANG Y, JIANG L, ZHENG Y, NI B, WU Y. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol*. 2012 Apr 11;13:17.

TANG Q, ADAMS JY, TOOLEY AJ, BI M, FIFE BT, SERRA P, SANTAMARIA P, LOCKSLEY RM, KRUMMEL MF, BLUESTONE JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*. 2006 Jan;7(1):83-92.

TARLETON RL, KOLLER BH, LATOUR A, POSTAN M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):338-40.

TARRIO ML, GRABIE N, BU DX, SHARPE AH, LICHTMAN AH. PD-1 protects against inflammation and myocyte damage in T cell-mediated myocarditis. *J Immunol*. 2012 May 15;188(10):4876-84.

TEIXEIRA AR, NITZ N, GUIMARO MC, GOMES C, SANTOS-BUCH CA. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 2006 Dec;82(974):788-98.

TEIXEIRA MM, GAZZINELI RT, SILVA JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002 Jun;18(6):262-5.

TOSO M A, VIAL U F, GALANTI N. [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil*. 2011 Feb;139(2):258-66.

TOSTES S Jr, BERTULUCCI ROCHA-RODRIGUES D, DE ARAUJO PEREIRAde G, RODRIGUES V Jr. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 2005 Mar 18;99(2):233-7.

VESPA GN, CUNHA FQ, SILVA JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):5177-82.

VILLANI FN, ROCHA MO, NUNES MDO C, ANTONELLI LR, MAGALHÃES LM, DOS SANTOS JS, GOLLOB KJ, DUTRA WO. *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 Oct;78(10):4421-30.

VINHAES MC, DIAS JC. Chagas disease in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2000;16 Suppl 2:7-12.

VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, MASSARA RL, BORGES JD, LAGE PS, LANA M, TEIXEIRA-CARVALHO A, DIAS JC, ELÓI-SANTOS SM, MARTINS-FILHO OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25^{high} T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 2006 Jul;145(1):81-92.

VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, DIAS JC, PASCOAL VP, TEIXEIRA-CARVALHO A, LAGE PS, ELÓI-SANTOS SM, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2005 Sep;62(3):297-308.

VOO KS, WANG YH, SANTORI FR, BOGGIANO C, WANG YH, ARIMA K, BOYER L, HANABUCHI S, KHALILI J, MARINOVA E, ZHENG B, LITTMAN DR, LIU YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4793-8.

WANG W, LAU R, YU D, ZHU W, KORMAN A, WEBER J. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4⁺ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol*. 2009 Sep;21(9):1065-77.

WEISS EM, SCHMIDT A, VOBIS D, GARBI N, LAHL K, MAYER CT, SPARWASSER T, LUDWIG A, SURI-PAYER E, OBERLE N, KRAMMER PH. Foxp3-mediated suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 Aug 15;187(4):1684-91.

WING K, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):7-13.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Tropical disease research: results portfolio: Highlits 1998/99, Geneva: WHO, 2000.

WORKMAN CJ, SZYMCZAK-WORKMAN AL, COLLISON LW, PILLAI MR, VIGNALI DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Aug;66(16):2603-22.

YANG XF. Factors regulating apoptosis and homeostasis of CD4⁺ CD25(high)FOXP3⁺ regulatory T cells are new therapeutic targets. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:1472-99.

YI H, ZHEN Y, JIANG L, ZHENG J, ZHAO Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Cell Mol Immunol*. 2006 Jun;3(3):189-95.

ZHANG ZG, HE QY, LIU XM, TANG XY, CHEN LZ. [Effect of Interleukin-17 on neutrophil apoptosis]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2006 Jun 18;38(3):305-9.

ZHANG L, TARLETON RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):480-6.

ZHOU F. Expression of multiple granzymes by cytotoxic T lymphocyte implies that they activate diverse apoptotic pathways in target cells. *Int Rev Immunol.* 2010;29(1):38-55. Review. Erratum in: *Int Rev Immunol.* 2010 Apr;29(2):234.

ZHU F, WANG Q, GUO C, WANG X, CAO X, SHI Y, GAO F, MA C, ZHANG L. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2011 Nov;141(2):152-60. doi:10.1016/j.clim.2011.07.003.

ZUÑIGA E, MOTRAN C, MONTES CL, DIAZ FL, BOCCO JL, GRUPPI A. Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin Exp Immunol.* 2000 Mar;119(3):507-15.

10.0 - ANEXO I PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Apresentação de trabalhos em congressos:

- "APOPTOSIS AS MECHANISM OF SUPPRESSION OF REGULATORY T CELLS IN CHAGAS DISEASE." **DAMASIO, MPS**; ROCHA, MOC; FERREIRA, KS; VALENTE, VAA; FARES, RCG; CORREA-OLIVEIRA, R; GOMES, JAS. III European congress of immunology, held on September 5th - 8th 2012, in Glasgow, Scotland. Apresentação em formato de pôster.

- "DIFFERENT APOPTOTIC MECHANISMS PRESENTED BY REGULATORY T CELLS ARE INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF CHAGAS DISEASE." **DAMASIO, MPS**; CORREA-OLIVEIRA, R; FERREIRA, KS; VALENTE, VAA; FARES, RCG; SOUSA, GR; ARAUJO, AD; MEDEIROS, NI; CHAVES, AT; DE ARAUJO, FF; DUTRA, WO; ROCHA, MOC; GOMES, JAS. XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, held on October 20th - 24th 2012 in Campos do Jordão, São Paulo, Brazil. Apresentação em format de poster.

Artigos publicados

- DE ARAÚJO FF, CORRÊA-OLIVEIRA R, ROCHA MO, CHAVES AT, FIUZA JA, FARES RC, FERREIRA KS, NUNES MC, KEESEN TS, **DAMASIO MP**, TEIXEIRA-CARVALHO A, GOMES JA. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. Immunobiology. 2012 Aug;217(8):768-77.

Participação em eventos

- IV Simpósio de Biologia Celular - Prof. Ângelo Barbosa Monteiro Machado. Realizado de 8 a 12 de Agosto de 2011, na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

- XXXVI Brazilian Congress of Immunology held on October 15th - 19th 2011 in Foz do Iguaçu- Paraná, Brazil.

- XXVI Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XV Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, realizadas em 26, 27, 28 de Outubro de 2011 na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

- Simpósio Professor Alfredo Goes - Integrando Ciência e Educação. Realizado nos dias 12 e 13 de Abril na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

- I Simpósio de Integração dos programas de Pós-graduação em Biologia Celular e V Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Prof. Luiz Renato de França. Realizado no período de 27 a 31 de Agosto no CAD1 da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

- III European Congress of Immunology held on September 05th - 08th 2012 in Glasgow, United Kingdom.