

**Fernanda Nobre Amaral Villani**

**Imunoregulação na doença de Chagas  
humana: estudo das células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e  
mecanismos de controle de expressão de  
citocinas**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte – MG

2010

**Fernanda Nobre Amaral Villani**

**Imunoregulação na doença de Chagas  
humana: estudo das células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e  
mecanismos de controle de expressão de  
citocinas**

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

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra, Departamento de Morfologia - ICB, UFMG.

Co-orientadores: Dr. Kenneth John Gollob, Santa Casa de Misericórdia – Belo Horizonte - MG, e Dr. Ricardo Santiago Gomez, Departamento de Clínica Patológica e Cirurgia Odontológica, Faculdade de Odontologia, UFMG.

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2010

Esta tese foi desenvolvida nos Laboratórios de Biologia das Interações Celulares e Biologia dos Linfócitos do ICB-UFMG e no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG sob a orientação dos professores Drs. Walderez Ornelas Dutra, Kenneth John Gollob e Ricardo Santiago Gomez.

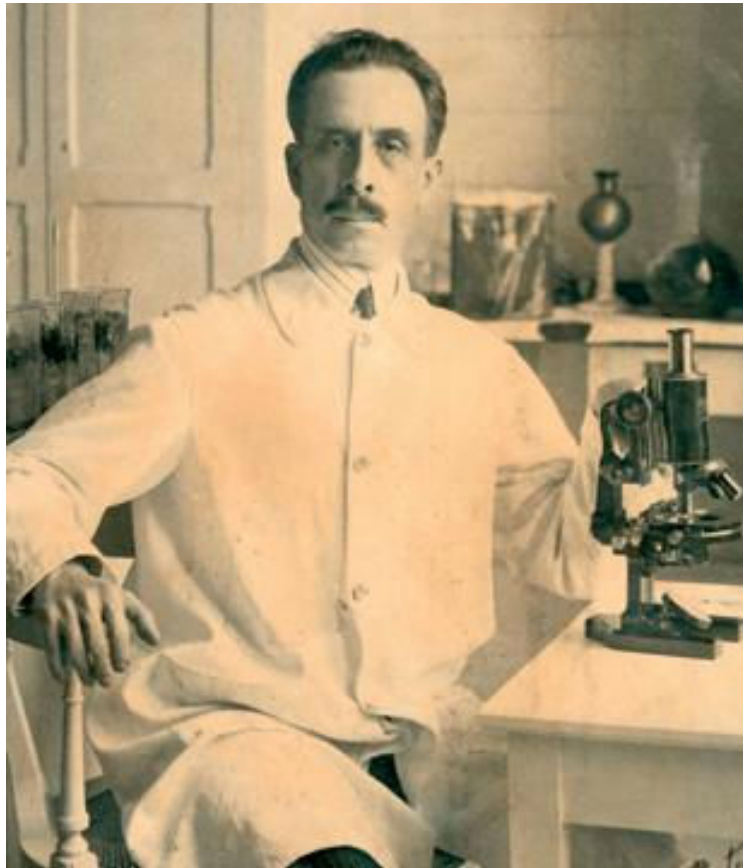
O trabalho contou, ainda, com a colaboração do Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (Centro de Tratamento de Doenças Infecto-Parasitárias da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG), Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Instituto Rene Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG), e dos doutores Lee Herzenberg, Len Herzenberg e Rabin Tirouvanziam (Genetics Department, Stanford University School of Medicine).

Agências financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Organização Mundial de Saúde - OMS



**“Nós precisamos acabar com essa doença. Nós temos que cuidar dessa gente.”**

João Carlos Pinto Dias, em homenagem a Carlos Chagas.  
Simpósio Internacional da descoberta da Doença de Chagas.  
Rio de Janeiro, 8 de julho de 2009.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
que com muito amor, confiança e  
sabedoria de vida me conduziram  
até aqui.

## ***Agradecimentos***

A realização deste trabalho foi possível graças ao empenho de muitas pessoas, mas, antes de agradecê-las, agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui.

À minha orientadora Wal, agradeço por ser a grande responsável e entusiasta deste trabalho, por todo o apoio, confiança e, acima de tudo, pela ótima convivência e parceria ao longo do meu Mestrado e Doutorado.

Aos meus co-orientadores Ken e Ricardo, agradeço pela disponibilidade em ajudar e pelas valiosas idéias que contribuíram para a boa condução deste trabalho.

Ao Professor Manoel Otávio, agradeço cada momento que pude desfrutar do seu valioso conhecimento sobre a doença de Chagas e, principalmente, do seu exemplo de ética e humanidade para com os pacientes.

À Lis, Lee e Len Herzenberg e Rabin, agradeço pela valiosa colaboração.

À Janete, minha companheira de bancada, agradeço pelo apoio nos experimentos e pela valiosa amizade! À Luísa, Carol e Diego, alunos exemplares de iniciação científica, agradeço pelo companheirismo, pelo apoio nos experimentos e em tudo mais. Aos demais companheiros do laboratório, Paula, Dani, Ge, Micena, Cris, Tat, Érica, Sabrina, agradeço pela boa convivência e pelos laços de amizade construídos.

Aos colegas do Laboratório do Ricardo, especialmente ao João, agradeço pela acolhida e grande colaboração.

Aos amigos, agradeço pelos momentos de descontração e pelo incentivo que sempre me ajudou a crescer.

À minha família, agradeço por estar sempre ao meu lado vibrando a cada vitória! Marcelo e Papaula pela torcida e admiração, mesmo de longe, Maria, Kiki e Lê pela ajuda com o Vini e apoio para eu terminar os experimentos.

Ao Dudu, agradeço pelo amor, cumplicidade e compreensão fundamentais para a minha vida mas, principalmente, agradeço por ser um pai amoroso e um marido apaixonado!

Ao meu filho, Vinícius, agradeço a maravilhosa companhia durante os experimentos, a qualificação e finalização deste trabalho. A mamãe só conseguiu porque você esteve sempre juntinho dela!

Aos meus pais dedico esta conquista que foi possível graças ao amor, coragem, dedicação, zelo e oração de vocês!

Às agências financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES,

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq,

Organização Mundial de Saúde – OMS,

Aos doadores,

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG e da Pós

Graduação em Biologia Celular

Muito obrigada!

## **Sumário**

Lista de Abreviaturas .....	3
Lista de Figuras .....	5
Lista de Quadros e Tabelas .....	7
Resumo.....	8
Abstract .....	10
1. Introdução.....	11
1.1 – Considerações gerais sobre a doença de Chagas.....	11
1.2 – Considerações gerais sobre a resposta imune celular.....	13
1.2.1 - Características gerais dos linfócitos T, especialmente das subpopulações CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> .....	13
1.2.2 - Ativação dos linfócitos T: receptor de células T (TCR), moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, coestimulação e diferenciação funcional.....	17
1.2.3 - Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> em diferentes quadros patológicos .....	22
1.3 – Reatividade celular na doença de Chagas .....	23
1.4. Aspectos gerais da sinalização intracelular de citocinas .....	26
1.5 – Aspectos gerais da regulação gênica pós-transcricional através dos MicroRNAs.....	28
1.6 – Hipótese de trabalho.....	30
2. Objetivo geral.....	31
2.1 - Objetivos específicos .....	31
3. Justificativa.....	33
4. Pacientes, Materiais e Métodos.....	35
4.1 – Desenho Experimental .....	35
4.2 - Pacientes .....	36
4.3 - Linhagens celulares para cultura de <i>T. cruzi</i> .....	37
4.4 - Obtenção dos parasitos .....	37
4.5 – Exposição de células do sangue total ao <i>T. cruzi</i> .....	38

4.6 – Anticorpos monoclonais.....	40
4.7 - Imunofluorescência para análise de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas .....	42
4.8 - Obtenção e infecção de células mononucleares do sangue periférico .....	43
4.9 – Extração do RNA .....	44
4.10 – Síntese de cDNA – Transcrição Reversa.....	45
4.11 – PCR em Tempo Real.....	46
4.12 - Análises estatísticas .....	47
5. Resultados .....	49
5.1 – Estudo das subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas .....	49
5.1.1 – Análise da frequência e do perfil de expressão de citocinas nas células T DN .....	49
5.1.2 – Análise da expressão de moléculas de ativação e coestimulação pelas células T DN .....	55
5.1.3 – Análise da expressão de Granzima A pelas células T DN .....	59
5.1.4 – Análise das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN.....	60
5.2 – Análise dos fatores de transcrição comprometidos com a sinalização intracelular de citocinas.....	64
5.2.1 - NFκB: Fator de transcrição da via pró-inflamatória .....	67
5.2.2 – STAT3: Fator de transcrição da via anti-inflamatória .....	68
5.2.3 - NFκB/STAT3: balanço entre as vias pró e anti-inflamatórias.....	69
5.3 - Análise dos microRNAs relacionados à regulação pós-transcricional do gene da IL-10 ...	70
6. Discussão.....	77
7. Resumo dos Resultados e Conclusão.....	95
8. Referências Bibliográficas .....	98



## ***Lista de Abreviaturas***

APC- Célula apresentadora de antígeno  
CD- *Cluster of differentiation* (grupos de diferenciação)  
cDNA – DNA complementar  
CMSP- Células mononucleares do sangue periférico  
COEP- Comitê de Ética em Pesquisa  
Ct - *Threshold cycle*  
CTLA-4- Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico  
Cy- Cy-chrome  
DC – Paciente com cardiopatia dilatada  
DN – Duplo Negativa  
DNA – Ácido desoxiribonucleico  
FITC- Isotiocianato de fluoresceína  
HLA- Antígeno leucocitário humano  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
hsa-miR – *Homo sapiens* microRNA  
I – Paciente com forma indeterminada  
IFN $\gamma$ - Interferon gama  
IgG- Imunoglobulina G  
IL- Interleucina  
LPS- Lipopolissacarídeo  
LVDD – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo  
LVEF – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo  
MED - Meio (sem estímulo)  
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade  
MIF – Média de intensidade de fluorescência  
miRNA – Micro RNA  
N- Indivíduo não chagásico  
NF $\kappa$ B – Fator nuclear  $\kappa$ B  
NK- Natural Killer

PBS - Phosphate Buffer Solution

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE- Ficoeritrina

pNF $\kappa$ B - NF $\kappa$ B fosforilado

pSTAT3 – STAT3 fosforilado

Q.S.P. – Quantidade suficiente para

RNA – Ácido ribonucleico

SBF- Soro Fetal Bovino

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

STAT - Transdutores de sinais e ativadores de transcrição

T.A. – Temperatura ambiente

TCR- Receptor de célula T

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

Th- Linfócito T helper

TNF $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral alfa

TRP - Tripo (infecção por *T. cruzi*)

$\alpha\beta$  - alfa beta

$\gamma\delta$  - gama delta

## ***Lista de Figuras***

Figura 1: Esquema do desenho experimental empregado na execução deste trabalho de pesquisa, evidenciando os grupos de indivíduos, as condições de análises e as avaliações realizadas. ....	35
Figura 2: Gráficos representativos das análises para estudo das células T DN. Perfis representativos da separação da população de linfócitos (A), da frequência de células T DN expressando o TCR $\alpha\beta$ (B) e de células T DN expressando o TCR $\gamma\delta$ (C). ....	49
Figura 3: Gráfico representativo da separação da população de células T $\alpha\beta$ DN (A) e histograma representativo da análise da expressão de CD69 por esta população (B). Estratégia semelhante foi utilizada para análise da expressão das moléculas CD28, CTLA-4 e Granzima A. ....	56
Figura 4: Porcentagem de células T $\alpha\beta$ DN (A) e células T $\gamma\delta$ DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD69, sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	56
Figura 5: Porcentagem de células T $\alpha\beta$ DN (A) e células T $\gamma\delta$ DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD28, sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	57
Figura 6: Porcentagem de células T $\alpha\beta$ DN (A) e células T $\gamma\delta$ DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CTLA-4 na superfície, sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	58
Figura 7: Porcentagem de células T $\alpha\beta$ DN (A) e células T $\gamma\delta$ DN (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) expressando granzima A, sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	60
Figura 8: Gráfico puntual representativo da separação da população de monócitos (A), e da análise dos monócitos CD14 <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> , neste exemplo (B). ....	61
Figura 9: Porcentagem de células CD14 <sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando HLA-DR, sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	62
Figura 10: Porcentagem de células CD14 <sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD1a (A) ou CD1b (B), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	63
Figura 11: Porcentagem de células CD14 <sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD1c (A) ou CD1d (B), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	64
Figura 12: Gráficos representativos das análises para estudo da expressão dos fatores de transcrição. As células foram selecionadas de acordo com sua área e seu tamanho (A), de acordo com sua viabilidade (B) e quanto ao seu tamanho e granulosidade (C). Para a distinção entre as diferentes populações do sangue periférico foram utilizados gráficos de granulosidade versus CD4 (D). A expressão dos fatores de transcrição foi avaliada através de histogramas, nos quais pode-se distinguir a expressão desses fatores nas células não estimuladas (MED) e estimuladas com <i>T. cruzi</i> (TRP) para cada grupo analisado: indivíduos não chagásicos (N) (E), pacientes com forma indeterminada (I) (F) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) (G). Na figura estão exemplificadas as expressões de NF $\kappa$ B pelos monócitos provenientes dos diferentes indivíduos. ....	66
Figura 13: Média de intensidade de fluorescência de pNF $\kappa$ B em linfócitos (A) e monócitos (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	67

Figura 14: Média de intensidade de fluorescência de pSTAT3 linfócitos (A) e monócitos (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	68
Figura 15: Razão entre as médias de intensidade de fluorescência de pNFκB e pSTAT3 em linfócitos de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	69
Figura 16: Log <sub>10</sub> da quantificação relativa (Log <sub>10</sub> 2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR20a em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	71
Figura 17: Quantificação relativa (2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR20a em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	72
Figura 18: Log <sub>10</sub> da quantificação relativa (Log <sub>10</sub> 2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR106a em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	73
Figura 19: Quantificação relativa (2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR106a em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	74
Figura 20: Log <sub>10</sub> da quantificação relativa (Log <sub>10</sub> 2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR106b em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). ....	75
Figura 21: Quantificação relativa (2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) de hsa-miR106b em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP).....	76
Figura 22: Esquema dos principais resultados obtidos neste trabalho. A porcentagem de células Tαβ DN e Tγδ DN expressando CD69 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por <i>T. cruzi</i> (1); A porcentagem de células Tαβ DN expressando CD28 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por <i>T. cruzi</i> (2); A porcentagem de células Tγδ DN expressando Granzima A aumenta nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por <i>T. cruzi</i> (3); As células T αβ DN estão mais comprometidas com a produção das citocinas proinflamatórias (IFN-γ, TNF-α e IL-17) em ambas as formas clínicas (4); As células T γδ DN apresentam um destacado aumento na expressão de IL-10 antígeno-específica nos pacientes com a forma indeterminada quando comparados aos pacientes com cardiopatia dilatada e aos indivíduos controles (5); Há uma correlação positiva entre a maior frequência de células T γδ DN expressando IL-10 com parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca nos pacientes (> LVEF, < LVDD) (6); A média de intensidade de fluorescência das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN (CD1a, CD1b, CD1c e CD1d) aumentou nos pacientes chagásicos após infecção por <i>T. cruzi</i> (7); A razão MIF pNFκB / MIF pSTAT3 de linfócitos aumentou nos pacientes cardíacos após infecção por <i>T. cruzi</i> (8); A expressão de miR106a pelas CMSP dos pacientes com a forma indeterminada diminui após infecção por <i>T. cruzi</i> (9).....	97

## ***Lista de Quadros e Tabelas***

Quadro 1 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas às células T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> . _____	41
Quadro 2 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas às moléculas apresentadoras de antígenos. _____	41
Quadro 3 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas aos fatores de transcrição. _____	42
Tabela 1: Frequência de células T $\alpha\beta$ DN e células T $\gamma\delta$ DN e porcentagem de expressão de citocinas por estas subpopulações provenientes de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). _____	52
Tabela 2: Taxas regulatórias (IL-10/ IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ou IL-17) das células T $\gamma\delta$ DN provenientes de pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) após infecção por <i>T. cruzi</i> _____	53
Quadro 4: Análises de correlação entre a frequência de células IL-10+ $\alpha\beta$ DN após infecção, ou entre a frequência de células IL-10+ $\gamma\delta$ DN após infecção e os parâmetros clínicos LVEF e LVDD. _____	54
Tabela 3: Médias de intensidade de fluorescência (MIF) das moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e HLA-DR) em células CD14 <sup>+</sup> provenientes do sangue periférico de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C), sem estímulo (MED) e após infecção por <i>T. cruzi</i> (TRP). _____	62

## **Resumo**

Vários pesquisadores têm avaliado a participação de células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (duplo negativas – DN) expressando TCR alfa-beta (TCR $\alpha\beta$ ) ou TCR gama-delta (TCR $\gamma\delta$ ) no desenvolvimento da resposta imune contra diferentes parasitos. Esses estudos indicam que as distintas subpopulações de células T DN tendem a apresentar perfis imunológicos bem diferentes, podendo direcionar uma resposta imune protetora ou patogênica. Além de avaliar as características dessas diferentes populações, é também de grande importância esclarecer o padrão de expressão de fatores de transcrição comprometidos com a sinalização intracelular das citocinas que ativam estas células, como também o padrão de expressão de reguladores gênicos dessas citocinas. O objetivo central desse trabalho foi avaliar a contribuição das subpopulações de células T DN na resposta imune contra o *T. cruzi*, e ainda avaliar a contribuição de fatores de transcrição e de reguladores pós-transcricionais relacionados com citocinas envolvidas no desenvolvimento ou controle da patologia chagásica. Nossos resultados mostraram que a infecção *in vitro* com *T. cruzi* leva à expansão de células T DN em pacientes com a forma indeterminada (I) e com cardiopatia dilatada (DC). Mostram ainda que ambas subpopulações,  $\alpha\beta^+$  e  $\gamma\delta^+$ , apresentam um perfil mais ativado, dado pela maior expressão de CD69, nos pacientes em relação aos controles. Apenas a subpopulação  $\gamma\delta^+$  apresenta maior expressão de granzima A após estímulo nos pacientes DC. Entretanto, enquanto as células T $\alpha\beta$  DN estão mais comprometidas com a produção de citocinas pró-inflamatórias, as células T $\gamma\delta$  DN mostram um significativo aumento da IL-10 antígeno-específica no grupo I comparado ao grupo DC. A maior frequência de células T $\gamma\delta$  DN produtoras de IL-10 está correlacionada com parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca. Também vimos que a apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos via CD1 parece ser relevante nos pacientes. Quanto aos fatores de transcrição, os linfócitos dos pacientes com cardiopatia dilatada apresentaram um perfil mais inflamatório, dado pelo aumento da razão NF $\kappa$ B/STAT3 após infecção com *T. cruzi*. Sobre a regulação de IL-10 observamos menor expressão de miR106a após o estímulo *in vitro* nas células de pacientes com a forma indeterminada. Nossos dados revelam uma importante contribuição das subpopulações de células T DN no desenvolvimento das formas clínicas polares da doença de Chagas e abrem novos caminhos, através do estudo dos mecanismos de controle e resposta de

citocinas, para a compreensão dos fatores que levam ao desenvolvimento da patologia ou proteção do hospedeiro.

## ***Abstract***

Several studies have evaluated the involvement of CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells (double negatives – DN) expressing alpha-beta TCR (TCR $\alpha\beta$ ) or gamma-delta (TCR $\gamma\delta$ ) in the development of immune response against different parasites. These studies suggested that distinct subpopulations of DN T cells tend to have very different immune profiles, which can drive to a protective or pathogenic immune response. Thus, it is important to know if these cells have distinct roles in human Chagas disease. Besides evaluating the characteristics of different lymphocytes populations, it is also relevant to understand the expression profile of transcription factors linked to cytokines intracellular signaling which activates these cell; likewise, it is important to comprehend the gene regulation pathways involved with these cytokines. The main aim of this work was to evaluate the possible contributions of different DN T cell subpopulations; and the contribution of transcription factors and post-transcriptional regulators of cytokines on the immune response during *T. cruzi* infection. Our results showed that *T. cruzi in vitro* infection leads to DN T cells expansion in patients with indeterminate (I) and dilated cardiac (DC) form. We have also observed that both subpopulations ( $\alpha\beta$ + and  $\gamma\delta$ +) show a more activated profile, as they had a higher expression of CD69 in patients, when compared with control individuals. Only  $\gamma\delta$ + subpopulation shows higher expression of granzyme A, after stimulus in DC patients. However, despite  $\alpha\beta$  DN T cells being more engaged in the production of pro-inflammatory cytokines,  $\gamma\delta$  DN T cells show a significant increase of antigen-specific IL-10 in group I whether compared to DC. The greater frequency of IL-10+  $\gamma\delta$  DN T cells is correlated to the better prognostic of cardiac function clinical parameters. We have also seen that the presentation of lipid/glycolipid antigen via CD1 seems to be relevant in patients. Concerning transcription factors, DC lymphocytes showed a more inflammatory profile, observed through the increase of NF $\kappa$ B/STAT3 ratio after *T. cruzi* infection. As for IL-10 regulation, we observed lesser expression of miR106a after *in vitro* stimulus in I patients cells. These data, altogether, show distinct functional characteristics for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  DN T cells related to distinct clinical profiles in human Chagas disease, and distinct pre and post-transcriptional responses in I and DC.



## **1. Introdução**

### **1.1 – Considerações gerais sobre a doença de Chagas**

Mais de cem anos após a grande descoberta de Carlos Chagas, a instigante doença que recebeu o seu nome permanece como um significativo problema de saúde pública, sustentando elevados índices de morbidade e mortalidade na América Latina (Marin-Neto *et al.*, 2007). A doença de Chagas afeta, principalmente, pessoas que vivem na zona rural, devido à maior probabilidade de contato com o inseto vetor e à proximidade dos reservatórios naturais do agente etiológico (Dias *et al.*, 2002; Moncayo, 2003). A doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que, na infecção clássica, é transmitido ao homem pelo vetor, um inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro. Os vetores do *T. cruzi* pertencem à família *Reduviidae* e a subfamília *Triatominae*, sendo os gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* os de maior relevância epidemiológica (Buscaglia & Di Noia, 2003). Já as transmissões transfusional e por transplante de órgãos sólidos têm levado a contaminação pelo *T. cruzi* a regiões urbanas, principalmente onde não há vigilância adequada nos bancos de sangue e de doação de órgãos (Leiby *et al.*, 1999; Barcán *et al.*, 2005). Além das formas de transmissão vetorial e transfusional, as contaminações congênitas, por via oral e por acidentes laboratoriais têm sido descritas como importantes (Brenner & Gazzinelli, 1997; Moncayo, 2003). A implantação do programa nacional de controle do inseto vetor diminuiu a incidência de novos casos da doença no Brasil (Dias e Coura, 1997). Porém, casos de contaminação vetorial descritos recentemente mostram a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica no país (Borges *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* apresenta-se sob quatro formas, morfológica e biologicamente distintas, durante seu ciclo nos hospedeiros mamíferos e nos insetos. A forma tripomastigota metacíclica

desenvolve-se no intestino do vetor triatomíneo e inicia a infecção em muitas espécies animais, incluindo o homem. Após a infecção dos hospedeiros mamíferos, os tripomastigotas ganham o interior das células e convertem-se na forma amastigota que se replica no citoplasma. Após vários ciclos de divisão binária, os amastigotas aflagelados convertem-se em tripomastigotas flagelados, que rompem as células e caem na circulação sanguínea. Assim, os tripomastigotas podem invadir outras células do mesmo hospedeiro, espalhando a infecção pelo organismo, ou ser ingeridos pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, transformando-se na forma epimastigota. Os epimastigotas replicam-se no intestino do inseto vetor e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados nas fezes e urina do barbeiro durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo biológico do parasita (Brener, 1971).

As pesquisas sobre sua evolução clínica, ao longo desses cem anos, mostraram que a doença de Chagas apresenta duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia, parasitismo de muitos tipos celulares, principalmente fibras musculares, e inflamação. Esta é uma fase curta, que dura de seis a oito semanas, evoluindo para a fase crônica que pode durar o resto da vida do paciente (Moncayo, 2003). A maioria dos pacientes crônicos desenvolve a forma clínica denominada indeterminada, estabelecendo um estado assintomático em que a infecção só é detectada por testes sorológicos e parasitológicos. Acredita-se que a fase indeterminada da doença de Chagas represente um estado de equilíbrio entre hospedeiro e parasita (Andrade, 1999). Além da forma indeterminada, que atinge cerca de 60% dos pacientes, a fase crônica da doença de Chagas pode apresentar-se pelo menos como mais três formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo do coração, hipertrofia do miocárdio, degeneração de miócitos e fibrose intersticial grave. Este quadro clínico caracteriza os diferentes espectros da forma cardíaca da doença (Higuchi *et al.*, 2003). Já a forma digestiva é

caracterizada por lesões no sistema nervoso autônomo do esôfago e cólon. A forma cardiodigestiva é menos comum, estando associada a alterações tanto no sistema cardiovascular como no sistema digestivo (Moncayo, 2003; Andradre, 1999). Dentre essas formas, a cardíaca é a que apresenta maior morbidade (Rocha *et al.*, 2003).

O sucesso do *T. cruzi* na manutenção do seu ciclo de vida está relacionado à sua habilidade em causar uma infecção permanente no hospedeiro vertebrado. O parasita, seja presente no interior das células ou na circulação sanguínea, está em contato, direto ou indireto, com componentes imunológicos do hospedeiro. Dessa forma, para manter a infecção latente, é necessário o estabelecimento de um equilíbrio entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro. A meta global dos estudos sobre a imunidade contra o *T. cruzi* é entender os mecanismos imunológicos envolvidos na resistência a este protozoário bem como a patogênese da doença de Chagas. Busca-se compreender os mecanismos envolvidos com a evolução clínica diferenciada da doença, na tentativa de se estabelecer formas de controle clínico da patologia.

## **1.2 – Considerações gerais sobre a resposta imune celular**

### **1.2.1 - Características gerais dos linfócitos T, especialmente das subpopulações CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>**

O sistema imune é uma rede complexa formada por células e seus mediadores que atuam de forma integrada no reconhecimento e defesa do organismo contra estímulos agressores. Quando esse sistema responde a uma infecção parasitária, ele é capaz de controlar o número de parasitos e, algumas vezes, conferir resistência à reinfecção. Por outro lado, se a resposta imune não for devidamente controlada também pode induzir patologia associada ao parasitismo. Dentre várias células que integram o sistema imune, os linfócitos, que são células capazes de reconhecer

especificamente determinantes antigênicos distintos, desempenham um papel central na defesa do organismo. Existem diferentes grupos de linfócitos que se distinguem, de uma maneira geral, por suas características morfológicas e funcionais.

Historicamente, os linfócitos B foram o alvo de investigação preferencial durante os primeiros anos de estudo da Imunologia. Sabe-se que as células B, além de se diferenciarem em plasmócitos que agem diretamente produzindo anticorpos específicos, podem ativar outras células do sistema imune, apresentando antígenos e produzindo mediadores químicos. Os linfócitos T receberam maior atenção a partir do fim da década de 70 e início da década de 80, com o descobrimento dos receptores de células T (Haskins *et al.*, 1983) e, conseqüentemente, o aumento das pesquisas envolvendo a resposta imune celular. Desde então, estudos de caracterização dos diferentes tipos de células T, suas funções fisiológicas e durante diferentes patologias têm expandido muito e revelado a importância destes linfócitos na defesa do organismo.

A população de linfócitos T pode ser subdividida em quatro grupos de acordo com a expressão das moléculas coreceptoras CD4 e CD8: linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplo-positivos - DP) e linfócitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (duplo-negativos - DN). Essas células se distinguem quanto aos tipos de antígenos e moléculas apresentadoras que reconhecem e, conseqüentemente, quanto à participação na resposta imune contra patógenos.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estão envolvidos principalmente na ativação e regulação de outras células sendo, portanto, denominados auxiliares. Esse grupo de linfócitos é dividido em subpopulações funcionalmente distintas devido ao repertório de citocinas por ele produzido (revisado por Coffman, 2006). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenham atividades efetoras importantes para a eliminação de patógenos intracelulares, sendo conhecidos como citotóxicos (revisado por

Shresta *et al.*, 1998). A definição de se um linfócito T será CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> acontece ainda no timo, em um processo denominado seleção positiva, que envolve diferentes etapas de reconhecimento celular (revisto por Germain, 2002). Durante esse processo, se o linfócito ainda em desenvolvimento que expressa tanto CD4 como CD8 na sua superfície, reconhecer antígenos apresentados por células epiteliais tímicas no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, ele deixará de expressar a molécula CD4 e tornar-se-á CD8<sup>+</sup>. Por outro lado, se os linfócitos intra-tímicos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> reconhecerem antígenos apresentados por células epiteliais tímicas no contexto do MHC classe II, eles deixarão de expressar a molécula CD8 e tornar-se-ão CD4<sup>+</sup> (revisto por von Boehmer e Kisielow, 1983; Starr *et al.*, 2003).

Linfócitos T extratímicos que expressam os dois coreceptores (DP) já foram encontrados no sangue periférico e órgãos linfóides periféricos de galinhas, suínos e macacos (revisto por Zuckermann, 1999). Em 1985, Blue e colaboradores mostraram a presença dessas células no sangue periférico de humanos saudáveis, onde elas representam menos que 3% dos linfócitos totais. No entanto, em alguns quadros patológicos a população de células T DP pode apresentar-se expandida, atingindo 5 a 15% dos linfócitos T periféricos. Os linfócitos T DP são capazes de secretar Interleucina 2 (IL-2), Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e ainda auxiliar na diferenciação de linfócitos B (Patel *et al.*, 1989).

Linfócitos T DN já foram encontrados em camundongos, ratos e humanos. Os primeiros trabalhos sobre as células T que não expressam um co-receptor consideravam-nas, apenas, células precursoras dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, ou seja, timócitos imaturos. Em 1986, Lanier e Weiss descreveram uma pequena população de células DN presente no sangue periférico e no timo de humanos saudáveis e sugeriram que essas células formavam uma linhagem distinta de

linfócitos T maduros. Essa hipótese foi posteriormente confirmada através de um estudo funcional das células T DN do sangue periférico de indivíduos saudáveis, onde estas células representam cerca de 0,1% a 2% dos linfócitos totais (Londei *et al.*, 1989). As células T DN também estão presentes na pele desses indivíduos (Groh *et al.*, 1989). Uma questão intrigante é como esses linfócitos tornam-se duplo negativos durante o processo de seleção. Em modelos experimentais, acredita-se que essas células são selecionadas por reconhecerem antígenos apresentados por moléculas não clássicas de MHC (revisito por Kronenberg & Engel, 2007). Em humanos o processo de seleção dessas células ainda não foi completamente elucidado.

Utilizando camundongos transgênicos, em que as células T reconhecem preferencialmente um antígeno específico, foi demonstrado que as células T DN exibem marcadores de ativação, memória e habilidade de secretar rapidamente interferon gama (IFN- $\gamma$ ) quando estimuladas (Caveno *et al.*, 1999). Este estudo também revelou que as células T DN podem diferenciar-se em uma forma anérgica característica, diferente dos linfócitos convencionais. Quando anérgicas, elas exibem um perfil de produção de interleucina 2 (IL-2) comprometido, quando estimuladas pelo antígeno. No entanto, se expostas a seu ligante específico e a IL-2 exógena, essas células se comportam como células ativadas e são capazes de proliferar vigorosamente. Além disso, as células T DN também podem competir pela IL-2 produzida por células T auxiliares, inibindo a proliferação de células T CD8<sup>+</sup>, o que sugere um papel imunorregulatório para os linfócitos T DN (Priatel *et al.*, 2001). Em humanos saudáveis, também foi observado que as células T DN expressam marcadores de ativação, como CD25 e CD69, de memória e são capazes de secretar IFN- $\gamma$  (Antonelli *et al.*, 2006).

Os linfócitos T precisam ser adequadamente ativados para tornarem-se competentes na execução de suas atividades funcionais. Esse processo de ativação compreende

diversas etapas e uma complexidade de interações moleculares extra e intracelulares. Embora o mecanismo de ativação celular ocorra de maneira complexa, alguns elementos participam sabidamente de forma essencial no processo de ativação das células T, entre eles: o receptor de células T, moléculas coestimulatórias e citocinas. Assim, estudos que visem avaliar a expressão dessas moléculas em quadros fisiológicos e patológicos são importantes para compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação dessas células e, conseqüentemente, nas suas funções.

### **1.2.2 - Ativação dos linfócitos T: receptor de células T (TCR), moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, coestimulação e diferenciação funcional**

A potencialidade do sistema imune está em sua capacidade de gerar bilhões de diferentes receptores antigênicos a partir de segmentos gênicos que são reunidos por recombinação somática. O receptor de antígenos das células T (TCR) é um heterodímero formado por duas cadeias polipeptídicas transmembrânicas, denominadas alfa e beta (alfa-beta,  $\alpha\beta$ ) ou gama e delta (gama-delta,  $\gamma\delta$ ). A especificidade antigênica destes TCRs é conferida pela associação das regiões hipervariáveis das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  ou  $\gamma$  e  $\delta$ . Durante a recombinação, ocorre junção de um segmento gênico variável (V) com um segmento juncional (J) para gerar as cadeias  $\alpha$  ou  $\gamma$  e de segmentos V, de diversidade (D) e J para gerar as cadeias  $\beta$  ou  $\delta$ . A complexidade das regiões juncionais V-J e V-D-J é aumentada pela adição ou remoção de nucleotídeos nos sítios de junção, contribuindo também para a diversidade estrutural do receptor. O reconhecimento antigênico pelo TCR é o sinal inicial para a ativação dos linfócitos T, independentemente da subpopulação em questão. Esse reconhecimento depende da apresentação do componente antigênico, que pode acontecer por mecanismos diferentes.

Geralmente, os linfócitos T $\alpha\beta$  reconhecem, ao mesmo tempo, resíduos polimórficos do MHC próprio e resíduos peptídicos apresentados pelo MHC. Apesar de algumas células T $\gamma\delta$  obedecerem a esse paradigma (Guo *et al.*, 1995), a grande maioria não possui um reconhecimento restrito ao MHC. O reconhecimento de antígenos por essas células ocorre, principalmente, no contexto de moléculas CD1 (Spada *et al.*, 2000), que apresentam similaridade ao MHC de classe I. Os membros da família CD1 formam um grupo distinto de moléculas apresentadoras de antígenos e constituem-se de glicoproteínas não polimórficas, associadas a microglobulina- $\beta_2$ , expressas pela maioria das células apresentadoras de antígenos (APCs). Foram descritas cinco isoformas de moléculas CD1 em humanos (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e) que se distribuem em pelo menos dois grupos, de acordo com suas diferenças estruturais, funcionais e expressão celular.

Um novo paradigma foi revelado quando antígenos apresentados pelas proteínas CD1 foram identificados como de natureza lipídica ou glicolipídica, e não protéica (revisto por Dutronc & Porcelli 2002; revisto por Zajonc & Kronenberg 2007). Um trabalho de análise da proliferação celular e produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* mostrou forte correlação entre a resposta contra antígenos lipídicos CD1-restritos e a infecção. A resposta a esses antígenos foi detectada em células CD8<sup>+</sup>, mas mais intensamente na população de células T CD4<sup>+</sup>. Os autores também utilizaram anticorpos monoclonais específicos para CD1a, CD1b e CD1c, confirmando a restrição do reconhecimento destas células por antígenos apresentados por moléculas CD1 (Ulrichs *et al.*, 2003).

Alguns autores descreveram a pequena população de células T $\alpha\beta$  DN como CD1-restritas, que reconhecem antígenos não protéicos e possuem atividades citotóxicas (Porcelli *et*



*al.*, 1989; Beckman *et al.*, 1994). Antonelli e colaboradores (2005) demonstraram recentemente que as células  $\text{T}\gamma\delta$   $\text{CD4}^-$   $\text{CD8}^-$  reconhecem antígenos de *Leishmania* no contexto de moléculas CD1. No entanto, o reconhecimento de antígenos neste contexto por células T expressando o  $\text{TCR}\alpha\beta$  ainda não foi confirmado. Com base no exposto, acredita-se que o sistema imune possua um repertório de reconhecimento de antígenos ainda mais extenso, transcendendo o reconhecimento de peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC-I e II.

Além dos sinais conferidos pela ligação do antígeno ao TCR, as células T necessitam de um segundo sinal para efetuar sua resposta. Esse sinal é fornecido pelas moléculas coestimulatórias, presentes na superfície das APCs, que se ligam a receptores específicos presentes na superfície dos linfócitos T. Várias moléculas coestimulatórias já foram descritas, sendo a interação CD28/B7-1 e B7-2 a via mais bem estudada e talvez mais importante. O CD28 é uma glicoproteína transmembrana, homodimérica, da família das imunoglobulinas, presente na superfície dos linfócitos T (Azuma *et al.*, 1992). Associado aos seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) localizados nas APCs, ele auxilia na estimulação da proliferação linfocitária, produção de citocinas e impede o estado de anergia (Harding *et al.*, 1992; Linsley e Ledbetter, 1993). Estes efeitos são possíveis porque, após a interação com seu ligante, a cauda citoplasmática do CD28 interage com moléculas sinalizadoras que vão levar à síntese de IL-2, importante fator de crescimento autócrino e parácrino e indutor da síntese de citocinas (Frauwirth e Thompson, 2002). O CTLA-4 é outro membro da família das imunoglobulinas, de estrutura semelhante a do CD28, presente na superfície de linfócitos ativados, que também se liga a B7-1 e B7-2. Entretanto, os sinais enviados por CTLA-4 inibem a ativação de linfócitos, seja regulando a expressão de moléculas necessárias à ativação, atuando no ciclo celular ou na síntese de IL-2 (Krummel & Allison, 1995).

Após uma ativação eficiente, compreendendo o primeiro e segundo sinais, os linfócitos humanos sofrem várias modificações que englobam a expressão ou perda de moléculas de superfície. A expressão de CD69 ocorre logo após a ativação celular e, em função disto, esta glicoproteína integral de membrana é considerada um marcador inicial de ativação linfocitária (Ziegler *et al.*, 1993). Sua expressão estimula a proliferação de linfócitos, por exemplo, através da produção da citocina IL-2, e promove a síntese do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Sancho *et al.*, 2000; 2005). O HLA-DR é um dos produtos do gene do MHC de classe II humano (Bolin *et al.*, 2000) que também passa a ser expresso em linfócitos T após ativação, porém temporalmente após o CD69.

A reatividade imune pode ser regulada através das citocinas produzidas pelas células imunocompetentes (Dutra *et al.*, 1997), e o balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias tem papel crucial na evolução das respostas imunes. IFN- $\gamma$  é uma citocina inflamatória produzida por células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T DN e células NK. A produção de IFN- $\gamma$  potencializa a apresentação de antígenos, aumentando a expressão dos MHC-I e II, induz expressão de MHC-II em células que normalmente não o expressam, ativa e recruta macrófagos para o sítio de infecção estimulando-os a produzir outras citocinas, como o TNF- $\alpha$  (Boehm *et al.*, 1997). TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos, neutrófilos, linfócitos ativados, células NK e células endoteliais. Esta citocina é capaz de ativar monócitos, estimular a expressão de outras citocinas pelos macrófagos e, juntamente com IFN- $\gamma$ , estimular a expressão de MHC-II (Van Deuren *et al.*, 1992). Outra citocina inflamatória importante é a IL-17, produzida quase exclusivamente por células T ativadas (Yao *et al.*, 1995). Já foram descritos seis membros da família das citocinas IL-17: IL-17A (ou apenas IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. A IL-17 induz produção de quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e aumenta o acúmulo de

neutrófilos, indicando um envolvimento na resposta imune inata (Kolls e Linden, 2004; Linden *et al.*, 2005). A produção de IL-17 por células T $\alpha\beta$  não convencionais e T $\gamma\delta$  é induzida por IL-23, também inflamatória (Stark *et al.*, 2005). IL-23 integra a família das citocinas IL-12 e é secretada por macrófagos ativados e células dendríticas em resposta a sinais de dano em seu ambiente (Oppmann *et al.*, 2000).

As mesmas populações celulares responsáveis pela produção das citocinas inflamatórias são, em geral, responsáveis pela produção de citocinas modulatórias. Dentre as citocinas modulatórias mais bem caracterizadas está a IL-10. Além da produção por linfócitos T e B, a IL-10 é produzida por macrófagos (Moore *et al.*, 1993; Hedrich & Bream, 2010). Ela reduz a expressão do MHC-II, inibe algumas funções dos macrófagos reduzindo, por exemplo, a produção de TNF- $\alpha$ , além de regular a proliferação dos linfócitos T e a produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  (Fiorentino *et al.*, 1989).

Dependendo do balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias no meio em que está inserida, a célula ativada pode desempenhar um importante papel citotóxico, levando, muitas vezes, à injúria tecidual. Dentre as vias citolíticas descritas, a das granzimas tem recebido grande destaque, sendo a granzima A um de seus principais componentes (Metkar *et al.*, 2008). Ela é predominantemente expressa por linfócitos T citotóxicos e células NK e parece estar envolvida na degradação de matriz extracelular e inativação viral (Trapani, 2001).

A ativação das células T culmina em, essencialmente, dois grandes pontos: aquisição de atividade funcional e secreção de citocinas. Ambos são essenciais para o estabelecimento da resposta imune e estão intimamente relacionados. O estudo desses dois eventos é fundamental para a compreensão da evolução de respostas imunes que podem ser protetoras ou, algumas vezes, patológicas, possibilitando intervenções profiláticas e terapêuticas.

### 1.2.3 - Linfócitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> em diferentes quadros patológicos

Dados do nosso laboratório têm mostrado, além da participação de células clássicas da resposta imune, a participação de linfócitos menos caracterizados na ausência ou presença de patologia causada por infecções parasitárias. Bottrel e colaboradores (2001) mostraram que células T DN são a segunda fonte, seguindo as células T CD4<sup>+</sup>, comprometida com a produção da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  em sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea. O alto comprometimento com a produção desta importante citocina sugere que as células T DN atuem induzindo a imunidade celular e, possivelmente, a imunopatologia da doença, se não forem devidamente reguladas. Em dados mais recentes, foi estabelecido que as células T DN de pacientes com leishmaniose cutânea expressam perfil inflamatório e de hiperatividade quando comparadas às células T DN de indivíduos não infectados (Antonelli *et al.*, 2006). Neste estudo, as freqüências de células T DN dos indivíduos controles variou entre 3.77% a 6.92% e dos pacientes com leishmaniose variou entre 0.59% a 4.95%. Além disso, Antonelli e colaboradores (2006) demonstraram, na leishmaniose humana, que células T DN que expressam receptores  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  possuem atividade inflamatória e regulatória, respectivamente, sugerindo importante e distinto papel para essas células na evolução da doença. Este é um dado importante que aponta para a possibilidade de que isso também possa acontecer em outras doenças.

De modo interessante, embora representem uma minoria das células T de indivíduos saudáveis, as células T DN apresentam-se numa freqüência aumentada em algumas doenças autoimunes e imunodeficiências (Shivakumar *et al.*, 1989; Illum *et al.*, 1991; Sieling *et al.*, 2000; Ohga *et al.*, 2002). Em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), foi constatado que cerca de 20% dos linfócitos infectados pelo vírus HIV são células DN (Marodon

*et al.*, 1999). Neste estudo, os pacientes que respondiam eficientemente à terapia anti-retroviral apresentaram menor carga viral no citoplasma das células T DN. Esta observação sugere que as células T DN infectadas representam uma importante fonte de vírus em indivíduos portadores do HIV. Embora as células T DN desempenhem importante papel em diferentes doenças com as quais a doença de Chagas compartilha algumas similaridades, seu possível envolvimento na doença de Chagas não foi ainda estudado. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram, indiretamente, que células T DN seriam importantes produtoras de IFN- $\gamma$  em pacientes chagásicos cardiopatas. Assim, uma melhor caracterização dessas células em pacientes chagásicos trará informações importantes.

### **1.3 – Reatividade celular na doença de Chagas**

O surgimento e a manutenção da patologia chagásica são alvos de muitos estudos. Embora a presença do parasita seja fundamental para o desencadeamento do processo inflamatório, a baixa parasitemia associada à gravidade das lesões observadas durante a fase crônica tem despertado interesse em determinar a participação da autorreatividade nesta doença. Dados da literatura mostram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes chagásicos, apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca, são ativadas *in vitro* por antígenos derivados do parasita (Dutra *et al.*, 2000). Além disso, anticorpos anti-epimastigota purificados do soro de pacientes chagásicos estimulam as células T anti-idiotípicas específicas *in vitro* (Gazzinelli *et al.*, 1990, Dutra *et al.*, 2000). Abel e colaboradores (1997) mostraram que a sensibilização de clones de células T pela proteína B13 do *T. cruzi* induz essas células a reconhecerem, por reação cruzada, a cadeia pesada da miosina cardíaca humana. Esses dados sugerem que tanto componentes do parasita quanto do hospedeiro sejam importantes no

desenvolvimento da reatividade celular na doença de Chagas. Tem-se sugerido que a associação dos componentes genéticos tanto do hospedeiro quanto do parasita, o sistema imune do hospedeiro e o ambiente em que ele está inserido, contribuam para determinar a forma clínica da doença. Desta forma, muitas teorias têm sido criadas para explicar o papel do sistema imune do hospedeiro no prognóstico da doença de Chagas (revisto por Dutra *et al.*, 2005).

A importância das células T na patologia chagásica está apoiada, tanto nos achados que demonstram a resposta dessas células *in vitro*, quanto nos dados que comprovam a presença dessas células no infiltrado inflamatório presente no miocárdio de pacientes chagásicos cardiopatas. Reis e colaboradores (1993) e Higuchi e colaboradores (1997) mostraram que o infiltrado inflamatório é composto predominantemente por células T CD8<sup>+</sup> e que essas células expressam moléculas relacionadas à ativação e citotoxicidade. Além da possível função efetora conferida por essas moléculas, a expressão de citocinas por elas e outras células presentes no microambiente inflamatório são fundamentais no estabelecimento da patologia. Existem muitos estudos que relatam a importância do balanço entre citocinas inflamatórias e modulatórias no prognóstico da patologia chagásica e no estabelecimento de suas diferentes formas clínicas (Correa-Oliveira *et al.*, 1999; Cunha-Neto *et al.*, 1998; Dutra *et al.*, 2000; Dutra *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003, 2007). Os achados derivados desses estudos sugerem, de maneira geral, que a citocina IFN- $\gamma$  está associada a patogenia da doença, enquanto que a IL-10 está associada ao estabelecimento de resposta protetora. Análises do RNA mensageiro de citocinas mostraram a presença de ambos os tipos (inflamatórias e regulatórias) nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a forma indeterminada e cardiopatas (Dutra *et al.*, 1997), enquanto células TNF $\alpha$ <sup>+</sup> e IFN $\gamma$ <sup>+</sup> são predominantes na lesão cardíaca (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997). Recentemente, um estudo sobre o polimorfismo funcional -

1082 G/A do gene da IL-10 demonstrou que o alelo polimórfico, relacionado com menor expressão de IL-10, está associado com o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica (Costa *et al.*, 2009). Esse achado sugere que a capacidade de expressar IL-10 em quantidades suficientes para modular a resposta inflamatória seja determinada geneticamente. Essa imunoregulação através das citocinas tem sido descrita em outras infecções parasitárias como, por exemplo, na leishmaniose (Bottrel *et al.*, 2001; Gaze *et al.*, 2006; Antonelli *et al.*, 2004).

Outros trabalhos avaliam a importância de diferentes subpopulações de linfócitos T na reatividade celular na doença de Chagas. Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que pacientes chagásicos, com diferentes formas clínicas, apresentam níveis elevados de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> comparados aos indivíduos não infectados (Dutra *et al.*, 1996). Nos pacientes assintomáticos, a maioria dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não expressa a molécula coestimulatória CD28 (Albareda *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi demonstrada correlação positiva entre células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e a produção da citocina TNF- $\alpha$  em pacientes com a forma clínica cardíaca, e entre estas mesmas células e a citocina IL-10 em pacientes com a forma clínica indeterminada (Menezes *et al.*, 2004). Esses achados sugerem um papel imunorregulatório importante dessas células na doença de Chagas humana.

O papel das células T DN expressando os diferentes TCRs, TCR $\alpha\beta$  e TCR $\gamma\delta$ , na doença de Chagas humana ainda não foi avaliado. Contudo, em camundongos, observa-se um aumento de 40 a 100 vezes no número de células T $\gamma\delta$  no fígado de animais com infecção aguda em relação aos controles não infectados, sendo que mais de 80% dessas células são DN (Sardinha *et al.*, 2006). Também foi observada expansão de células T DN no sangue periférico de ratos com infecção aguda induzida pelo *Trypanosoma cruzi*. Os ratos infectados com a cepa CL-Brener do *T. cruzi*, altamente virulenta, produziram altos níveis de IFN $\gamma$ , sendo as células T DN uma

possível fonte dessa citocina inflamatória (Nagib *et al.*, 2007). Outros autores descrevem as células T DN como timócitos imaturos encontrados nos órgãos linfóides periféricos durante a doença de Chagas. Camundongos com infecção aguda induzida pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam níveis elevados de células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos linfonodos, e alguns desses linfócitos possuem um TCR potencialmente autorreativo, representando, provavelmente, células que escaparam do processo normal de seleção tímica (Mendes-da-Cruz *et al.*, 2003). Esses autores acreditam que a presença desses timócitos imaturos na periferia pode contribuir para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica através de uma resposta autoimune.

Baseado no exposto, fica claro que as células T são fundamentais na resposta imune de pacientes chagásicos podendo, potencialmente, participar nos processos de proteção ou patologia. Desta forma, estudos que permitam um conhecimento detalhado de características funcionais de subpopulações de células T, assim como sobre os mecanismos relacionados à sua ativação são necessários e fundamentais para que se possa compreender a doença e, eventualmente, trabalhar em novas terapias benéficas à população infectada.

#### **1.4. Aspectos gerais da sinalização intracelular de citocinas**

A ativação e controle da resposta imune dependem de vários sistemas complexos de sinalização intracelular. A ligação de uma citocina a seu receptor específico inicia uma cascata de eventos que leva ao cumprimento do seu papel biológico. Para isso, a citocina se liga a uma cadeia específica do seu receptor e inicia a formação de um complexo que o torna funcional (Kishimoto *et al.*, 1994). Os receptores de citocinas possuem um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, sendo divididos em duas classes: I e II (revisto por O'Sullivan *et al.*, 2007). A citocina ligada a seu receptor dimerizado (homo ou



heterodímero) leva ao recrutamento de cinases citoplasmáticas, como as proteínas Janus cinase (Jak), que fosforilam resíduos de tirosina presentes na cadeia do receptor, criando sítios de ligação para outras proteínas citoplasmáticas, como os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs). Ao se ligarem na cadeia do receptor, os STATs são fosforilados e formam dímeros que atuam no núcleo da célula regulando a expressão gênica.

Os STATs formam uma família de fatores de transcrição responsáveis por mediar a sinalização de citocinas. Essa família é constituída por sete membros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6 (revisto por Matsukawa 2007). Os STATs são os únicos fatores de transcrição que possuem um domínio SH2 que interage com sítios de tirosina fosforilada. Eles podem formar homo ou heterodímeros e possuem um único domínio de ligação ao DNA.

Outra família de fatores de transcrição relacionada à sinalização de citocinas é a do NF $\kappa$ B, composta por cinco membros: RelA, c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 e seu precursor p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52 e seu precursor p100). Nos últimos anos, as proteínas da família NF $\kappa$ B emergiram como os principais “orquestradores” das imunidades inata e adaptativa e da resposta inflamatória. De maneira semelhante à via dos STATs, quando a citocina se liga a seu receptor, provocando a fosforilação dos resíduos de NF $\kappa$ B por uma cinase citoplasmática, ocorre o recrutamento de outras proteínas cinases, como a IKK. A proteína IKK fosforila proteínas da família I $\kappa$ B, que são inibidoras da via NF $\kappa$ B. Quando fosforilada, I $\kappa$ B se desprende do heterodímero de proteínas da família NF $\kappa$ B, que pode então ser transportado para o núcleo onde se liga ao DNA e regula a expressão gênica (revisto por Vallabhapurapu & Karin 2009).

Embora haja controvérsias na literatura, os fatores de transcrição relacionados à sinalização intracelular de citocinas podem ser agrupados de acordo com o principal receptor que

desencadeia a sua ativação. Nesse contexto, pode-se dizer que NFκB e STAT1 estão relacionados a uma resposta pró-inflamatória, já que são ativados, principalmente, por receptores de citocinas pró-inflamatórias (IL-1/TNFα e IFNγ/α, respectivamente). STAT3 está relacionado a resposta anti-inflamatória, pois é ativado principalmente pelo receptor de IL-10. STAT4 é predominantemente ativado pelo engajamento de IL-12, desencadeando uma resposta imune do tipo Th1. STAT5 (a e b) é ativado por uma variedade maior de citocinas (IL-2, IL-7 e IL-15, por exemplo) desempenhando, entre outros, um papel na regulação do crescimento celular. E, finalmente, STAT6, que é predominantemente ativado por IL-4 e IL-13, desencadeando uma resposta imune do tipo Th2 (Ihle 2001; O'Sullivan *et al.*, 2007). Os estudos sobre os mecanismos de ativação das diferentes vias de sinalização de citocinas são muito importantes para o entendimento do processo inflamatório.

### **1.5 – Aspectos gerais da regulação gênica pós-transcricional através dos MicroRNAs**

Os microRNAs (miRNAs) foram descobertos em 1993 (Ambros *et al.*, 1993) e, desde então, diversos trabalhos atribuem a essas moléculas um importante papel no desenvolvimento de plantas e animais (Lagos-Quintana, 2001; Rodriguez, *et al.*, 2004; Ambros, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Harfe, 2005; Slack *et al.*, 2006; Plasterk, 2006; Loa *et al.*, 2007). Eles integram uma grande família de pequenos RNAs (aproximadamente 22 nucleotídeos) que não codificam proteínas.

Os genes que originam miRNAs estão localizados em regiões não codificantes ou em introns de genes que codificam proteínas. Após ser transcrito pela RNA polimerase II, o miRNA primário é processado no núcleo pelo complexo microprocessador, formado pela endonuclease RNase III (Drosha) e DGCR8, no miRNA precursor. Este pré-miRNA é exportado para o

citoplasma pela exportina-5, onde é processado pela *Dicer*, uma outra RNase III, resultando em um miRNA maduro (revisto por Chuang & Jones, 2007). Os miRNAs regulam a expressão gênica postranscricional, por degradação ou inibição do RNA mensageiro (mRNA), através do pareamento parcial ou total de bases em sítios complementares, predominantemente na região não traduzida 3' (3'UTR) do mRNA (Bartel, 2004, Gartel, 2006, Zhang *et al.*, 2007).

Cada miRNA tem o potencial para regular muitos genes em seres humanos, modulando os níveis de milhares de mRNAs, o que implica que mais de um terço a metade de todos os genes que codificam proteínas humanas são regidos por miRNAs (Gomes & Gomez, 2008). Atualmente, os potenciais mRNAs alvos dos miRNAs já descobertos são previstos através do uso de algoritmos computacionais, mas a validação dessa relação regulatória não tem sido demonstrada para todos os miRNAs. Vários *softwares* de predição já foram desenvolvidos e, dentre os mais usados, podemos destacar o *miRanda*, o *RNAhybrid* e o *TargetScan*.

Utilizando esses três bem conceituados programas de predição, Sharma e colaboradores (2008) encontraram oito miRNAs com potencial de se ligar à região 3'UTR do mRNA da citocina IL-10. Nesse mesmo trabalho, através da transfecção de oligonucleotídeos dos miRNAs candidatos seguida da dosagem de IL-10 no sobrenadante das culturas, foi possível identificar três desses miRNAs com potencial função reguladora de IL-10: hsa-miR20a, hsa-miR106a e hsa-miR106b. O estudo desses miRNAs é de grande interesse clínico devido ao papel crucial da IL-10 como modulador da inflamação. Contudo, a participação dessas moléculas em quadros patológicos, como a doença de Chagas, ainda não foi explorada.

## 1.6 – Hipótese de trabalho

Tendo em vista os impactos sociais e econômicos da doença de Chagas e considerando-se a destacada contribuição das células T nos mecanismos imunológicos envolvidos na evolução das diferentes formas clínicas da doença, acreditamos que uma análise mais detalhada sobre a participação de subpopulações de células T neste processo seja necessária. **Nossa hipótese de trabalho é que subpopulações de células T DN possuem características funcionais distintas, associadas à produção e resposta a citocinas, e que essas diferenças podem estar relacionadas ao desenvolvimento de diferentes formas clínicas da doença de Chagas.** Dessa forma, nesse trabalho avaliamos as características fenotípicas e funcionais das diferentes subpopulações de células T DN, expressando o TCR $\alpha\beta$  e o TCR $\gamma\delta$ . Para tanto, avaliamos o repertório dessas células, seu perfil de ativação e de produção de citocinas. Visando uma compreensão mais global da imunoregulação na doença de Chagas, investigamos também a presença de importantes fatores de transcrição (em suas formas ativadas), comprometidos com a sinalização intracelular de citocinas, nas células do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas, assim como a presença de reguladores pós-transcricionais do gene de uma importante citocina envolvida na imunoregulação da doença de Chagas humana, a IL-10.

Acreditamos que, tanto no desenvolvimento de respostas imunes protetoras quanto patogênicas, diferentes populações celulares estejam envolvidas e contribuam produzindo mediadores distintos em períodos distintos. Num pensamento mais amplo, o melhor entendimento do envolvimento dessas populações celulares, dos mediadores produzidos por elas e em que período suas atuações se fazem necessárias durante a formação de resposta imunológica contra patógenos, nos possibilitará realizar intervenções externas com a finalidade de induzir resistência a infecção ou melhora do prognóstico da doença.

## **2. Objetivo geral**

Estudar mecanismos imunorregulatórios presentes em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no papel das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, na expressão das moléculas apresentadoras de antígenos da família CD1 pelos monócitos e no controle da resposta e expressão de citocinas.

### **2.1 - Objetivos específicos**

Nosso trabalho foi dividido em dois grupos de objetivos específicos. O primeiro concentrou-se no estudo das células T DN e o segundo nos mecanismos de resposta e controle de expressão de citocinas, como descrito a seguir:

1. Estudar características das subpopulações de linfócitos T DN expressando TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas.
  - 1.1 Avaliar a expressão de moléculas de ativação (CD69) e coestimulatórias (CD28 e CTLA-4) por células T DN isoladas a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.
  - 1.2 Avaliar a expressão da Granzima A, molécula associada a função citotóxica, por células T DN isoladas a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.
  - 1.3 Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), IL-17 e da citocina anti-inflamatória IL-10 por células T DN isoladas a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

- 1.4 Avaliar a expressão das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e HLA-DR) por monócitos CD14<sup>+</sup> isolados a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.
  
2. Estudar os mecanismos de resposta e controle da expressão de citocinas por células mononucleares do sangue periférico provenientes de pacientes chagásicos com a forma indeterminada e cardíacos.
  - 2.1 Avaliar a expressão da forma fosforilada dos fatores de transcrição NFκB e STAT3 por linfócitos e monócitos isolados a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.
  - 2.2 Avaliar a expressão dos miRNAs hsa-miR20a, hsa-miR106a e hsa-miR106b, relacionados com a regulação pós-transcricional do gene da citocina anti-inflamatória IL-10, nas células mononucleares do sangue periférico isoladas a fresco ou após infecção *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

### **3. Justificativa**

A doença de Chagas é amplamente difundida na América Latina onde existem cerca de 10-14 milhões de pessoas infectadas e até 120 milhões sob risco de infecção (WHO, 2002). Dessa forma, estudos que visem ampliar o entendimento sobre a patogenia da infecção pelo *T. cruzi* são muito importantes.

O contato do parasita com as células do hospedeiro promove uma resposta inicial através da ativação de células do sistema imune. No entanto, a manutenção da reatividade celular é, possivelmente, uma tarefa realizada não só por componentes antigênicos do parasita, mas também do hospedeiro. A participação de linfócitos T na imunopatologia chagásica tem sido comprovada em diversos modelos de estudos (Dutra *et al.*, 1994; Minoprio *et al.*, 1986; Reis *et al.*, 1993; Ribeiro dos Santos, *et al.*, 1992; Tarleton *et al.*, 1992). Apesar dos importantes achados, questões sobre as populações celulares responsáveis pelo desenvolvimento das lesões, os antígenos responsáveis pela ativação destas células e sua manutenção ainda não estão bem estabelecidas.

Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo das células T DN. Já foi visto que, em humanos, estas células expressam moléculas associadas à ativação, memória e citotoxicidade, e que seu repertório de TCR é diferente daquele apresentado pelas células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, sugerindo que elas reconheçam ligantes específicos. Na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, foi observado um aumento expressivo de células T $\gamma\delta$ , sendo que mais de 80% destas células são DN (Sardinha *et al.*, 2006). Também foi observada uma expansão de células T DN no sangue periférico de ratos com infecção chagásica aguda (Nagib *et al.*, 2007). Na leishmaniose cutânea humana, foi demonstrado que células T DN expressando TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  encontram-se ativadas e expressam citocinas distintas, sugerindo um papel imunorregulatório para essas

células. Entretanto, o papel das células T DN na doença de Chagas humana ainda não foi explorado. Neste trabalho, foi realizada uma caracterização funcional das células T DN em pacientes chagásicos de diferentes formas clínicas, no sentido de compreender o possível envolvimento dessas células na imunoregulação na doença de Chagas humana.

Várias teorias foram elaboradas com o intuito de explicar a evolução clínica diferencial na doença de Chagas (revisito por Dutra & Gollob 2008). Nesse contexto, acredita-se que o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias seja muito importante. Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que, na leishmaniose mucosa humana, apesar de intensa produção da citocina IL-10, a resposta a essa citocina não é proporcional a sua produção, uma vez que esses pacientes possuem inflamação muito exacerbada. Assim, faz-se importante estudar não só a produção das citocinas, como também outros mecanismos relacionados à resposta a esses mediadores. Neste trabalho, avaliou-se, além da expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias por subpopulações celulares específicas, a fosforilação de fatores de transcrição em resposta ao engajamento dos receptores dessas citocinas. Avaliaram-se, ainda, mecanismos de controle pós-transcricional da citocina anti-inflamatória IL-10, citocina relacionada a mecanismos protetores na doença de Chagas humana. Acreditamos que esclarecimentos sobre os processos de regulação e resposta as citocinas possam ajudar na compreensão da imunopatologia da doença.



## 4. Pacientes, Materiais e Métodos

### 4.1 – Desenho Experimental

A Figura 1 apresenta o desenho experimental elaborado para a execução deste trabalho, onde pode-se visualizar os dois grupos de objetivos: direcionado ao estudo das células T DN ou à avaliação dos mecanismos de resposta e controle de citocinas.

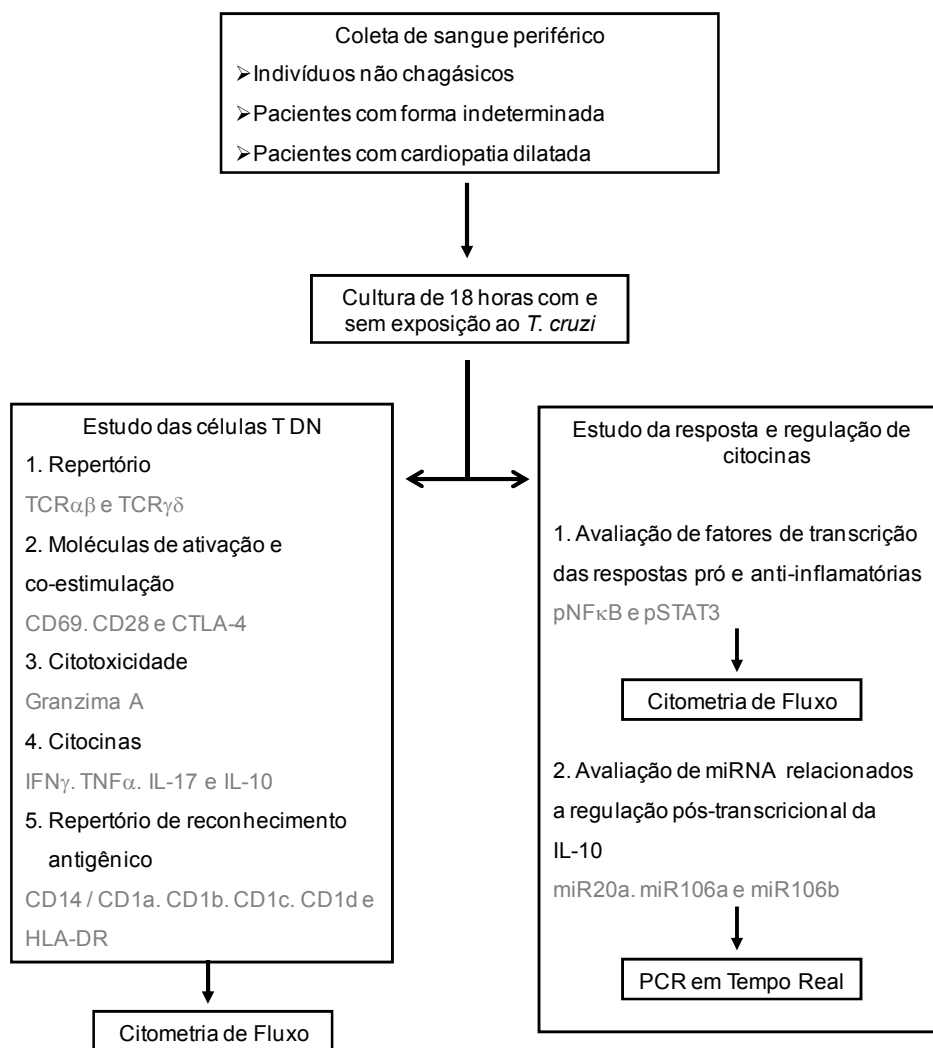


Figura 1: Esquema do desenho experimental empregado na execução deste trabalho de pesquisa, evidenciando os grupos de indivíduos, as condições de análises e as avaliações realizadas. Em cinza estão evidenciadas as moléculas analisadas em cada etapa.

## 4.2 - Pacientes

Os pacientes que participaram dessa pesquisa foram selecionados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes-Diniz (CTR-DIP), em Belo Horizonte - MG. O trabalho atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade da pesquisa envolvendo seres humanos. Aos pacientes que concordaram em participar da pesquisa foi entregue o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) como parte integrante do projeto maior intitulado “Avaliação eletrofisiológica não-invasiva na doença de Chagas: diagnóstico do dano miocárdico e fatores prognósticos”, coordenado pelo Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, professor titular do departamento de Clínica Médica da UFMG. Também foram de responsabilidade do Dr. Manoel Otávio o diagnóstico, cuidado clínico e tratamento desses pacientes.

Os indivíduos foram classificados em três grupos: (N) - indivíduos controles não infectados, (I) - pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas e (DC) – pacientes com cardiopatia chagásica crônica apresentando dilatação do coração. A classificação dos pacientes foi baseada em exames clínicos, radiológicos e laboratoriais de acordo com os critérios propostos por Rocha e colaboradores (2003):

### Grupo N – Controles

Constituído por indivíduos saudáveis com sorologia negativa para *T. cruzi*.

### Grupo I – Forma indeterminada

Constituído por pacientes com sorologia positiva para *T. cruzi*, mas sem quaisquer sintomas ou alterações aos exames eletro e ecocardiográficos, ou com pequenas alterações nos exames mais sensíveis como ecocardiograma, holter e teste ergométrico (alterações subclínicas).

#### Grupo DC – Cardiopatia dilatada

Constituído por pacientes com sorologia positiva para *T. cruzi* e variadas alterações cardíacas que afetam o sistema de condução, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca. Esses pacientes apresentam, principalmente, cardiomegalia, identificada por raio X de tórax.

#### 4.3 - Linhagens celulares para cultura de *T. cruzi*

Células VERO, uma linhagem de fibroblastos do rim de macaco, foram cultivadas em garrafas de 250cm<sup>2</sup> com meio de cultura RPMI (Sigma), suplementado com 1% de antibiótico/antimicótico e 5% de Soro Fetal Bovino (SBF) inativado. As garrafas de cultura foram mantidas em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, e as células repicadas semanalmente.

#### 4.4 - Obtenção dos parasitos

Foram utilizadas as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, obtidas do sobrenadante das culturas de células VERO. Cerca de 2x10<sup>6</sup> células foram semeadas nas garrafas de cultura contendo o meio descrito acima. Após a adesão e formação da monocamada, as células foram infectadas com 1x10<sup>7</sup> tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, obtidos de sangue desfibrinado de camundongos infectados experimentalmente. Após 24 horas de incubação, em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 33°C, as garrafas foram lavadas para retirar os tripomastigotas que não penetraram nas células. Após acrescentar o meio de cultura, as garrafas com células infectadas foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 33°C. O meio foi trocado diariamente.

A partir do quinto dia de cultura, os tripomastigotas foram liberados, e o sobrenadante contendo os parasitos foi recolhido e centrifugado a 1000g, por 10 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido com meio RPMI (*Sigma*) para um volume final de 1 mL. Os parasitos foram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer e reservados no gelo para posterior utilização nos experimentos.

#### **4.5 – Exposição de células do sangue total ao *T. cruzi***

Foram coletados, através de punção de veia periférica, aproximadamente 30mL de sangue de cada indivíduo, em tubos a vácuo contendo heparina. O sangue de cada doador voluntário foi dividido entre três tubos Falcon de 50mL, sendo que um dos tubos foi reservado para posterior obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Considerando que cada 1mL de sangue total contem, aproximadamente,  $1 \times 10^6$  CMSP, foram acrescentados 10 parasitos para cada célula em um dos tubos contendo sangue total; ao outro foi acrescentado apenas meio de cultura. Os dois tubos Falcon foram então incubados em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 3 horas. Após o período de exposição, os tubos foram acrescidos de 10 mL de PBS 1X estéril e centrifugados a 200g, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido e ao pellet de células foi acrescentado um volume igual ao de sangue total inicial de meio RPMI enriquecido com 5% de soro humano inativado, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL) e 1% de L-glutamina (200nM).

Os tubos contendo o sangue total foram incubados a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 18 horas, sendo que, nas últimas quatro horas, as células foram expostas à 1mg/ml de Brefeldina A para evitar a secreção de citocinas. Após esse período, foi realizada a lise das hemáceas com uma solução de ACK (16,8g de NH<sub>4</sub>Cl 0.15M; 2g de KHCO<sub>3</sub> 1mM; 0.744g de Na<sub>2</sub>EDTA 0.1mM;

Q.S.P. 200mL com água de injeção; pH=7.4). As células foram lavadas três vezes com PBS 1X por centrifugação a 200g , por 10 minutos, a 4°C, ressuspendidas para 1mL com PBS 1X e reservadas no gelo para posterior plaqueamento e marcação das moléculas de interesse.

Para a marcação dos fatores de transcrição as células foram incubadas com soluções que preservam estas proteínas em seus estados fosforilados. O sangue total de cada doador voluntário foi dividido entre dois tubos Falcon de 50mL. Em um dos tubos foram acrescentados 10 parasitos para cada célula e ao outro foi acrescentado apenas meio de cultura. Os dois tubos Falcon foram incubados em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 3 horas. Após o período de exposição, os tubos foram centrifugados a 200g, por 10 min a 4°C. O plasma foi cuidadosamente recolhido e ao pellet de células foi acrescentado um volume igual ao de plasma retirado de PBS/EDTA (PBS 1X e 1mM de EDTA). Em seguida foi adicionado 1µL/mL de uma solução que indica morte celular (Live/Dead – INVITROGEN). Os tubos foram homogenizados delicadamente e incubados por 20 minutos a T.A. As células foram lavadas com PBS/EDTA (o volume de PBS/EDTA foi 4 vezes o volume de células) por centrifugação a 200g, por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas em PBS/EDTA para um volume igual ao de sangue total inicial. Em seguida foi adicionado um volume 20 vezes maior ao contido no tubo de uma solução de fixação (Lyse/Fix – BD BIOSCIENCE PHOSFLOW) e os tubos foram incubados no gelo por 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugadas a 200g, por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspendidas com uma solução de PBS 1X, 1% SFB e 0,09% azida, num volume 10 vezes maior ao de sangue total inicial. Os tubos foram centrifugados a 200g, por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi retirado e as células foram homogenizadas em um vórtex. Foi acrescentado, lentamente e sob agitação, 1mL para cada mL de sangue total, de uma solução de permeabilização (Permeabilization Buffer III – BD

BIOSCIENCE PHOSFLOW). As soluções de células foram então incubadas no gelo por 30 minutos, transferidas para tubos de congelamento e armazenadas a -80°C para posterior plaqueamento e marcação das moléculas de interesse.

#### **4.6 – Anticorpos monoclonais**

Os anticorpos monoclonais direcionados contra proteínas humanas e conjugados a diferentes fluorocromos que foram utilizados para as reações de imunofluorescência estão descritos nos Quadros 1, 2 e 3 da seguinte maneira:

- Anticorpos direcionados às células T DN – Quadro 1;
- Anticorpos direcionados às moléculas apresentadoras de antígenos – Quadro 2;
- Anticorpos direcionados aos fatores de transcrição – Quadro 3.

<b>ESPECIFICIDADE</b>	<b>FLUOROCROMO</b>	<b>MARCA</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>CLONE</b>
CD4	Cy-chrome	eBioscience	1:20	OKT4
CD8	Cy-chrome	eBioscience	1:20	RPA-T8
TCR $\alpha\beta$	FITC	eBioscience	1:20	IP26
TCR $\gamma\delta$	FITC	eBioscience	1:20	B1.1
CD69	PE	eBioscience	1:20	FN50
CD28	PE	BDPharmingen	1:20	CD28.2
CTLA-4	PE	BDPharmingen	2:20	14D3
IFN- $\gamma$	PE	eBioscience	2:20	4SB3
TNF- $\alpha$	PE	eBioscience	2:20	Mab11
IL-17	PE	eBioscience	2:20	64DEC17
IL-10	PE	eBioscience	2:20	JES3-9D7
Granzima A	PE	BDPharmingen	2:20	CB9

Quadro 1 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas às células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>.

<b>ESPECIFICIDADE</b>	<b>FLUOROCROMO</b>	<b>MARCA</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>CLONE</b>
CD14	Cy-chrome	eBioscience	1:20	61D3
CD1a	FITC	eBioscience	1:20	HI149
CD1b	FITC	BDPharmingen	2:20	M-T101
CD1c	PE	Serotec	2:20	L161
CD1d	PE	BDPharmingen	1:20	CD1d42
HLA-DR	PE	eBioscience	2:20	LN3

Quadro 2 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas às moléculas apresentadoras de antígenos.

ESPECIFICIDADE	FLUOROCROMO	MARCA	DILUIÇÃO	CLONE
CD4	Cy7 APC-A	BDPharmingen	1:20	SK3
pNFκB	FITC	BDPharmingen	1:40	K10-895.12.50
pSTAT3	FITC	BDPharmingen	1:40	4/p-STAT3

Quadro 3 – Anticorpos contra proteínas humanas utilizados nas reações de imunofluorescência direcionadas aos fatores de transcrição.

#### 4.7 - Imunofluorescência para análise de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas

Os protocolos para determinação da frequência de populações celulares específicas, assim como para a avaliação da expressão de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas, foram semelhantes aos utilizados por Dutra e colaboradores (2002).

Após cultura de 18 horas, as células não estimuladas e estimuladas pelo *T. cruzi* foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo em U. Cerca de 250.000 CMSP por poço foram incubadas com uma solução contendo anticorpos monoclonais fluorescentes por 15 minutos a 4°C. Essa solução era composta pela combinação de anticorpos diferencialmente marcados, os quais reconhecem moléculas expressas na superfície celular, permitindo a identificação de populações, bem como de moléculas indicadoras de ativação celular e coestimulação. Esses anticorpos foram diluídos em PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,01% de azida sódica e 0,2% de albumina sérica bovina (BSA). Após a incubação com os anticorpos, as células foram lavadas com PBS 1X gelado por centrifugação (200g, por 10 minutos, a 4°C). Em seguida, foram fixadas



em formaldeído 2%. Nesse passo, as células que não teriam marcação intracitoplasmática foram transferidas para os tubos de FACS e adquiridas no citômetro de fluxo.

Para marcação das moléculas intracitoplasmáticas, as placas foram centrifugadas a 200g, por 10 minutos, a 4°C. Seus sobrenadantes foram desprezados e as placas foram submetidas à homogeneização num vórtex. Em seguida, as células foram permeabilizadas com uma solução de saponina 0,5% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas a 4°C durante 30 minutos com as soluções contendo anticorpos anti-moléculas intracitoplasmáticas. As células então foram lavadas com saponina, ressuspensas em PBS 1X, transferidas para os tubos de FACS e adquiridas no citômetro de fluxo.

Todos os dados obtidos através das aquisições no citômetro de fluxo foram analisados através do programa para análise de citometria de fluxo *FlowJo*.

#### **4.8 - Obtenção e infecção de células mononucleares do sangue periférico**

Para o estudo da expressão dos miRNAs possivelmente relacionados com a regulação pós-transcricional do gene da IL-10 (miR20a, miR106a e miR106b) foi realizada a separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP).

Ao tubo Falcon de 50mL contendo o sangue total de cada indivíduo foi acrescentado um volume igual de PBS 1X (*Sigma*), pH 7,4, e esta mistura foi vertida cuidadosamente sobre um volume de *Ficoll-Paque* (*Pharmacia*) igual ao de sangue total. Após 40 minutos de centrifugação a 200g e 22°C, as CMSP, separadas pelo gradiente formado, foram recolhidas e lavadas três vezes com PBS 1X por centrifugação (200g, por 10 minutos, a 4°C). As células foram contadas em câmara hemocitométrica e ressuspensas na concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL com PBS 1X. Essa solução contendo as CMSP foi então dividida em dois tubos Falcon de 15mL e em um

desses tubos foram acrescentados 10 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y para cada célula. Os dois tubos Falcon foram então incubados em estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 3 horas. Após o período de infecção, os tubos foram acrescidos de 10 mL de PBS 1X estéril e centrifugados a 200g, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de células foi acrescentado um volume igual ao de sangue total inicial de meio RPMI enriquecido com 5% de soro humano inativado, 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500 U/mL e estreptomicina 0,5 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200 nM). Os tubos foram incubados a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação as células foram lavadas com 10 mL de PBS 1X por centrifugação (200g, por 10 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para um tubo eppendorf de 1,5mL. Esses eppendorfs foram centrifugados a 4000g por 3 minutos, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o pellet seco de células foi armazenado a -80°C para posterior extração de RNA.

#### **4.9 – Extração do RNA**

Ao pellet seco de CMSP foi acrescentado 1mL de Trizol e a extração realizada segundo protocolo recomendado pelo fabricante do reagente (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA). Após centrifugação a 12000g, por 10 minutos, a 4°C o sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA). Essa mistura foi agitada em vortex por 15 segundos, incubada por 3 minutos à temperatura ambiente (T.A.) e, em seguida, centrifugada a 12000g, por 15 minutos, a 4°C. A fase contendo o RNA foi recolhida cuidadosamente e transferida para outro tubo. Para precipitação do RNA foram adicionados 500µl de álcool isopropílico (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA). Os eppendorfs foram homogeneizados vigorosamente, incubados por 10 minutos a TA e

centrifugados a 12000g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo o RNA foi lavado com a adição de 1mL de álcool etílico 75% (Merk, Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) por centrifugação a 12000g, por 5 minutos, a 4°C. Depois da retirada do sobrenadante os tubos foram deixados abertos de 5 a 10 minutos a T.A. para secar o RNA. Após seco o RNA foi ressuspensionado em 20µl de água DEPC, quantificado através da espectrofotometria e armazenado a -80°C.

#### **4.10 – Síntese de cDNA – Transcrição Reversa**

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído das CMSP, via transcrição reversa utilizando um Kit específico para microRNA (TaqMan MicroRNA RT, Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Foram utilizados iniciadores para hsa-miR20a, hsa-miR106a e hsa-miR106b, permitindo a conversão dos fragmentos específicos de interesse. Esse método se baseia na utilização de um iniciador com estrutura do tipo *stem-loop* (Chen *et al.*, 2005), que solucionou o problema de detecção do miRNA maduro devido ao seu pequeno tamanho. O *stem-loop* do iniciador possui alta especificidade para o miRNA maduro, permitindo a formação de uma junção primer-miRNA que estende a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um produto de amplificação maior, permitindo o uso de um TaqMan Assay<sup>TM</sup> para quantificar a expressão do miRNA por PCR quantitativo em Tempo Real. Além disso, o fato de o TaqMan Assay<sup>TM</sup> possuir dois iniciadores e uma sonda para PCR faz com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles. As condições da reação de síntese de cDNA foram de 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C - hold ∞, para um volume final de 15 µL.

#### 4.11 – PCR em Tempo Real

A PCR quantitativo em tempo real é empregada para inferir a quantidade inicial de um determinado produto através do comportamento da cinética de amplificação. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação, sendo coletadas informações a cada ciclo. Para essa análise é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras utiliza-se o valor de Ct (*Threshold cycle*) onde cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*.

Foi utilizado o sistema TaqMan<sup>TM</sup>, no qual a fluorescência depende do anelamento de uma sonda específica entre os dois iniciadores, para a detecção do aumento do produto da PCR ao longo de cada ciclo. E através do método Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) foi obtida a quantificação relativa de cada miRNA, que consiste na comparação entre os Cts de cada amostra, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

O Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) é um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostras, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de referência (Applied Biosystems User Bulletin N°2 – P/N 4303859 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Análises utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  tem sido amplamente utilizadas em estudos de expressão gênica (Schmittgen, 2008).

Para a escolha do miRNA controle (endógeno) foram testados três miRNAs (U47, RNU44 e RNU48) que apresentam expressão regular em diferentes tecidos, conforme sugestão do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi realizado um teste em amostras de diferentes tecidos, incluindo CMSP, para verificar a cinética de amplificação desses miRNAs.

Foi utilizado o *Step-One Real-time PCR 48-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para a detecção da expressão de hsa-miR20a, hsa-miR106a, hsa-miR106b e do miRNA endógeno hsa-RNU48 (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems).

A reação foi realizada utilizando *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições foram estabelecidas seguindo as recomendações do fabricante: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, com um volume final de 20 µL e todas as amostras em duplicata.

O nível de expressão foi determinado baseando-se no Ct do endógeno, que posteriormente foi utilizado para normalizar o Ct de cada amostra estudada. Com o valor normalizado foi realizada então a comparação com o calibrador escolhido, que é uma amostra de referência. O calibrador foi composto por uma mistura de 4 amostras de CMSP, coletadas a fresco, provenientes de doadores voluntários saudáveis. O valor de Ct foi aplicado à fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtendo-se a quantificação relativa (Livak & Schmittgen, 2008).

#### **4.12 - Análises estatísticas**

Avaliando os dados da citometria de fluxo (porcentagem de expressão e média de intensidade de fluorescência), para determinar se existe diferença entre os grupos foram realizadas análises estatísticas da distribuição dos dados. Visto que, todos os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer*. Para determinar se existe diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Para avaliar se as taxas regulatórias são diferentes entre os grupos foi utilizado o *Teste T não pareado*. Para as análises de correlação foi utilizado o *coeficiente de correlação de Pearson*. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Avaliando os dados da quantificação relativa, que não apresenta distribuição normal, para determinar se existe diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste Wilcoxon*. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). O programa de estatística utilizado para estas análises foi o JMP da SAS softwares.

## 5. Resultados

### 5.1 – Estudo das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas

As análises das características das populações de células T  $\alpha\beta$  DN e células T  $\gamma\delta$  DN foram realizadas através do programa para análise de citometria de fluxo FlowJo. A Figura 2 apresenta gráficos pontuais, ilustrativos da estratégia utilizada para separação das subpopulações DN, obtidos através deste programa.

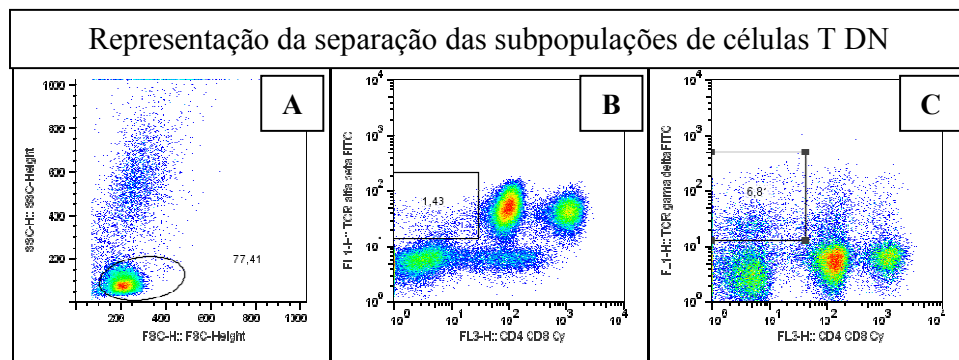


Figura 2: Gráficos representativos das análises para estudo das células T DN. Perfis representativos da separação da população de linfócitos (A), da frequência de células T DN expressando o TCR $\alpha\beta$  (B) e de células T DN expressando o TCR $\gamma\delta$  (C).

#### 5.1.1 – Análise da frequência e do perfil de expressão de citocinas nas células T DN

Os resultados desse tópico serão apresentados em uma tabela na qual foram comparadas as células T DN, expressando o TCR  $\alpha\beta$  ou o TCR  $\gamma\delta$ , sem estímulo (MED) e após infecção (TRP) por formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y. Neste tópico, devido a um número maior de indivíduos analisados, dividiram-se os grupos da seguinte forma: indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC).

Na tabela 1 estão representados os resultados referentes à frequência das subpopulações de células T DN e seus perfis de expressão das citocinas inflamatórias IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-17 e da citocina modulatória IL-10. Nota-se uma expansão da subpopulação T $\alpha\beta$  DN após infecção por *T. cruzi* nos indivíduos não chagásicos (1 p=0.002) e pacientes com cardiopatia dilatada (2 p=0.04), sendo que a porcentagem dessas células após o estímulo foi maior nos indivíduos não chagásicos comparados aos dois grupos de pacientes (3,4 p<0.05). Na subpopulação T $\gamma\delta$  DN houve expansão após infecção nos indivíduos não chagásicos (1 p=0.01) e pacientes com a forma indeterminada (2 p=0.03), sendo que a porcentagem dessas células após o estímulo foi menor nos pacientes cardíacos comparados aos outros dois grupos (3,4 p<0.05).

A porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN expressando IFN $\gamma$  aumentou, após infecção, nos pacientes com a forma indeterminada (1 p=0.004) e com cardiopatia dilatada (2 p=0.02), tendo sido maior nos pacientes cardíacos comparados aos indivíduos controles após estímulo (3 p<0.05). A porcentagem de expressão de IFN $\gamma$  pelas células T $\gamma\delta$  DN estimuladas, comparadas às células não estimuladas, foi maior nos dois grupos de pacientes (1 p=0.0009 e 2 p=0.004). A porcentagem de células IFN $\gamma$ +  $\gamma\delta$  DN após infecção foi menor nos indivíduos controles comparados aos pacientes (3,4 p<0.05).

A porcentagem de expressão de TNF $\alpha$  pela subpopulação T $\alpha\beta$  DN aumentou nos pacientes com a forma indeterminada (1 p=0.006) e com cardiopatia dilatada (2 p=0.003) após o estímulo. A expressão dessa citocina nas células T $\alpha\beta$  DN estimuladas foi maior nos pacientes com ambas as formas clínicas comparados aos indivíduos não chagásicos (3,4 p<0.05). Na subpopulação  $\gamma\delta$ +, a expressão de TNF $\alpha$  também foi maior nos dois grupos de pacientes após infecção (1 p=0.02 e 2 p=0.006). A expressão dessa citocina nas células T $\gamma\delta$  DN estimuladas foi



maior nos pacientes com a forma indeterminada comparados aos indivíduos não chagásicos (3  $p<0.05$ ).

O estímulo com *T. cruzi* levou ao aumento da expressão de IL-17 pelas células  $T\alpha\beta$  DN, tanto nos pacientes com a forma indeterminada (1  $p=0.01$ ) quanto naqueles com cardiopatia dilatada (2  $p=0.009$ ). A porcentagem de células IL-17+  $\alpha\beta$  DN após infecção foi maior nos pacientes cardíacos comparados aos indivíduos controles (3  $p<0.05$ ). A porcentagem de expressão de IL-17 pelas células  $T\gamma\delta$  DN estimuladas, comparadas às células não estimuladas, foi maior nos dois grupos de pacientes (1  $p=0.0001$  e 2  $p=0.002$ ). A expressão dessa citocina nas células  $T\gamma\delta$  DN estimuladas foi maior nos pacientes com ambas as formas clínicas comparados aos indivíduos não chagásicos (3,4  $p<0.05$ ).

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, foi observado um aumento na sua porcentagem de expressão na subpopulação  $\alpha\beta+$ , após o estímulo, apenas no grupo de pacientes com a forma indeterminada (1  $p=0.004$ ). A porcentagem de células IL-10+  $\alpha\beta$  DN após infecção foi maior nesses pacientes comparados aos indivíduos controles (2  $p<0.05$ ). Nas células  $T\gamma\delta$  DN estimuladas, comparadas as não estimuladas, houve um destacado aumento da expressão de IL-10 nos pacientes com a forma indeterminada (1  $p=0.0006$ ), e também houve um aumento nos pacientes com cardiopatia dilatada (2  $p=0.04$ ). Comparados aos pacientes com a forma clínica indeterminada, os indivíduos não chagásicos e os pacientes cardíacos apresentaram menor porcentagem de células  $T\gamma\delta$  DN expressando IL-10 após infecção por *T. cruzi* (3,4  $p<0.05$ ).

			% T DN	% IFN $\gamma$	% TNF $\alpha$	% IL-17	% IL-10
<b><math>\alpha\beta</math> T DN</b>	N	MED	1.55 $\pm$ 0.43 <sup>1</sup>	6.64 $\pm$ 2.86	4.58 $\pm$ 1.54	3.52 $\pm$ 1.21	6.21 $\pm$ 2.82
		TRP	5.9 $\pm$ 2.01 <sup>1,3,4</sup>	8.97 $\pm$ 8.32 <sup>3</sup>	5.85 $\pm$ 3.34 <sup>3,4</sup>	3.9 $\pm$ 2.61 <sup>3</sup>	7.22 $\pm$ 2.93 <sup>2</sup>
	I	MED	1.72 $\pm$ 1.02	3.36 $\pm$ 2.05 <sup>1</sup>	4.67 $\pm$ 1.73 <sup>1</sup>	3.19 $\pm$ 1.37 <sup>1</sup>	5.55 $\pm$ 3.04 <sup>1</sup>
		TRP	3.12 $\pm$ 1.9 <sup>3</sup>	16.9 $\pm$ 9.23 <sup>1</sup>	10.89 $\pm$ 4.19 <sup>1,3</sup>	8.49 $\pm$ 4.55 <sup>1</sup>	13.03 $\pm$ 3.64 <sup>1,2</sup>
	DC	MED	1.26 $\pm$ 0.17 <sup>2</sup>	7.63 $\pm$ 2.37 <sup>2</sup>	5.82 $\pm$ 3.22 <sup>2</sup>	3.45 $\pm$ 1.52 <sup>2</sup>	5.1 $\pm$ 2.82
		TRP	1.73 $\pm$ 0.36 <sup>2,4</sup>	24.83 $\pm$ 9.76 <sup>2,3</sup>	13.96 $\pm$ 2.33 <sup>2,4</sup>	13.57 $\pm$ 6.02 <sup>2,3</sup>	9.92 $\pm$ 6.62
<b><math>\gamma\delta</math> T DN</b>	N	MED	5.4 $\pm$ 1.46 <sup>1</sup>	4.27 $\pm$ 2.39 <sup>1</sup>	3.34 $\pm$ 1.92	3.21 $\pm$ 1.47	6.0 $\pm$ 2.52
		TRP	8.74 $\pm$ 1.85 <sup>1,3</sup>	8.88 $\pm$ 9.95 <sup>3,4</sup>	4.18 $\pm$ 1.48 <sup>3</sup>	3.32 $\pm$ 2.16 <sup>3,4</sup>	4.44 $\pm$ 1.96 <sup>3</sup>
	I	MED	4.1 $\pm$ 1.69 <sup>2</sup>	3.82 $\pm$ 1.32 <sup>1</sup>	3.76 $\pm$ 1.69 <sup>1</sup>	2.61 $\pm$ 0.74 <sup>1</sup>	4.39 $\pm$ 2.07 <sup>1</sup>
		TRP	7.11 $\pm$ 2.47 <sup>2,4</sup>	19.49 $\pm$ 6.35 <sup>1,3</sup>	16.24 $\pm$ 11.91 <sup>1,3</sup>	10.12 $\pm$ 2.52 <sup>1,3</sup>	16.66 $\pm$ 6.15 <sup>1,3,4</sup>
	DC	MED	4.2 $\pm$ 1.99	7.13 $\pm$ 4.28 <sup>2</sup>	2.87 $\pm$ 2.09 <sup>2</sup>	1.69 $\pm$ 1.02 <sup>2</sup>	2.94 $\pm$ 2.37 <sup>2</sup>
		TRP	3.44 $\pm$ 1.2 <sup>3,4</sup>	21.44 $\pm$ 6.11 <sup>2,4</sup>	13.78 $\pm$ 5.48 <sup>2</sup>	8.31 $\pm$ 4.84 <sup>2,4</sup>	7.15 $\pm$ 3.82 <sup>2,4</sup>

Tabela 1: Frequência de células T $\alpha\beta$  DN e células T $\gamma\delta$  DN e porcentagem de expressão de citocinas por estas subpopulações provenientes de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7), I (n=7) e DC (n=5). Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada parâmetro avaliado, para cada subpopulação, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

Devido aos resultados obtidos sobre a expressão de IL-10 pelas células T DN, foi realizada uma avaliação do potencial regulatório de cada subpopulação para os dois grupos de pacientes. Para isso, foram calculadas taxas regulatórias pela divisão da frequência de células T

$\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  DN expressando IL-10 pela frequência das mesmas células expressando  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  ou IL-17 após infecção por *T. cruzi*. As células  $\text{T}\gamma\delta$  DN provenientes de pacientes com a forma clínica indeterminada apresentaram maiores taxas de IL-10/ $\text{IFN}\gamma$ , IL-10/ $\text{TNF}\alpha$  e IL-10/IL-17 quando comparadas com as células  $\text{T}\gamma\delta$  DN provenientes de pacientes com cardiopatia dilatada (\* $p < 0.01$ ) (Tabela 2).

	IL-10/ $\text{IFN}\gamma$	IL-10/ $\text{TNF}\alpha$	IL-10/IL-17
I	1.01 ± 0.26	1.26 ± 0.21	1.66 ± 0.21
DC	0.32 ± 0.07*	0.55 ± 0.14*	0.89 ± 0.09*

Tabela 2: Taxas regulatórias (IL-10/  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  ou IL-17) das células  $\text{T}\gamma\delta$  DN provenientes de pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) após infecção por *T. cruzi*. Os grupos foram assim constituídos: I (n=7) e DC (n=5). Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste T não pareado*. Em todas as taxas avaliadas, a comparação entre os grupos foi estatisticamente diferente, com valor de  $p < 0.01$ .

Foram coletados alguns dados clínicos dos pacientes com as formas clínicas polares da doença de Chagas, que representam o estado da função cardíaca desses pacientes. A maior fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF) e o menor diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (LVDD) estão associados a uma melhor função cardíaca (Rocha *et al.*, 2007). Devido ao maior potencial regulatório apresentado pelas células  $\text{T}\gamma\delta$  DN foram realizadas análises de correlação para verificar se essas células estariam relacionadas a parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca.

No Quadro 4 estão apresentados os valores, para cada paciente avaliado, da frequência de células IL-10+  $\alpha\beta$  DN após infecção, da frequência de células IL-10+  $\gamma\delta$  DN após infecção, da LVEF e do LVDD. Foi observada uma correlação positiva significativa entre maiores LVEF e maiores frequências de células IL-10+  $\gamma\delta$  DN ( $r^2=0.5$  e  $p=0.03$ ). Por outro lado, foi observada uma correlação negativa significativa entre menores LVDD e maiores frequências de células IL-10+  $\gamma\delta$  DN ( $r^2=0.65$  e  $p=0.008$ ). Para a subpopulação T $\alpha\beta$  DN não foram observadas correlações com os parâmetros clínicos avaliados.

Pacientes	% IL-10 + $\alpha\beta$ + T DN	% IL-10 + $\gamma\delta$ + T DN	LVEF (%)	LVDD (mm)
I2	7.50	7.85	70.0	52.0
I3	10.66	12.53	68.0	50.0
I4	11.43	19.57	67.0	46.0
I6	15.18	21.14	69.0	46.0
I7	12.65	18.38	66.0	49.0
DC1	7.98	5.65	34.0	70.0
DC2	5.11	7.24	22.0	69.0
DC4	20.15	12.03	51.0	64.0
DC5	3.83	1.79	37.0	65.0

Quadro 4: Análises de correlação entre a frequência de células IL-10+  $\alpha\beta$  DN após infecção, ou entre a frequência de células IL-10+  $\gamma\delta$  DN após infecção e os parâmetros clínicos LVEF e LVDD. Para avaliar se existe correlação positiva ou negativa significativa entre a porcentagem de expressão da citocina e o parâmetro clínico de cada indivíduo foi utilizado o *coeficiente de correlação de Pearson*.

Maiores detalhes dos resultados desse tópico podem ser apreciados no artigo “*Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative) T cells in individuals with polar forms of Chagas disease”, aceito pela revista *Infection and Immunity* (**Anexo 1**). Os resultados ainda não submetidos à publicação, referentes à expressão dos marcadores de ativação (CD69), coestimulação (CD28 e CTLA-4) e citotoxicidade (Granzima A) pelas células T DN e das moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e HLA) para as células T DN são apresentados a seguir.

### **5.1.2 – Análise da expressão de moléculas de ativação e coestimulação pelas células T DN**

Os resultados desse tópico serão apresentados na forma de gráficos nos quais foram comparadas as células T DN, expressando o TCR  $\alpha\beta$  ou o TCR  $\gamma\delta$ , sem estímulo e após infecção por formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, nos indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C). Nessas marcações, os pacientes foram agrupados porque o número de indivíduos do grupo com cardiopatia dilatada (DC) não foi suficiente para uma análise distinta.

As células do sangue periférico de indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos foram submetidas a marcação com anticorpos monoclonais anti-TCR $\alpha\beta$  ou anti-TCR $\gamma\delta$  acoplados ao fluorocromo FITC, anti-CD4 e anti-CD8 acoplados ao fluorocromo Cy-chrome e contra diferentes moléculas de superfície (CD69, CD28 e CTLA-4) acoplados ao fluorocromo PE. A Figura 3 apresenta um gráfico de densidade e um histograma, obtidos através do programa FlowJo, ilustrativos da análise das marcações com os anticorpos acoplados ao fluorocromo PE.

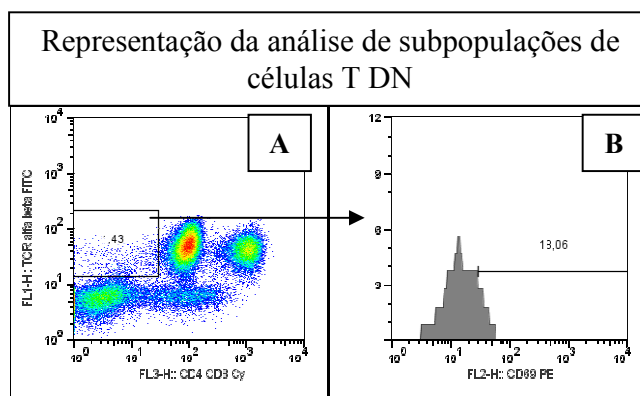


Figura 3: Gráfico representativo da separação da população de células T  $\alpha\beta$  DN (A) e histograma representativo da análise da expressão de CD69 por esta população (B). Estratégia semelhante foi utilizada para análise da expressão das moléculas CD28, CTLA-4 e Granzima A.

O estudo da expressão de CD69, um marcador de ativação recente, na população de células T DN após infecção por *T. cruzi* revelou um aumento da frequência de células expressando esse marcador nos pacientes após o estímulo, tanto nas células T $\alpha\beta$  DN (Figura 4 A) como nas células T $\gamma\delta$  DN (Figura 4 B).

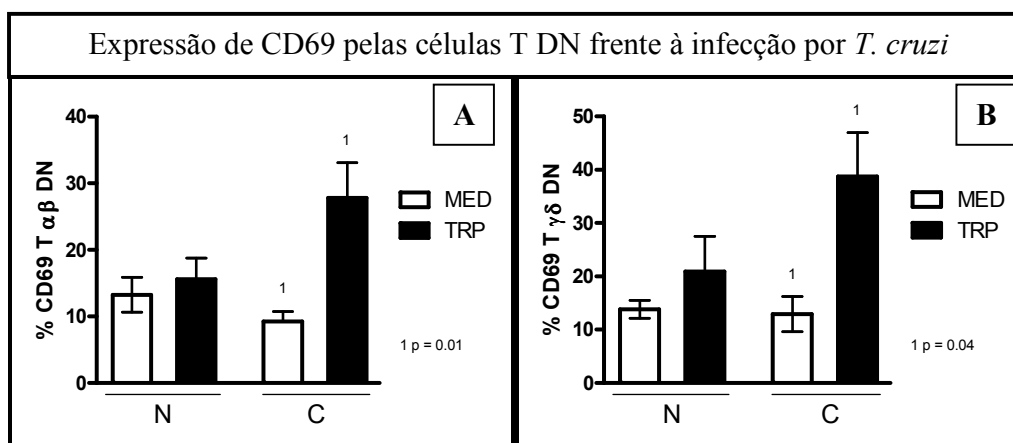


Figura 4: Porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN (A) e células T $\gamma\delta$  DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD69, sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

Devido à importância de subpopulações de células T com expressão diferencial de CD28 (T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) na doença de Chagas humana (Dutra *et al.*, 1996, 2009; Menezes *et al.* 2004), foi avaliada a expressão dessa molécula coestimulatória também nas subpopulações de células T DN.

A expressão desse marcador nas células T $\alpha\beta$  DN não estimuladas é menor nos chagásicos comparados aos não chagásicos (Figura 5 A). No entanto, verificou-se um aumento da frequência de expressão de CD28 por células T $\alpha\beta$  DN nos pacientes, comparando-se células não estimuladas e células expostas ao parasita. Já nas células T $\gamma\delta$  DN, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de CD28 em ambos os grupos ou após estímulo com o parasita (Figura 5 B).

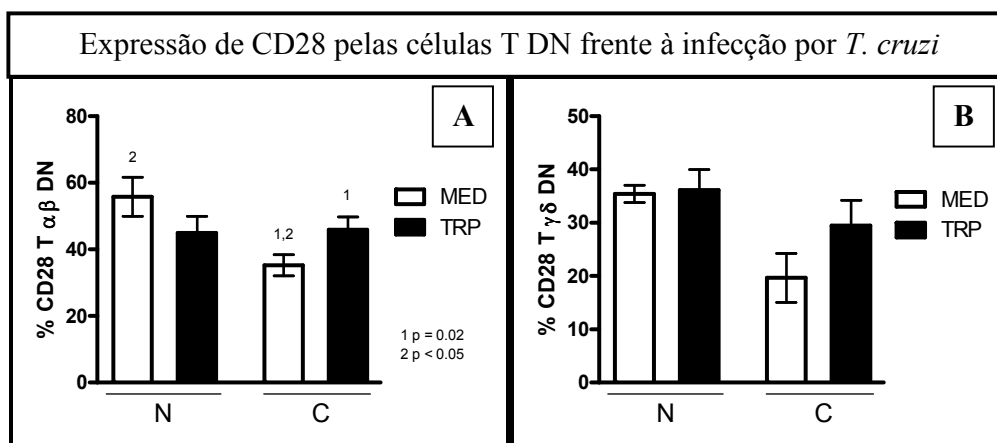


Figura 5: Porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN (A) e células T $\gamma\delta$  DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD28, sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

Tendo em vista a diferença funcional que a molécula coestimulatória CTLA-4 apresenta em relação ao CD28 e o seu potencial papel na imunoregulação da doença de Chagas humana (Souza *et al.*, 2007), foi avaliada a expressão desta molécula na superfície de células T DN de indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos.

Não foram observadas diferenças na expressão de CTLA-4, com e sem estímulo, nas subpopulações de células T DN de ambos os grupos (Figuras 6 A e 6 B).

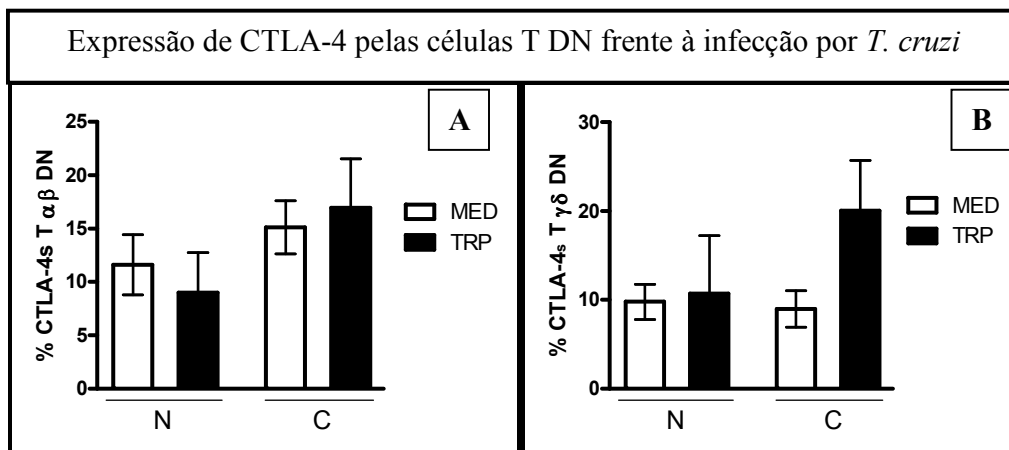


Figura 6: Porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN (A) e células T $\gamma\delta$  DN (B) de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CTLA-4 na superfície, sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.



### 5.1.3 – Análise da expressão de Granzima A pelas células T DN

Os resultados desse tópico serão apresentados na forma de gráficos nos quais foram comparadas as células T DN, expressando o TCR  $\alpha\beta$  ou o TCR  $\gamma\delta$ , sem estímulo e após infecção por formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y. Neste tópico, por aumentar o número de indivíduos analisados, dividiram-se os grupos da seguinte forma: indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC).

Granzima A foi apontada na literatura como uma das principais enzimas proteolíticas que atuam em mecanismos de citotoxicidade (Metkar *et al.*, 2008), e já foi sugerido um papel citotóxico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando granzima A na doença de Chagas humana (Reis *et al.* 1993). Considerando-se a importância dos processos de citotoxicidade na destruição tecidual observada na doença de Chagas, é importante avaliar a existência de outras populações celulares comprometidas com essa função citotóxica.

Não foram observadas diferenças na frequência de células T $\alpha\beta$  DN expressando granzima A após infecção pelo *T. cruzi* nos três grupos avaliados (Figura 7 A). A porcentagem de expressão de granzima A pela subpopulação T $\gamma\delta$  DN aumentou nos pacientes com cardiopatia dilata após o estímulo (Figura 7 B). No entanto, não houve diferença na expressão dessa molécula pelas células T $\gamma\delta$  DN provenientes dos indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada após o estímulo (Figura 7 B).

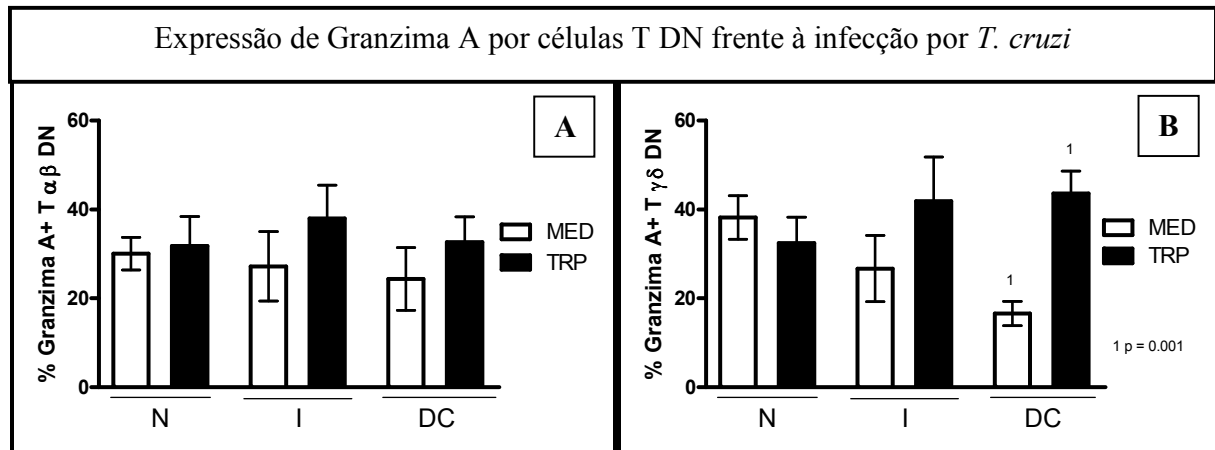


Figura 7: Porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN (A) e células T $\gamma\delta$  DN (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) expressando granzima A, sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7), I (n=7) e DC (n=5). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

#### 5.1.4 – Análise das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN

Os resultados desse tópico serão apresentados na forma de gráficos nos quais foram comparadas as frequências de monócitos CD14<sup>+</sup>, com e sem estímulo, expressando uma das moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d ou HLA-DR) nos indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C). Nessas marcações, os pacientes foram agrupados porque o número de indivíduos do grupo com cardiopatia dilatada (DC) não foi suficiente para uma análise distinta.

Os monócitos desses indivíduos foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD14, acoplados ao fluorocromo Cy-chrome, e contra as diferentes moléculas apresentadoras acoplados

ao fluorocromo FITC ou ao fluorocromo PE. A Figura 8 apresenta gráficos de densidade ilustrativos dessas marcações.

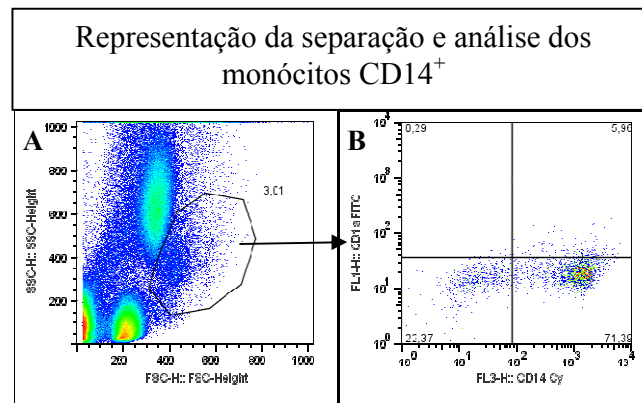


Figura 8: Gráfico puntual representativo da separação da população de monócitos (A), e da análise dos monócitos CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup>, neste exemplo (B).

O estudo do reconhecimento antigênico pelos linfócitos T é de grande importância, já que a ativação dessas células depende desse reconhecimento. A análise do repertório das moléculas apresentadoras, sejam elas mais comprometidas com a apresentação de antígenos proteicos (HLA) ou lipídicos (família CD1), pode fornecer informações preciosas para a compreensão da participação das células T DN na patogênese da doença de Chagas.

A Tabela 3 apresenta as médias de intensidade de fluorescência (MIF) de CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e HLA-DR em células CD14<sup>+</sup> provenientes do sangue periférico de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C), infectadas ou não por formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O estímulo com o parasita aumentou a MIF de CD1a (1 p=0.0007), CD1b (1 p=0.01), CD1c (1 p=0.008) e CD1d (1 p=0.002) nas células CD14<sup>+</sup> dos pacientes chagásicos.

			MIF CD1a	MIF CD1b	MIF CD1c	MIF CD1d	MIF HLA-DR
CD14 <sup>+</sup>	N	MED	28.38 ± 13.84	88.99 ± 77.77	31.74 ± 25.15	40.5 ± 37.62	82.69 ± 42.99
		TRP	94.69 ± 77.56	260.1 ± 265.4	65.18 ± 36.4	81.99 ± 34.32	138.56 ± 35.79
	C	MED	25.03 ± 10.21 <sup>1</sup>	49.64 ± 21.13 <sup>1</sup>	22.78 ± 8.91 <sup>1</sup>	36.7 ± 10.3 <sup>1</sup>	125.3 ± 45.28
		TRP	58.91 ± 21.6 <sup>1</sup>	162.08 ± 103.89 <sup>1</sup>	68.27 ± 42.67 <sup>1</sup>	69.88 ± 25.04 <sup>1</sup>	124.02 ± 55.08

Tabela 3: Médias de intensidade de fluorescência (MIF) das moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e HLA-DR) em células CD14<sup>+</sup> provenientes do sangue periférico de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

A avaliação dos monócitos CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> revelou um aumento na frequência dessa população após a infecção, tanto nos indivíduos não chagásicos quanto nos pacientes chagásicos (Figura 9).

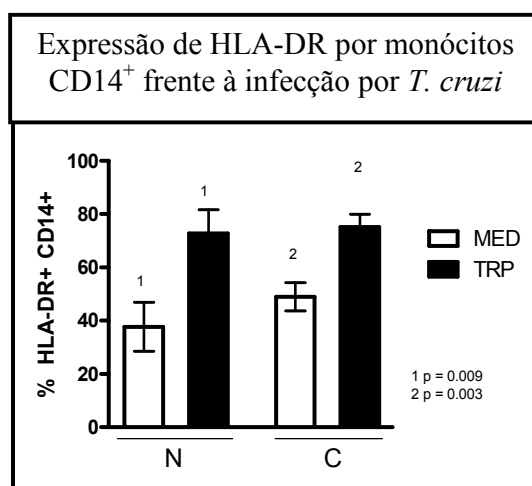


Figura 9: Porcentagem de células CD14<sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando HLA-DR, sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias ± desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

Não foram observadas diferenças na frequência de células CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> estimuladas nos grupos avaliados (Figura 10 A). Já a porcentagem de expressão das células CD14<sup>+</sup> CD1b<sup>+</sup> aumentou no grupo de pacientes após o estímulo (Figura 10 B).

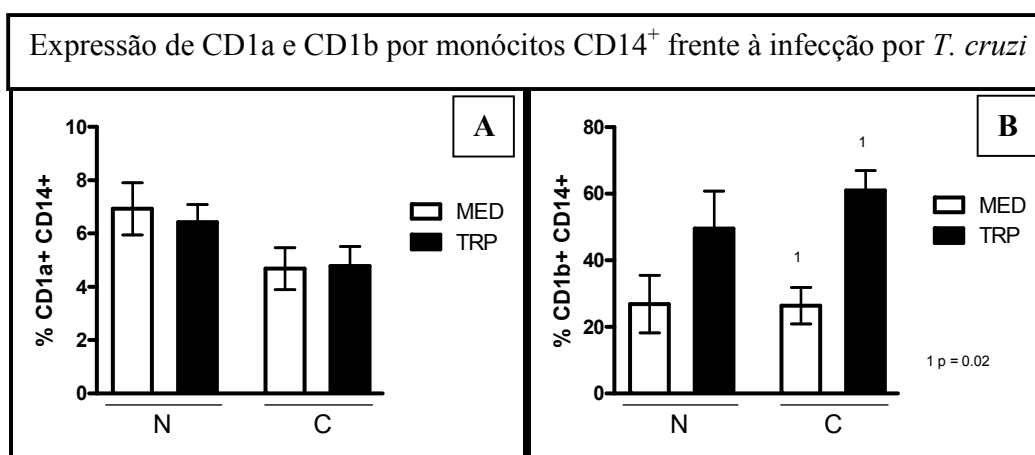


Figura 10: Porcentagem de células CD14<sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD1a (A) ou CD1b (B), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

A frequência de células CD14<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> estimuladas por *T. cruzi* aumentou tanto no grupo de indivíduos não chagásicos como no grupo de pacientes chagásicos (Figura 11 A). Já a frequência de células CD14<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> foi maior, quando estimuladas, apenas no grupo de pacientes chagásicos (Figura 11 B).

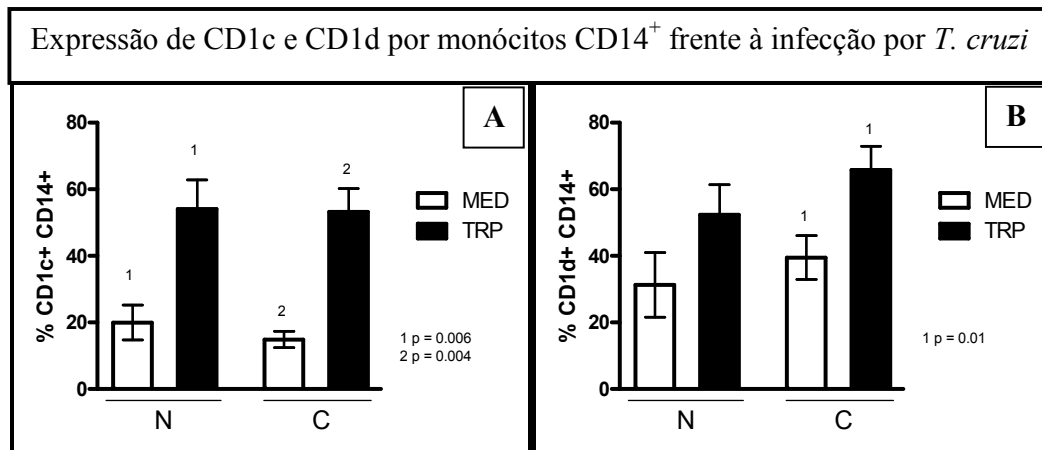


Figura 11: Porcentagem de células CD14<sup>+</sup> de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos (C) expressando CD1c (A) ou CD1d (B), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=7) e C (n=9). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

## 5.2 – Análise dos fatores de transcrição comprometidos com a sinalização intracelular de citocinas

Os resultados desse tópico serão apresentados na forma de gráficos nos quais foram comparadas populações do sangue periférico (linfócitos e monócitos), sem estímulo e após infecção por formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, de indivíduos não chagásicos (N) e pacientes chagásicos apresentando as formas clínicas polares da doença: forma indeterminada (I) e cardiopatia dilatada (DC).

Nessa parte do trabalho, foi realizada uma avaliação das frequências das formas ativadas (fosforiladas) de fatores de transcrição relacionados com a sinalização intracelular de importantes citocinas pró e anti-inflamatórias. Para essa análise, as células foram selecionadas de acordo com sua área e seu tamanho (Figura 12 A). Em seguida foi realizada a seleção das células viáveis através da marcação com um corante que indica morte celular (Figura 12 B). As células viáveis foram então selecionadas quanto ao seu tamanho e granulosidade (Figura 12 C), sendo que, para distinguir entre as diferentes populações do sangue periférico foram utilizados gráficos de granulosidade *versus* CD4 (Figura 12 D). A expressão dos fatores de transcrição pelas populações de interesse foi avaliada através de histogramas, nos quais pode-se distinguir a expressão desses fatores nas células não estimuladas e estimuladas com *T.cruzi* para cada grupo analisado: indivíduos não chagásicos (Figura 12 E), pacientes com forma indeterminada (Figura 12 F) e pacientes com cardiopatia dilatada (Figura 12 G). Na figura estão exemplificadas as expressões de NFκB pelos monócitos provenientes dos diferentes indivíduos.

Representação da separação das populações do sangue periférico para análise dos fatores de transcrição

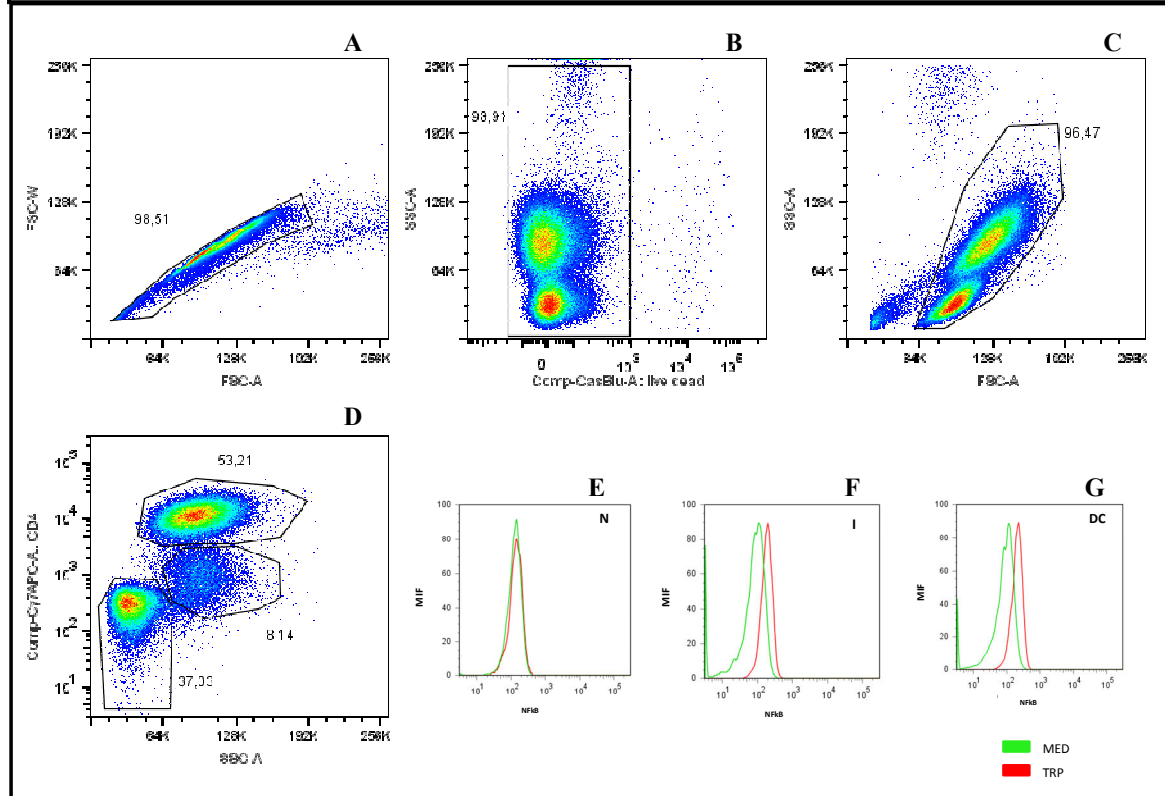


Figura 12: Gráficos representativos das análises para estudo da expressão dos fatores de transcrição. As células foram selecionadas de acordo com sua área e seu tamanho (A), de acordo com sua viabilidade (B) e quanto ao seu tamanho e granulosidade (C). Para a distinção entre as diferentes populações do sangue periférico foram utilizados gráficos de granulosidade versus CD4 (D). A expressão dos fatores de transcrição foi avaliada através de histogramas, nos quais pode-se distinguir a expressão desses fatores nas células não estimuladas (MED) e estimuladas com *T. cruzi* (TRP) para cada grupo analisado: indivíduos não chagásicos (N) (E), pacientes com forma indeterminada (I) (F) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC) (G). Na figura estão exemplificadas as expressões de NFkB pelos monócitos provenientes dos diferentes indivíduos.



### 5.2.1 - NFκB: Fator de transcrição da via pró-inflamatória

Os fatores de transcrição da família NFκB são bem conhecidos pela capacidade de estimular a produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IL1, IL6, TNFα e IFNγ. O NFκB pode desencadear proliferação e adesão celular (Vallabhapurapu & Karin 2009; Mankan *et al.*, 2008).

Na população de linfócitos, verificou-se um aumento da média de intensidade de fluorescência de NFκB fosforilado (pNFκB) nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por *T. cruzi* (Figura 13 A). Nenhuma diferença foi observada na expressão de pNFκB, após estímulo, nos linfócitos provenientes de indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada da doença (Figura 13 A). Já na população de monócitos, houve um aumento da média de intensidade de fluorescência de pNFκB nos dois grupos de pacientes após infecção por *T. cruzi*, enquanto nos indivíduos não chagásicos nenhuma diferença foi detectada (Figura 13 B).

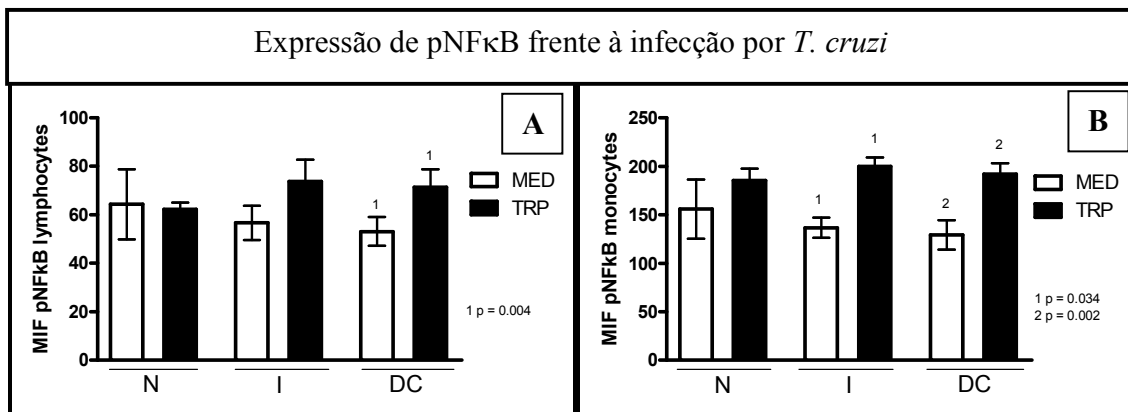


Figura 13: Média de intensidade de fluorescência de pNFκB em linfócitos (A) e monócitos (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=5), I (n=4) e DC (n=6). As barras representam as médias ± desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

### 5.2.2 – STAT3: Fator de transcrição da via anti-inflamatória

O fator de transcrição STAT3 está destacadamente comprometido com a sinalização intracelular de IL-10, desencadeando, portanto, uma resposta de modulação da inflamação (Ihle, 2001; Matsukawa, 2007).

Após estímulo com *T. cruzi*, não foram observadas diferenças na média de intensidade de fluorescência de STAT3 fosforilado (pSTAT3) na população de linfócitos provenientes de indivíduos não chagásicos, pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada da doença de Chagas (Figura 14 A). Já na população de monócitos, houve um aumento da média de intensidade de fluorescência de pSTAT3 nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por *T. cruzi*, enquanto nos indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada nenhuma diferença foi detectada (Figura 14 B).

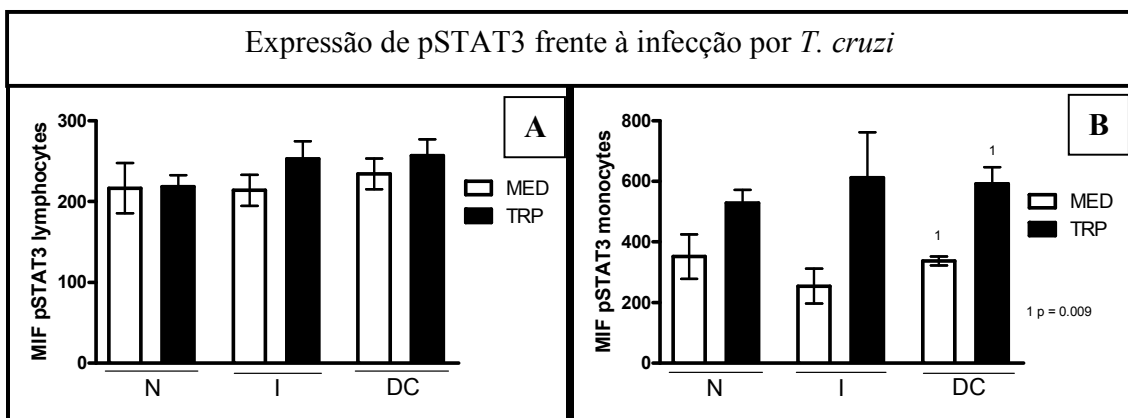


Figura 14: Média de intensidade de fluorescência de pSTAT3 linfócitos (A) e monócitos (B) de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=5), I (n=4) e DC (n=6). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Em cada gráfico, diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

### 5.2.3 - NFκB/STAT3: balanço entre as vias pró e anti-inflamatórias

Uma importante ferramenta aplicada ao estudo do sistema imune é a análise da razão entre fatores relacionados à resposta pró-inflamatória por fatores relacionados à resposta anti-inflamatória. Essa razão informa se há ou não um desbalanço imunológico no organismo, tendendo para uma das respostas acima.

Neste trabalho foi avaliada a razão entre dois fatores de transcrição sabidamente relacionados com a resposta pró e anti-inflamatória: NFκB e STAT3, respectivamente. Foi observado um aumento da razão entre a média de intensidade de fluorescência de pNFκB pela média de intensidade de fluorescência de pSTAT3 nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por *T. cruzi*, enquanto nos indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada nenhuma diferença foi detectada (Figura 15).

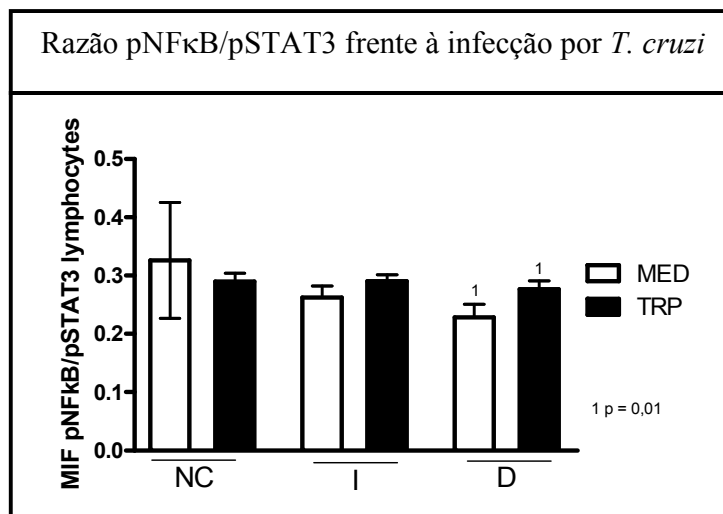


Figura 15: Razão entre as médias de intensidade de fluorescência de pNFκB e pSTAT3 em linfócitos de indivíduos não chagásicos (N), pacientes com forma indeterminada (I) e pacientes com cardiopatia dilatada (DC), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=5), I (n=4) e DC (n=6). As barras representam as médias ± desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os grupos foi utilizado o *Teste de Tukey-Kramer* e para determinar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o *Teste T pareado*. Diferenças estatisticamente significativas entre grupos e estímulos estão indicadas por números iguais.

### **5.3 - Análise dos microRNAs relacionados à regulação pós-transcricional do gene da IL-10**

Os resultados desse tópico serão apresentados na forma de gráficos evidenciando o perfil de expressão de cada miRNA analisado, com e sem estímulo, nos indivíduos não chagásicos (N) e pacientes com a forma indeterminada da doença (I). Nessas análises, foram excluídos os indivíduos que apresentaram Ct médio do miRNA endógeno (hsa-RNU48) próximo ao limiar de detecção do aparelho. Assim, todos os indivíduos do grupo com cardiopatia dilatada foram excluídos da análise, além de indivíduos do grupo não chagásicos e de pacientes com a forma indeterminada.

O nível de expressão de hsa-miR20a em CMSP provenientes de indivíduos não chagásicos (Figura 16 A) e pacientes com a forma indeterminada (Figura 16 B), comparado a expressão desse miRNA em CMSP de indivíduos saudáveis (calibrador), mostrou-se bastante diferente entre os dois grupos. No grupo N, miR20a apresentou baixos níveis de expressão nas células não estimuladas e estimuladas com *T. cruzi*. Já no grupo I, a expressão de miR20a apresentou-se elevada na maioria dos pacientes, tanto nas células não estimuladas quanto nas estimuladas.

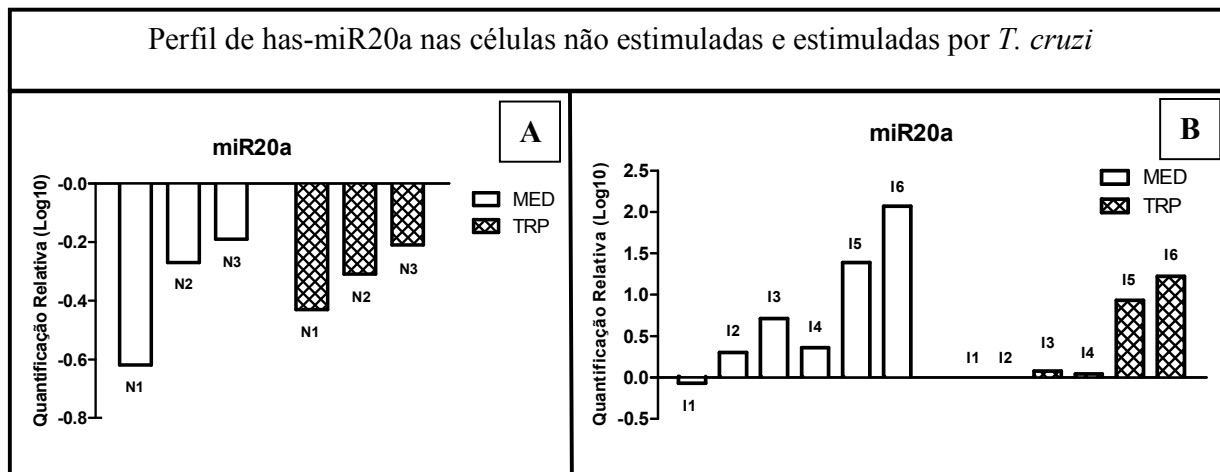


Figura 16:  $\text{Log}_{10}$  da quantificação relativa ( $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) de hsa-miR20a em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=3) e I (n=6). A expressão de miR20a nesses grupos foi comparada a expressão de miR20a em CMSP de indivíduos saudáveis. As barras representam  $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  de miR20a para cada indivíduo analisado.

A quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) de hsa-miR20a nos pacientes com a forma indeterminada não foi diferente nas células não estimuladas quando comparadas às células estimuladas, embora apresente uma tendência a diminuir após infecção ( $p = 0,06$ ) (Figura 17).

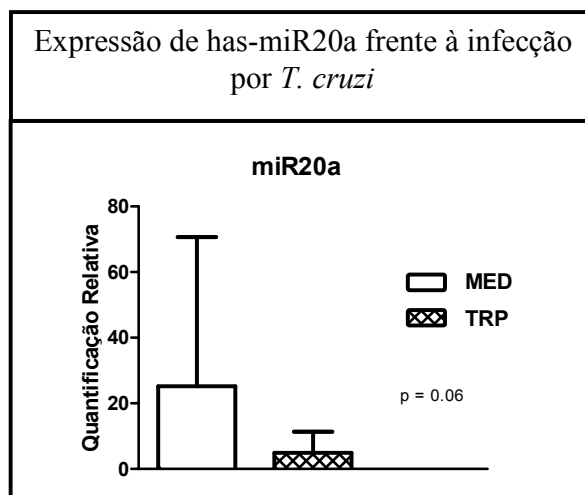


Figura 17: Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de has-miR20a em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). O grupo foi assim constituído: I (n=6). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro do grupo foi utilizado o *Teste Wilcoxon*.

A Figura 18 evidencia o nível de expressão de has-miR106a em CMSP provenientes de indivíduos não chagásicos (Figura 18 A) e pacientes com a forma indeterminada (Figura 18 B), comparado a expressão desse miRNA em CMSP de indivíduos saudáveis (calibrador). O grupo N apresentou um perfil de expressão mais heterogêneo desse miRNA do que o grupo I, no qual a expressão de miR106a apresentou-se elevada nas células não estimuladas e estimuladas por *T. cruzi*.

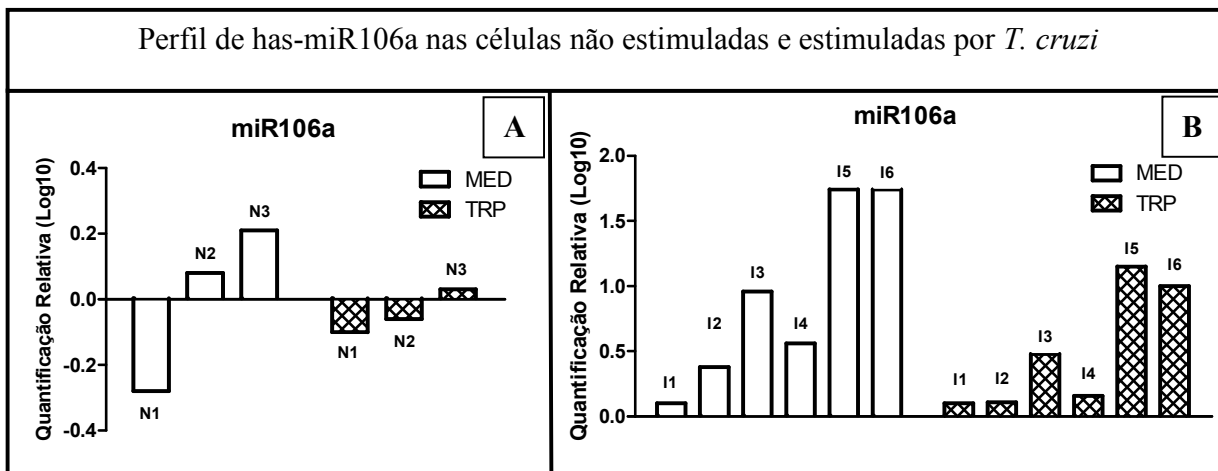


Figura 18: Log<sub>10</sub> da quantificação relativa (Log<sub>10</sub> 2<sup>-ΔΔCt</sup>) de has-miR106a em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=3) e I (n=6). A expressão de miR106a nesses grupos foi comparada a expressão de miR106a em CMSP de indivíduos saudáveis. As barras representam Log<sub>10</sub> 2<sup>-ΔΔCt</sup> de miR106a para cada indivíduo analisado.

A quantificação relativa (2<sup>-ΔΔCt</sup>) de has-miR106a nos pacientes com a forma indeterminada foi menor nas células estimuladas quando comparadas às células não estimuladas (Figura 19).

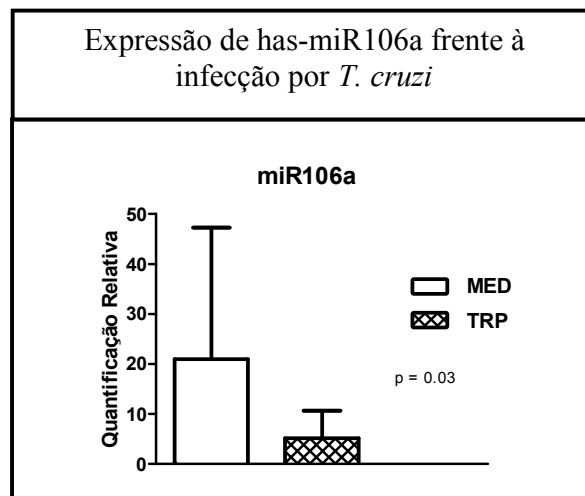


Figura 19: Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de hsa-miR106a em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). O grupo foi assim constituído: I (n=6). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro do grupo foi utilizado o *Teste Wilcoxon*.

O nível de expressão de hsa-miR106b em CMSP provenientes de indivíduos não chagásicos (Figura 20 A), comparado a expressão desse miRNA em CMSP de indivíduos saudáveis (calibrador), apresentou-se diminuído nas células não estimuladas e estimuladas com *T. cruzi*. No grupo de pacientes com a forma indeterminada (Figura 20 B) foi observado um nível de expressão elevado de mir106b nas células não estimuladas da maioria dos indivíduos, sendo que o mesmo não foi observado nas células estimuladas desses pacientes.



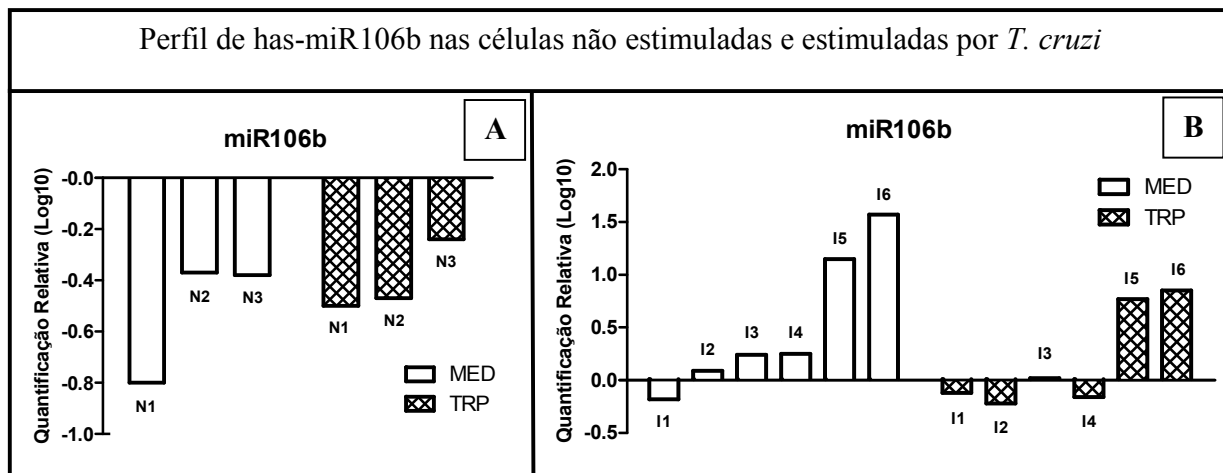


Figura 20:  $\text{Log}_{10}$  da quantificação relativa ( $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de hsa-miR106b em CMSP de indivíduos não chagásicos (N) (A) e pacientes com forma indeterminada (I) (B), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). Os grupos foram assim constituídos: N (n=3) e I (n=6). A expressão de miR106b nesses grupos foi comparada a expressão de miR106b em CMSP de indivíduos saudáveis. As barras representam  $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$  de miR106b para cada indivíduo analisado.

A quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de hsa-miR106b nos pacientes com a forma indeterminada não foi diferente nas células não estimuladas quando comparadas às células estimuladas, embora apresente uma tendência a diminuir após infecção ( $p = 0,06$ ) (Figura 21).

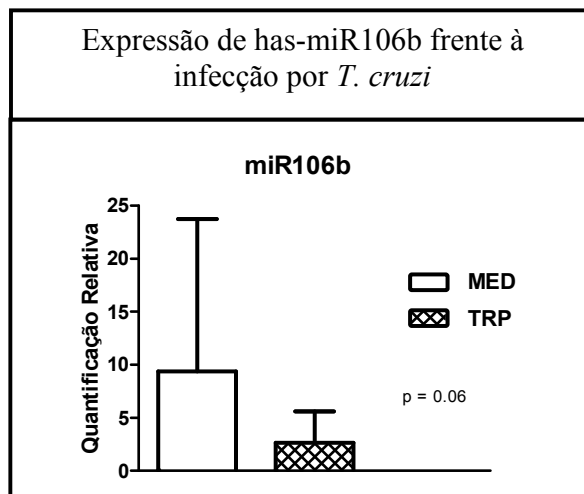


Figura 21: Quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de hsa-miR106b em CMSP de pacientes com forma indeterminada (I), sem estímulo (MED) e após infecção por *T. cruzi* (TRP). O grupo foi assim constituído: I (n=6). As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se há diferença entre os diferentes tratamentos dentro do grupo foi utilizado o *Teste Wilcoxon*.

## 6. Discussão

Na doença de Chagas, a presença do parasita parece ser o passo inicial de indução da reatividade celular. Porém, a baixa parasitemia que acompanha a cronificação da doença sugere a participação do sistema imunológico do hospedeiro nos processos que mantêm esta patologia.

Os componentes do sistema imune do hospedeiro são alvos de várias pesquisas que confirmam a importante participação dos linfócitos T no desenvolvimento da doença de Chagas. De acordo com a literatura, as células T possuem um papel crucial na montagem da resposta imune durante a fase crônica da doença (revisto por Dutra *et al.*, 2009). O estudo dos linfócitos T clássicos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> compreende um vasto e importante campo de pesquisa dos aspectos imunológicos relacionados à resposta contra o *T. cruzi*. Nesse sentido, inúmeros trabalhos vêm sugerindo a possível participação dessas células na doença de Chagas, tanto em aspectos de imunoregulação como na atividade efetora (revisto por Dutra *et al.*, 2005). Embora essas células certamente desempenhem um papel de destaque na imunidade em resposta à infecção pelo *T. cruzi*, outras populações celulares, por vezes menos frequentes, também podem ter um papel importante. Muitas vezes, uma baixa representação quantitativa não necessariamente correlaciona-se à baixa atividade funcional, pois o sistema imune é um sistema interativo e, portanto, quadros que gerem alterações imunológicas, podem afetá-lo de maneira geral. Logo, buscar determinar a magnitude da contribuição de cada população celular para o estabelecimento da resposta imune é altamente relevante. Assim, acreditamos que a análise de linfócitos menos caracterizados, como os CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN), seja essencial para um melhor entendimento da patologia chagásica como um todo.

A base da realização desse trabalho veio de dois achados anteriores de nosso grupo: (1) diferentes subpopulações de células T DN possuem características funcionais distintas na

leishmaniose humana, podendo exercer importante papel na imunoregulação e (2) células T DN são importante fonte de IFN- $\gamma$  na doença de Chagas humana. Sabe-se que IFN- $\gamma$  é uma citocina inflamatória associada à patologia chagásica. Gomes e colaboradores (2003) encontraram uma clara correlação entre a expressão de IFN- $\gamma$  e o agravamento da cardiopatia chagásica crônica. Em nossas análises, baseados nos dados obtidos por Souza (tese de doutorado, 2003), observamos que as células T DN são responsáveis por aproximadamente 55% da produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com cardiopatia dilatada, enquanto que, em indivíduos não chagásicos e pacientes com forma indeterminada, essa contribuição é em torno de 17% (dados não mostrados). A definição clara das formas clínicas da doença de Chagas tem revelado que as mesmas populações celulares encontram-se ativadas nos pacientes assintomáticos e cardíacos, mas que essas células possuem potenciais funcionais distintos (revisto por Dutra & Gollob, 2008). Por isso elaboramos esse estudo, a princípio, com o objetivo de caracterizar as células T DN provenientes dos pacientes com as formas clínicas polares da doença de Chagas.

Na primeira parte deste estudo, analisamos as subpopulações de células T DN, expressando o TCR  $\alpha\beta$  ou o TCR  $\gamma\delta$ , isoladas de indivíduos não chagásicos, pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada, infectadas ou não por formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Não foram encontradas diferenças quantitativas nas células não estimuladas entre pacientes e indivíduos não chagásicos, mas a infecção, de uma maneira geral, levou à expansão dos linfócitos T DN nos três grupos analisados (Anexo 1, Figura 1 A). Aqui, comparando os dados encontrados por nosso grupo em pacientes com leishmaniose cutânea e pacientes chagásicos, nota-se uma diferença na frequência de DN isoladas a fresco, que foi menor nos pacientes com leishmaniose comparados aos indivíduos controles (Antonelli *et al.*, 2006). Embora a leishmaniose e a doença de Chagas sejam causadas por organismos pertencentes à

mesma família, a resposta imune nessas doenças possui vários aspectos particulares (revisto por Gollob *et al.*, 2005). Assim, não era de se esperar, necessariamente, que encontrássemos resultados semelhantes entre essas duas patologias. Talvez, a diminuição da frequência de DN no sangue periférico dos pacientes com leishmaniose seja devido a um recrutamento dessas células para as lesões, sendo que, nos pacientes chagásicos, elas permaneceriam preferencialmente no sangue periférico. De fato, a maioria dos linfócitos presentes na lesão miocárdica dos pacientes chagásicos são células citotóxicas CD8<sup>+</sup> (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997). No entanto, a frequência das células T DN nas lesões decorrentes da leishmaniose ou doença de Chagas ainda não foi cuidadosamente analisada. Nossos dados diferem também dos achados que mostram uma frequência aumentada de células T DN em doenças autoimunes e imunodeficiências (Shivakumar *et al.*, 1989; Illum *et al.*, 1991; Sieling *et al.*, 2000; Ohga *et al.*, 2002). Embora a doença de Chagas possua um componente de autoreatividade e compartilhe algumas características semelhantes a doenças autoimunes, como a elevada frequência de células T CD28<sup>-</sup> e linfócitos B CD5<sup>+</sup> (Dutra *et al.*, 1994, 1996; Lovett-Racke *et al.*, 1998; Jarvis *et al.* 1992), é possível que os mecanismos de ativação das células T DN na doença de Chagas não estejam relacionados à autoreatividade. Estudos mais detalhados sobre os antígenos que desencadeiam a ativação dessas células poderão esclarecer esse aspecto.

Um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o estado de ativação das células T DN, para verificar a existência de diferenças qualitativas nas subpopulações oriundas dos indivíduos controles e pacientes. Para isso, avaliamos a expressão do marcador de ativação CD69. A estimulação do complexo TCR/CD3 leva à rápida expressão de CD69 na superfície dos linfócitos e, por isso, essa molécula é considerada um marcador de ativação recente (Lanier *et al.*, 1988). Embora, de maneira geral, a frequência de células T DN tenha sido maior nos indivíduos não chagásicos após infecção (Anexo 1, Figura 1 A), ambas as subpopulações (TCR  $\alpha\beta^+$  e TCR  $\gamma\delta^+$ )

apresentaram maior expressão de CD69 no grupo de pacientes (Figura 4), evidenciando uma maior ativação dessas células, frente ao estímulo, nos pacientes chagásicos. Logo, mesmo menos frequentes, as células T DN parecem desempenhar uma função relevante na resposta imune contra o *T. cruzi*.

Os sinais enviados pelas moléculas coestimulatórias, presentes na superfície dos linfócitos, após a ligação a seus receptores, presentes na superfície das APCs, são requeridos para uma ativação eficiente dos linfócitos. O CD28 integra o grupo das moléculas coestimulatórias e é expresso, em humanos saudáveis, pelas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> (Lenschow *et al.*, 1996) e T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Antonelli *et al.*, 2006). Ao compararmos a expressão de CD28 pelas células T DN isoladas a fresco dos pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos, observamos uma maior frequência de células T αβ DN CD28<sup>+</sup> no grupo controle (Figura 5 A). Esses dados são consistentes com achados anteriores do nosso grupo, mostrando que pacientes chagásicos, com diferentes formas clínicas, apresentam níveis elevados de linfócitos CD28<sup>-</sup> comparados aos indivíduos não chagásicos (Dutra *et al.*, 1996). Contudo, a expressão dessa molécula aumentou nas células Tαβ DN dos pacientes após infecção pelo *T. cruzi* (Figura 5 A), diferindo da subpopulação γδ<sup>+</sup> que apresentou expressão semelhante de CD28 entre os grupos e após estímulo (Figura 5 B). É possível que a ausência do coreceptor (CD4 ou CD8) torne o engajamento de CD28 necessário para que as DN respondam satisfatoriamente ao estímulo específico. Este achado corrobora dados da literatura mostrando que a interação CD28/B7 é necessária para a estimulação e resposta proliferativa consistentes das células T DN (Caveno *et al.*, 1999). Em pacientes com leishmaniose cutânea foi observada maior expressão de CD28, comparado aos indivíduos controles, pela mesma subpopulação de células T DN, que expressam o TCRαβ (Antonelli *et al.*, 2006). No caso das células Tαβ DN, é provável que a manutenção de CD28 na

superfície celular esteja relacionada a um estado mais ativado, que leva a uma resposta mais inflamatória, embora a modulação dessa molécula coestimulatória esteja associada a ativação em outras populações celulares (Dutra *et al.*, 1996; Moosing *et al.*, 1998; Markovic-Plese *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004).

A outra molécula coestimulatória avaliada foi o CTLA-4. Embora tenha estrutura semelhante à do CD28 e também interaja com B7-1 e B7-2, o CTLA-4 funciona como um regulador negativo das células T, impedindo ou modulando sua ativação (Walunas *et al.*, 1994; Krummel *et al.*, 1995). Após a ativação o linfócito pode, através de um mecanismo de autoregulação, reduzir a expressão de CD28 e aumentar a expressão de CTLA-4 (Chambers e Allison, 1997). Em nossos resultados vimos que as frequências de células T $\alpha\beta$  DN e T $\gamma\delta$  DN expressando CTLA-4, estimuladas ou não por *T. cruzi*, foram similares entre os pacientes e indivíduos controles (Figura 6). Nas populações de linfócitos T clássicos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) provenientes de pacientes com cardiopatia dilatada, nosso grupo observou uma expressão elevada de CTLA-4 intracelular, enquanto que a expressão de superfície dessa molécula foi baixa (Souza *et al.*, 2007). Esses autores sugeriram que pacientes chagásicos cardiopatas apresentam uma deficiência na expressão dessa molécula. Nesse mesmo trabalho foi observado um aumento da expressão de CTLA-4 nos pacientes com a forma indeterminada, especialmente nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sugerindo que essas células podem se auto-regular. No caso das células DN, o estímulo antígeno-específico não levou a uma alteração na expressão de CTLA-4 na superfície celular. Porém, é possível que uma análise distinta dos pacientes com as diferentes formas clínicas revele alguma diferença na expressão dessa molécula. Por outro lado, observamos uma tendência, na subpopulação  $\gamma\delta$  DN, em aumentar a expressão de CTLA-4, após infecção, nos pacientes, visto que o valor de p da comparação entre  $\gamma\delta$  DN não estimuladas e estimuladas desses indivíduos foi

igual a 0,08 (dado não mostrado). Relacionando os dados que obtivemos sobre CD28 e CTLA-4, parece, realmente, que as células T DN dependem da interação das moléculas coestimulatórias para desempenhar suas funções, sendo que as diferentes subpopulações apresentam características funcionais distintas. Enquanto a subpopulação  $\alpha\beta^+$  está mais comprometida com a resposta inflamatória, dado a maior expressão de CD28 após infecção, a subpopulação  $\gamma\delta^+$  está mais comprometida com a modulação da inflamação, dado a tendência de maior expressão de CTLA-4 após estímulo.

Outro aspecto das células T DN avaliado neste trabalho foi a função citotóxica, e foi escolhido um representante da via das granzimas, a granzima A, pela importância dessas proteínas na regulação imune, controlando a sobrevivência de linfócitos ativados (Chowdhury & Lieberman, 2008). A expressão de granzima A pela subpopulação  $\alpha\beta^+$  foi semelhante, com e sem estímulo, entre indivíduos não chagásicos, pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada (Figura 7 A). Também não encontramos diferença na expressão dessa molécula nas células T $\gamma\delta$  DN provenientes dos indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada após o estímulo. Já nos pacientes com cardiopatia dilatada, a expressão de granzima A foi maior na subpopulação  $\gamma\delta^+$  após infecção pelo *T. cruzi* (Figura 7 B). Em um estudo que avaliou a composição do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica foi encontrada uma predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando granzima A (Reis *et al.* 1993). Pode-se dizer, em relação à citotoxicidade das células DN na doença de Chagas humana, que a subpopulação  $\gamma\delta$  DN do sangue periférico de pacientes com cardiopatia dilatada parece aumentar o comprometimento com esta função após o estímulo antígeno-específico. A presença de elevadas concentrações de granzima circulante em vários processos inflamatórios e a clivagem mediada por granzima de substratos extracelulares sugerem



que essas proteases podem ter um papel extracelular relevante na rejeição de vírus e tumores, mas também na patogênese de doenças inflamatórias crônicas (revisito por Romero & Andrade, 2008). Logo, esses linfócitos T  $\gamma\delta$  DN produtores de granzima A podem contribuir para a destruição do parasita, como também para o dano tecidual observado nos pacientes cardíacos.

A avaliação do perfil de citocinas produzido pelas células T DN dos pacientes com as formas clínicas polares da doença de Chagas foi um dos passos mais importantes neste estudo. As citocinas são mediadores imunológicos, produzidos pelas células imunocompetentes, de grande importância na determinação do curso de uma infecção. Já está bem estabelecida na literatura a existência de citocinas que induzem ou regulam as respostas inflamatórias. Nós avaliamos a produção da citocina modulatória IL-10, das citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. Essas citocinas foram escolhidas devido ao seu possível papel na doença de Chagas, ou em outras doenças parasitárias, sugerido por diversos autores (Dutra *et al.*, 1997, 2000; Gomes *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004, 2007; Menezes *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 1993; Cunha-Neto *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2003; Bacellar *et al.*, 2009). Os resultados dessa etapa podem ser vistos no artigo “*Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  CD4-CD8- (double negative) T cells in individuals with polar forms of Chagas disease”, aceito para publicação na revista *Infection and Immunity* (Anexo 1). Nossos dados mostram que as células T  $\alpha\beta$  DN estão mais comprometidas com a produção das citocinas pró-inflamatórias em ambas as formas clínicas (Anexo 1, Figura 2). Nosso grupo também observou um perfil mais inflamatório das células T $\alpha\beta$  DN, com maior expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  comparado aos indivíduos controles, na leishmaniose cutânea (Antonelli *et al.*, 2006), mostrando uma atividade funcional semelhante dessa subpopulação nas duas infecções parasitárias. Além disso, apesar de sofrerem expansão após a infecção por *T. cruzi*, as células T $\alpha\beta$  DN dos indivíduos não chagásicos não expressam

citocinas induzidas pelo parasita, evidenciando uma resposta primária. Nos pacientes, essas células expressam altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 após infecção, evidenciando uma resposta antígeno-específica.

Um importante dado gerado por este trabalho é o de que as células T  $\gamma\delta$  DN apresentam um destacado aumento na expressão de IL-10 antígeno-específica nos pacientes com a forma indeterminada quando comparados aos pacientes com cardiopatia dilatada e aos indivíduos controles (Anexo 1, Figura 3). Em humanos, IL-10 tem potentes efeitos inibitórios na função celular de macrófagos/monócitos, como a produção de citocinas pró-inflamatórias (de Waal Malefyt, 1995). Foi observado por nosso grupo que CMSP de pacientes chagásicos exibem níveis aumentados de mRNA para IL-10 comparadas às células de indivíduos não chagásicos (Dutra *et al.*, 1997). Em um estudo posterior, viu-se que monócitos de pacientes com a forma indeterminada são altamente comprometidos com a produção de IL-10 (Souza *et al.*, 2004). Além disso, avaliando polimorfismo funcional no gene que codifica pra IL-10, dados recentes de nosso grupo mostraram a associação entre a expressão do alelo responsável pela baixa produção de IL-10 e a cardiopatia chagásica crônica (Costa *et al.*, 2009). De maneira interessante, neste trabalho, observamos uma correlação positiva entre a maior frequência de células T  $\gamma\delta$  DN expressando IL-10 com parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca nos pacientes, sugerindo um papel protetor dessas células na doença de Chagas (Anexo 1, Figura 4). Baseados nesses achados, acreditamos que a IL-10 seja o principal modulador da resposta contra o *T. cruzi* na fase crônica, auxiliando no estabelecimento de um equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita.

Em uma outra etapa do nosso estudo, avaliamos o repertório de moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN, expressas na superfície de APCs dos pacientes chagásicos. Achados anteriores indicam que a maior parte das células T DN reconhece antígenos

lipídicos/glicolipídicos apresentados via moléculas apresentadoras da família CD1 (Porcelli *et al.*, 1989; Beckman *et al.*, 1994; Antonelli, 2005). Por isso, foram avaliados os perfis de expressão de CD1a, CD1b, CD1c e CD1d por monócitos (CD14<sup>+</sup>) isolados do sangue periférico de indivíduos não chagásicos e pacientes chagásicos. Também avaliamos a expressão do MHC de classe II, através da marcação do HLA-DR nesses monócitos, para obter informações também sobre a apresentação de antígenos proteicos. Os monócitos dos indivíduos controles e dos pacientes apresentaram porcentagens de expressão semelhantes de HLA-DR, com aumento da expressão desse marcador após infecção pelo *T. cruzi* (Figura 9). Porém, a MIF desse marcador nos monócitos não aumentou, após infecção, em ambos os grupos analisados (Tabela 3). Dados anteriores do nosso grupo mostraram uma diminuição da expressão de HLA-DR, comparado a indivíduos controles, na superfície de monócitos provenientes de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas após infecção pelo *T. cruzi* (Souza *et al.*, 2004). Essa diferença pode ser devido à análise conjunta de pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada realizada no presente estudo. Esses diferentes pacientes apresentam perfis de expressão de HLA-DR distintos. Como sugerido por Souza e colaboradores, a diminuição da expressão do MHC II indica que os pacientes assintomáticos possuem menor habilidade em estimular linfócitos CD4<sup>+</sup> e que esse pode ser um importante mecanismo de controle da inflamação nesses pacientes. Em acordo com as observações clínicas, esse perfil modulador não é observado nos pacientes cardíacos.

Outra diferença importante nos dados sobre a expressão de HLA-DR em pacientes chagásicos é que os primeiros trabalhos do nosso grupo analisaram esse marcador nas CMSP e, neste trabalho, a análise foi realizada nas células do sangue total. Talvez a presença de outros tipos celulares durante o período de incubação da cultura influencie indiretamente a porcentagem

de expressão de HLA-DR. A intensa produção de citocinas pelos granulócitos pode levar a maior expressão desse marcador.

Apesar do número de monócitos CD14<sup>+</sup> expressando CD1a não ter aumentado com a infecção (Figura 10 A), a MIF de CD1a nessas células foi maior no grupo de pacientes após o estímulo (Tabela 3). Esse resultado sugere que CD1a seja capaz de apresentar antígenos hidrofóbicos do parasita durante a infecção. Porém a porcentagem de células CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> observada nos pacientes, como também nos indivíduos controles, foi muito baixa em relação as porcentagens de células CD14<sup>+</sup> expressando as outras moléculas CD1 analisadas (CD1b, CD1c e CD1d) (Figuras 10 e 11). CD1a, juntamente com CD1b e CD1c, integra o grupo 1 de moléculas CD1 em humanos. As proteínas desse grupo são capazes de apresentar antígenos lipídicos bacterianos, como também uma variedade de glicolípides de mamíferos. CD1d é o único representante do grupo 2 de moléculas CD1 e, embora não apresente grande homologia com as outras moléculas da família CD1, é expressa pelas mesmas populações celulares (revisto por Dutronc & Porcelli, 2002). A porcentagem de expressão e a MIF de CD1b pelos monócitos aumentou no grupo de pacientes após o estímulo (Figura 10 B e Tabela 3), sugerindo que CD1b esteja comprometido com a apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos derivados do parasita, principalmente às células T DN, na doença de Chagas crônica.

Quanto à CD1c, observamos maior porcentagem de expressão, após infecção pelo *T. cruzi*, nos monócitos de indivíduos não chagásicos e de pacientes chagásicos (Figura 11 A). Mas a MIF de CD1c nessas células só aumentou no grupo de pacientes após o estímulo (Tabela 3). Dessa forma, é possível que CD1c também esteja envolvido na apresentação de antígenos do *T. cruzi* às células T DN. Dados da literatura sugerem que as células T DN possuem um reconhecimento de antígenos lipídicos bacterianos restrito às moléculas CD1 do grupo 1 e, ainda, que grande parte dos linfócitos T em humanos, que expressam o TCR  $\gamma\delta$ , reconhece

particularmente a molécula CD1c (Dutronc & Porcelli 2002). Assim, estudos mais detalhados sobre as regiões das cadeias do TCR  $\gamma\delta$  que reconheçam o complexo CD1c-lipídeo/glicolipídeo nos pacientes chagásicos podem ajudar a esclarecer se existe algum antígeno dominante do parasita nesta resposta, criando novas perspectivas terapêuticas.

Da mesma forma que CD1b, a porcentagem de expressão e a MIF de CD1d pelos monócitos aumentou no grupo de pacientes após o estímulo (Figura 11 B e Tabela 3). Logo, é provável que CD1d também esteja comprometido com a apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos provenientes do *T. cruzi* para as células T DN, embora tenha sido sugerido que os linfócitos NK T sejam as principais células reconhecedoras da molécula CD1 do grupo 2, o CD1d. Estudos envolvendo a análise da resposta após bloqueio específico dessas moléculas poderão esclarecer seu papel na apresentação de antígenos às células T DN. Considerando-se a complexidade antigênica do parasita, é possível (e até provável) que mais de uma molécula esteja envolvida no processo.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, podemos perceber que a apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos pelas moléculas da família CD1 representa uma via importante da resposta imune contra o *T. cruzi*. A maioria dos linfócitos T DN reconhece antígenos nesse contexto. Logo, o perfil de ativação encontrado nas diferentes subpopulações de células T, seja ela comprometida com a resposta inflamatória (T $\alpha\beta$  DN) ou com a modulação da inflamação (T $\gamma\delta$  DN), é devido ao reconhecimento dos antígenos apresentados pelas moléculas CD1 presentes na superfície das APCs. Dados da literatura mostram que âncoras-GPI provenientes do *T. cruzi* são importantes para a ativação de resposta imune celular na infecção experimental (Nakayasu *et al.*, 2009). Apesar desses achados, alguns autores acreditam que as proteínas da família CD1 não possuem um papel importante na resposta imune celular contra componentes

desse parasita (Procopio *et al.*, 2002). Em controvérsia, o nosso trabalho forneceu perspectivas importantes da participação de antígenos lipídicos/glicolipídicos derivados do *T. cruzi* no desenvolvimento da doença de Chagas humana.

A partir dos dados obtidos neste estudo, e em vários outros trabalhos, sobre o perfil de citocinas expresso pelas células T DN, e por outras populações linfocitárias, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, nos propusemos avaliar alguns aspectos da resposta e regulação de citocinas.

Sabe-se que a complexa rede imunológica utiliza diversas proteínas de sinalização intracelular para conduzir as células a determinados destinos, sendo que os fatores de transcrição ocupam um papel de destaque nesse contexto. Muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo dos fatores de transcrição que coordenam a resposta de citocinas, trazendo contribuições importantes para o entendimento do processo inflamatório (Matsukawa, 2007; Vallabhapurapu & Karin, 2009; O'Sullivan *et al.*, 2007). Neste trabalho, avaliamos a expressão de importantes fatores de transcrição, tendo como foco os fatores conhecidamente relacionados à sinalização de destacadas citocinas pró (NFκB) ou anti-inflamatórias (STAT3) envolvidas na patogênese da doença de Chagas. A média de intensidade de fluorescência (MIF) da forma fosforilada (ativada) de NFκB e STAT3 foi avaliada em linfócitos e monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos não chagásicos, pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada não estimulados e estimulados por formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Nossos resultados mostraram um aumento da MIF de pNFκB pelos linfócitos provenientes de pacientes com cardiopatia dilatada após a infecção (Figura 13 A). Esse achado evidencia uma resposta ativa às citocinas proinflamatórias desses pacientes. Já na população de monócitos, a infecção levou a um aumento da MIF de pNFκB tanto nos pacientes com a forma

grave quanto naqueles assintomáticos (Figura 13 B). Dados da literatura mostram que NFκB pode ser ativado por uma variedade de estímulos provenientes de receptores de antígenos, de receptores de reconhecimento padrão, receptores dos membros da família TNF e da família IL-1, entre outros (revisto por Vallabhapurapu & Karin 2009). Apesar dessa gama de possibilidades de ativação, a resposta de citocinas inflamatórias nos monócitos de pacientes chagásicos apresenta certa especificidade, visto que o aumento de pNFκB foi observado nos dois grupos de pacientes, mas não no grupo controle.

A MIF de pSTAT3 foi similar entre os linfócitos provenientes dos indivíduos dos três grupos avaliados, com e sem estímulo (Figura 14 A). Enquanto nos monócitos, observamos um aumento da MIF de pSTAT3 após infecção nos pacientes com cardiopatia dilatada (Figura 14 B). Linfócitos T murinos deficientes em STAT3 apresentam uma resposta ligeiramente reduzida ao estímulo do TCR/IL-2 e uma resposta significativamente reduzida a IL-6 (Takeda *et al.*, 1998). Além disso, a deleção de STAT3 em macrófagos resulta em um fenótipo constitutivamente ativado e um aumento na sensibilidade a lipopolissacarídeos (Takeda *et al.*, 1999). Esses achados atribuem a STAT3 um papel essencial na resposta anti-inflamatória induzida por IL-10. Os nossos resultados referentes a STAT3 reforçam o pensamento de que as mesmas populações celulares são capazes de promover as respostas pró e anti-inflamatórias nos pacientes com doença de Chagas crônica, dependendo do microambiente no qual estão inseridas (revisto por Dutra *et al.*, 2009). No entanto, parece que a população de linfócitos dos pacientes com cardiopatia dilatada, em relação às vias de sinalização intracelular, está mais comprometida com a resposta inflamatória, evidenciada pela maior MIF de pNFκB associada a MIF similar de pSTAT3 após estímulo. Essa visão é condizente com as observações clínicas e complementa dados da literatura mostrando uma maior expressão de citocinas inflamatórias nesses pacientes (Dutra *et al.*, 1997,

2000; Gomes *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 1993; Cunha-Neto *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2003). Para testar essa hipótese, avaliamos a razão MIF pNFκB / MIF pSTAT3 de linfócitos isolados dos diferentes indivíduos, não infectados e infectados por *T. cruzi*. De maneira interessante, essa razão aumentou significativamente apenas nos pacientes cardíacos após infecção (Figura 15). Esses achados fornecem evidências de que a via do NFκB seja crucial para o desencadeamento da resposta inflamatória na doença de Chagas humana. Contudo, devido à complexidade da sinalização intracelular, é preciso avaliar o estado de ativação de outros fatores de transcrição para entender melhor os caminhos que levam às diferentes respostas encontradas nessa patologia.

Tão importante quanto conhecer as vias utilizadas pelas citocinas para exercerem seus papéis biológicos é identificar os mecanismos pelos quais a expressão dessas proteínas é modulada. Os mecanismos de regulação gênica tem sido cada vez mais explorados e, dentre eles podemos destacar a regulação pós-transcricional através dos microRNAs (Chen & Rajewsky, 2007). Dados da literatura sugerem que os miRNAs podem controlar o desenvolvimento tumoral e desempenhar um papel crítico na patogênese, através da regulação da proliferação celular e apoptose (Calin & Croce, 2006; Wiemer, 2007). No entanto, o papel desses reguladores na patogênese das doenças infecciosas ainda é pouco explorado.

Através dos artifícios da bioinformática é possível identificar os prováveis genes alvos dos miRNAs já conhecidos. Dessa forma, foram identificados três miRNAs com potencial regulador do gene da IL-10 humana: hsa-miR20a, hsa-miR106a e hsa-miR106b (Sharma *et al.*, 2008). Baseados nos nossos achados sobre o papel da IL-10 no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Dutra *et al.*, 1997, 2000; Souza *et al.*, 2004, 2007; Menezes *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2009), nos propusemos avaliar a expressão desses três miRNAs nas



CMSP provenientes de indivíduos não chagásicos, pacientes com a forma indeterminada e com cardiopatia dilatada frente à infecção pelo *T. cruzi*. Para tanto, utilizamos o método do Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostras, normalizada com um gene constitutivo (endógeno), comparado com um grupo de referência (calibrador) (Applied Biosystems User Bulletin N°2 – P/N 4303859 - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Através do Ct comparativo, nós obtivemos a quantificação relativa (RQ) dos três miRNAs alvos (miR20a, miR106a, miR106b) e do miRNA endógeno (RNU48).

Nas análises do método do Ct comparativo, alguns indivíduos apresentaram uma grande diferença no Ct médio do endógeno nas amostras estimuladas em relação às não estimuladas. Nos pacientes com cardiopatia dilatada, a média do Ct do endógeno foi  $24.56 \pm 2.71$  para as células não estimuladas e  $33.24 \pm 2.1$  para as células estimuladas, enquanto para os pacientes com a forma indeterminada esses valores foram  $27.83 \pm 4.18$  e  $26.23 \pm 2.62$  respectivamente. Também para os miRNAs alvos, a média do Ct nas células dos pacientes cardíacos submetidas ao estímulo foi alta, tendo atingido níveis muito próximos do limiar de detecção do aparelho. Dessa forma, esses pacientes, como também alguns indivíduos controles e pacientes com a forma indeterminada, foram excluídos da análise. Esses resultados mostram que a exposição das CMSP dos pacientes com cardiopatia chagásica ao *T. cruzi* diminuiu os níveis dos miRNAs testados (miR20a, miR106a, miR106b), como também do miRNA endógeno (RNU48). Talvez a diminuição do número de células devido à morte celular causada pela infecção diminua a quantidade desses miRNAs para níveis indetectáveis. Isso significa que uma resposta inflamatória exacerbada leva a uma grande morte celular, com consequente diminuição dos níveis de miRNAs. Dados da literatura mostram que a ativação policlonal dos linfócitos durante a

infecção por *T. cruzi* promove a apoptose de células T. Além disso, antígenos liberados pelo *T. cruzi*, como a trans-sialidase e HSP70, induzem a apoptose de linfócitos (revisto por DosReis & Lopes, 2009). Rodrigues Jr. e colaboradores (2008) demonstraram que a apoptose que ocorre após estimulação de CMSP com antígenos derivados do *T. cruzi* é maior nos pacientes com cardiopatia chagásica comparados aos pacientes com a forma indeterminada. Portanto, as análises englobaram apenas os indivíduos não chagásicos e pacientes com a forma indeterminada. No entanto, essa diminuição dos níveis de miRNAs pode ter um significado biológico e não somente representar um problema técnico. Outros experimentos serão realizados para verificar essa hipótese. Além disso, análises alternativas utilizando os dados obtidos podem esclarecer outros aspectos da expressão desses miRNAs.

Comparada às CMSP de indivíduos saudáveis (calibrador), a expressão de miR20a na maioria dos pacientes apresentou-se elevada nas células não estimuladas e estimuladas com *T. cruzi*., enquanto no grupo controle foram observados baixos níveis de expressão desse miRNA (Figura 16). A expressão de miR20a nesses pacientes não diminuiu após infecção, embora seja clara a tendência dessa diminuição ( $p = 0,06$ ) (Figura 17). Esse padrão de expressão de miR20a sugere que ele participe da regulação pós-transcricional de IL-10 nos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas. De acordo com a literatura, miR20a está envolvido na regulação da proliferação celular em câncer de pulmão (Hayashita *et al.*, 2005) e leucemia mielóide crônica (Venturini *et al.*, 2007). Mas o seu possível papel na resposta inflamatória ainda não foi explorado.

Em relação ao calibrador, o perfil de expressão de miR106a mostrou-se mais heterogêneo nos indivíduos controle do que no grupo de pacientes, no qual a expressão desse miRNA apresentou-se elevada nas células não estimuladas e estimuladas por *T. cruzi* (Figura 18). De maneira interessante, a expressão de miR106a nos pacientes foi menor nas células estimuladas

quando comparadas às células não estimuladas (Figura 19). Dados da literatura mostram que miR106a é capaz de modular a expressão de IL-10, *in vitro*, de diferentes tipos celulares (Sharma *et al.*, 2009). Baseados nesses resultados podemos sugerir que miR106a é um importante modulador do gene da IL-10 nos pacientes com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas, visto que há uma diminuição na expressão desse miRNA após a infecção, condizente com o aumento da expressão de IL-10 observado nesses pacientes.

Finalmente, observamos baixos níveis de expressão de miR106b, comparado ao calibrador, em CMSP de indivíduos não chagásicos, infectadas ou não (Figura 20 A). Os níveis de miR106b foram mais elevados nas células não estimuladas na maioria dos pacientes, sendo que o mesmo não foi observado nas células estimuladas desse grupo (Figura 20 B). Não houve diferença na expressão de miR106b pelas células não estimuladas dos pacientes indeterminados, quando comparadas às células estimuladas, embora haja uma tendência a diminuir sua expressão após infecção ( $p = 0,06$ ) (Figura 21). Como sugerido para miR20a, o padrão de expressão apresentado por miR106b indica que ele participe da regulação pós-transcricional de IL-10 nos pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas. Então, os nossos resultados indicam que os três miRNAs analisados (miR20a, miR106a e miR106b) podem estar envolvidos na regulação pós-transcricional da IL-10 humana, diminuindo a modulação desta citocina nos pacientes com a forma clínica indeterminada. Porém mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Uma visão global dos diferentes mecanismos que potencialmente levam a uma resposta protetora ou patogênica na infecção humana pelo *T. cruzi* pode ser apreciada no artigo “Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease”, publicado no *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, (**Anexo 2**).

Os resultados apresentados neste trabalho trouxeram informações novas e relevantes referentes ao papel dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, e também sobre fatores relacionados à sinalização intracelular e à modulação gênica de citocinas na resposta imune contra o *T. cruzi*. Finalmente, este estudo abre uma série de questões a serem respondidas sobre quais os mecanismos que levam à proteção do hospedeiro ou ao desenvolvimento de patologia. Como perspectivas, algumas importantes perguntas devem ainda ser respondidas, tais como: (1) existe expressão preferencial de alguma região variável dentro das famílias  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  no TCR das células T DN? (2) se sim, isso acontece nos pacientes chagásicos com as diferentes formas clínicas e nos indivíduos não chagásicos? (3) as moléculas CD1a, b, c e d participam da apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos derivados do parasita às células T DN, influenciando, de forma distinta, a expressão de diferentes marcadores funcionais nestas células? (4) há uma participação preferencial de alguma dessas moléculas da família CD1 no processo de apresentação dos diferentes antígenos a essas populações celulares? (5) se sim, isso é semelhante ou diferente em pacientes chagásicos com e sem cardiopatia? (6) outras proteínas da família dos STATS encontram-se ativadas nas células dos pacientes? (7) se sim, isso é semelhante ou diferente em pacientes chagásicos com e sem cardiopatia e em indivíduos não chagásicos? (8) miR20a, miR106a e miR106b regulam a expressão de IL-10 nas células dos diferentes pacientes? (10) esses miRNAs são regulados de maneira distinta nos pacientes com as diferentes formas clínicas?

O conhecimento da biologia dos linfócitos T, como as células T DN, através do estudo de suas funções e características fenotípicas, como também o estudo dos mecanismos de controle de expressão de citocinas certamente contribuem para o entendimento da resposta imunológica envolvida na evolução das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, podendo trazer benefícios à população infectada.

## **7. Resumo dos Resultados e Conclusão**

Os principais resultados obtidos neste trabalho estão resumidos, de forma esquemática, na Figura 22, de acordo com a numeração a seguir:

- 1- A porcentagem de células  $T\alpha\beta$  DN e  $T\gamma\delta$  DN expressando CD69 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi*.
- 2- A porcentagem de células  $T\alpha\beta$  DN expressando CD28 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi*.
- 3- A porcentagem de células  $T\gamma\delta$  DN expressando Granzima A aumenta nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por *T. cruzi*.
- 4- As células  $T\alpha\beta$  DN estão mais comprometidas com a produção das citocinas próinflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17) em ambas as formas clínicas.
- 5- As células  $T\gamma\delta$  DN apresentam um destacado aumento na expressão de IL-10 antígeno-específica nos pacientes com a forma indeterminada quando comparados aos pacientes com cardiopatia dilatada e aos indivíduos controles.
- 6- Há uma correlação positiva entre a maior frequência de células  $T\gamma\delta$  DN expressando IL-10 com parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca nos pacientes ( $>$  LVEF,  $<$  LVDD).
- 7- A média de intensidade de fluorescência das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN (CD1a, CD1b, CD1c e CD1d) aumentou nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi*.
- 8- A razão MIF pNF $\kappa$ B / MIF pSTAT3 de linfócitos aumentou nos pacientes cardíacos após infecção por *T. cruzi*.

9- A expressão de miR106a pelas CMSP dos pacientes com a forma indeterminada diminui após infecção por *T. cruzi*.

Podemos concluir que as subpopulações de células T DN ( $TCR\alpha\beta+$  e  $TCR\gamma\delta+$ ) apresentam características funcionais distintas, associadas a um perfil de controle de expressão de citocinas diferente, frente ao estímulo com *Trypanosoma cruzi*, nos pacientes com as formas clínicas polares da doença de Chagas.

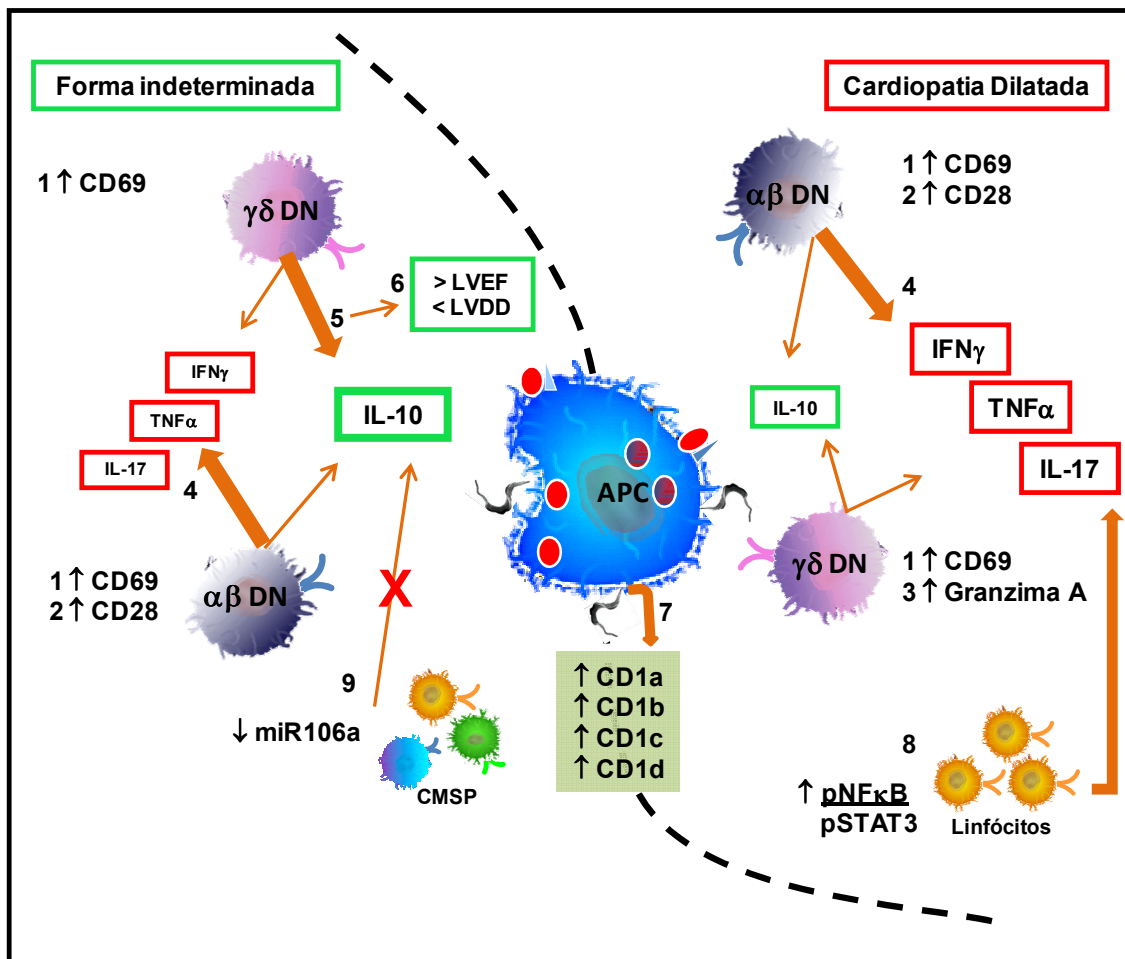


Figura 22: Esquema dos principais resultados obtidos neste trabalho. A porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN e T $\gamma\delta$  DN expressando CD69 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi* (1); A porcentagem de células T $\alpha\beta$  DN expressando CD28 aumenta nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi* (2); A porcentagem de células T $\gamma\delta$  DN expressando Granzima A aumenta nos pacientes com cardiopatia dilatada após infecção por *T. cruzi* (3); As células T  $\alpha\beta$  DN estão mais comprometidas com a produção das citocinas próinflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17) em ambas as formas clínicas (4); As células T  $\gamma\delta$  DN apresentam um destacado aumento na expressão de IL-10 antígeno-específica nos pacientes com a forma indeterminada quando comparados aos pacientes com cardiopatia dilatada e aos indivíduos controles (5); Há uma correlação positiva entre a maior frequência de células T  $\gamma\delta$  DN expressando IL-10 com parâmetros clínicos de melhor prognóstico da função cardíaca nos pacientes (> LVEF, < LVDD) (6); A média de intensidade de fluorescência das moléculas apresentadoras de antígenos às células T DN (CD1a, CD1b, CD1c e CD1d) aumentou nos pacientes chagásicos após infecção por *T. cruzi* (7); A razão MIF pNF $\kappa$ B / MIF pSTAT3 de linfócitos aumentou nos pacientes cardíacos após infecção por *T. cruzi* (8); A expressão de miR106a pelas CMSP dos pacientes com a forma indeterminada diminui após infecção por *T. cruzi* (9).

## **8. Referências Bibliográficas**

Abel, L.C.J., Kalil, J., Cunha-Neto, E. (1997). Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 1305-1308.

Albareda, M. C., S. A. Laucella, M. G. Alvarez, A. H. Armenti, G. Bertochi, R. L. Tarleton, and M. Postan. (2006). *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18, 465-471.

Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843–854.

Ambros, V.(2004). The functions of animal microRNAs. *Nature.* 431, 350-355.

Andrade, Z.A. (1999). Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 71-80.

Antonelli, L.R.V. Caracterização das células T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> e avaliação da contribuição de diferentes populações celulares na imunorregulação da leishmaniose cutânea humana. *Tese de Doutorado*, 2005.

Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Gollob, K.J. (2004). Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin. Exp. Immunol.* 136(2), 341-348.

Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., Oliveira, R.R., Torres, K.C.L., Guimarães, L.H., Bacellar, O., Gollob, K.J. (2006). Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 74, 6317-6323.



Autran, B., Leblond, V., Sadat-Sowti, B., Lefranc, E., Got, P., Sutton, L., Binet, J.L., Debre, P. (1991). A soluble factor released by CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 77, 2237-2241.

Azuma, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1992). CD28 co-stimulation of T cell mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 7, 33-39.

Azuma, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1993). CD28<sup>-</sup> T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J. Immunol.* 150(4), 1147-1159.

Bacellar, O., Faria, D., Nascimento, M., Cardoso, T.M., Gollob, K.J., Dutra, W.O., Scott, P., Carvalho, E.M. (2009). IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J. Infect, Dis.* 200(1), 75-78.

Barcán, L., Luna, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissio, A.M., Gadano, A., García, M.M., de Santibañes, E., Riarte, A. (2005). Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transpl.* 11(9), 1112-1116.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and function. *Cell.* 116, 281-297.

Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T., Brenner, M.B. (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta + T cells. *Nature* 372, 691-694.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.

Bolin, D.R., Swain, A.L., Sarabu, R., Berthel, S.J., Gillespie, P., Huby, N.J., Makofske, R., Orzechowzki, L., Perrotta, A., Toth, K., Cooper, J.P., Jiang, N., Falcioni, F., Campbell, R., Cox, D., Gaizband, D., Belunis, C.J., Vidovic, D., Ito, K., Crowther, R., Kammlott, U., Zhang, X., Palermo, R., Weber, D., Guenot, J., Nagy, Z., Olson, G.L. (2000). Peptide and peptide mimetic

inhibitors of antigen presentation by HLA-DR class II MHC molecules. Design, structure-activity relationships, and X-ray crystal structures. *J. Med. Chem.* 43 (11), 2135-2148.

Borges, J.D., Machado-de-Assis, G.F., Gomes, L.V., Dias, J.C., Pinto, I.D., Martins-Filho, O.A., Torres, R.M., Vinas, P.A., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L., Lana, M. (2006). Seroprevalence of Chagas disease in schoolchildren from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil; six years following the onset of epidemiological surveillance. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 48(2), 81-86.

Bottrel, R.L., Dutra, W.O., Martins, F.A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Neto, M., Barral, A., Almeida, R.P., Mayrink, W., Locksley, R., Gollob, K.J. (2001). Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 69, 3232-3239.

Brener, Z. (1971). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 13 (3), 171-180.

Brener, Z., Gazzinelli, R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114, 103-110.

Buscaglia, C.A., Di Noia, J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection.* 5, 419-427.

Calin, G.A., Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Cancer Reviews.* 6, 857-866.

Caveno, J., Zhang, Y., Motyka, B., Teh, S-J., The, H-S. (1999) Functional similarity and differences between selection-independent CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> αβ T cells and positively selected CD8 T cells expressing the same TCR and the induction of anergy in CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> αβ T cells in antigen-expressing mice. *J. Immunol.* 163, 1222-1229.

Chambers, C.A., Allison, J.P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 396-404.

Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 33(20), 1-9.

Chen, K., Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Genetics Reviews.* 8, 93-103.

Chowdhury, D., Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 389-420.

Chuang, J.C., Jones, P.A. (2007). Epigenetics and MicroRNAs. *International Pediatric Research Foundation.* 61(5), 24-29.

Coffman, R.L. (2006). Related Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol.* Jun;7(6):539-541.

Correa-Oliveira, R., Gomes, J.A.S., Lemos, E.M., Cardoso, G.M., Reis, D.D., Adad, S., Crema, E., Martins-Filho, O.A., Rocha, M.O.C., Gazzinelli, G., Bahia-Oliveira, L.M.G. (1999). The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 253-255.

Costa, G.C., Rocha, M.O.C., Moreira, P.R., Menezes, C.A.S., Silva, M.R., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2009). Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases* 199, 451-454.

Cunha-Neto, E., Dzau, V.J., Allen, P.D., Stamatiou, D., Benvenuto, L., Higuchi, M.L., Koyama, N.S., Silva, J.S., Kalil, J., Liew, C. (2005). Cardiac gene expression profiling provides evidence

for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J. Pathology* 167, 305-313.

Cunha-Neto, E., Moliterno, R., Coelho, V., Guilherme, L., Bocchi, E., Higuchi, Mde.L., Stolf, N., Pileggi, F., Steinman, L., Kalil, J. (1994). Restricted heterogeneity of T cell receptor variable alpha chain transcripts in hearts of Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Parasite Immunol.* 16(4), 171-179.

Cunha-Neto, E., Rizzo, L.V., Albuquerque, F., Abel, L., Guilherme, L., Bocchi, E., Bacal, F., Carrara, D., Ianni, B., Mady, C., Kalil, J. (1998). Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' Disease cardiomyopathy. *Braz. J. Med. Biol Research.* 31, 133-137.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J.S., Zurawski, S.M., Lecron, J., Mohan-Peterson, S., Sanjanwala, B., Bennett, B., Silver, J., de Vries, J.E., Yssel H., Terhorst, C. (1995). Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>0, T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int. Immunol.* 7, 1405-1416.

Dias, J.C., Coura, J.R. (1997). Epidemiologia. In: clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Eds: Dias, JC & Coura, JR, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.*

Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Borges, E.C., Moreira, E.F., Gontijo, C., Azeredo, B.V.M. (2002). Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação clínico-epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35:167-176.

DosReis, G.A., Lopes, M.F. (2009). The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 259-262.

Dutra, W.O., Colley, D.G., Pinto-Dias, J.C., Gazzinelli, G., Brener, Z., Pereira, M.E.S., Coffman, R.L., Correa-Oliveira, R., Carvalho-Parra, J.F. (2000). Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5<sup>+</sup> B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand. J. Immunol.* 51, 91-97.

Dutra, W.O., Correa-Oliveira, R., Dunne, D., Cecchini, L.F., Fraga, L., Roberts, M., Soares-Silveira, A.M., Webster, M., Yssel, H., Gollob, K.J. (2002). Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-producer schistosomiasis patients. *BMC Immunol.* 6, 3-8.

Dutra, W. O., Gollob, K.J. (2008). Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21, 287-292.

Dutra, W.O., Gollob, K.J., Pinto-Dias, J.C., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R., Coffman, R.L., Carvalho-Parra, J.F. (1997). Cytoquine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand. J. Immunol.* 45, 74-80.

Dutra, W.O., Martins-Filho, O.A., Cançado, J.R., Pinto-Dias, J.C., Brener, Z., Freeman Junior, G.L., Colley, D.G., Gazzinelli, G., Parra, J.C. (1994). Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* 6 (4), 499-506.

Dutra, W.O., Martins-Filho, O.A., Cançado, J.R., Pinto-Dias, J.C., Brener, Z., Gazzinelli, G., Carvalho, J.R., Colley, D.G. (1996). Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 6(4), 499-506.

Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Villani, F.N.A., Costa, G.C., Silveira, A.B.M., Reis, D.A., Gollob, K.J. (2009). Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 208-218.

Dutra, W.O., Rocha, M.O.C., Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology.*

Dutronc, Y.; Porcelli, S.A. (2002). The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens*. 60. 337-353.

Ferreira, R.C., Ianni, B.M., Abel, L.C., Buck, P., Mady, C., Kalil, J., Cunha-Neto, E. (2003). Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(3), 407-411.

Filaci, G., Suciú-Foca, N. (2002). CD8<sup>+</sup> T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* 1(5), 279-283.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170 (6) 2081-2095.

Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M., Kunschughart, L., Schmidt, C.A., Andreesen, R., Mackensen, A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> double-negative regulatory T cells. *Blood* 105, 2828-2835.

Frauwirth, K.A., Thompson, C.B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109(3), 295-299.

Gartel, A.L., Kandel, E.S. (2006). RNA interference in cancer. *Biomolecular Engineering*. 23, 17-32.

Gaze, S.T., Dutra, W.O., Lessa, M., Lessa, H., Guimaraes, L.H., Jesus, A.R., Carvalho, L.P., Machado, P., Carvalho, E.M., Gollob, K.J. (2006). Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand. J. Immunol.* 63(1), 70-78.

Gazzinelli, R.T., Gazzinelli, G., Cançado, J.R., Cardoso, J.E., Brener, Z., Colley, D.G. (1990). Two modes of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas' disease: correlations with clinical forms of infection. *Res. Immunol.* 141 (8), 757-770.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* 2, 309-322.

Gollob, K.J., Antonelli, L.R., Dutra, W.O. (2005). Insights into CD4<sup>+</sup> memory T cells following Leishmania infection. *Trends Parasitol.* 21(8), 347-350.

Gomes, C.C., Gomez, R.S. (2009). MicroRNA and oral cancer: Future perspectives. *Oral Oncology.* 44, 910-914.

Gomes, J.A.S., Bahia-Oliveira, L.M.G., Rocha, M.O.C., Martins-Filho, O.A., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' Disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity* 71, 1185-1193.

Groh, V., Fabbi, M., Hochstenbach, F., Maziarz, R.T., Strominger, J.L. (1989). Double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86, 5059-5063.

Guo, Y., Ziegler, H.K., Safley, S.A., Niesel, D.W., Vaidya, S., Klimpel, G.R. (1995). Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TCR alpha beta + and TCR gamma delta + T cells. *Infect. Immun.* 63, 2288-2294.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 186(9), 1407-1418.

Harding, F., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents the induction of anergy in T cell clones. *Nature* 356, 607-609.

Harfe, B.D. (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 410-415.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6, 1123-1132.

Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J., Marrack, P. (1983). The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 157, 1149-1169.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S. and Yatabe, Y. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628–9632.

Hedrich, C.M., Bream, J.H. (2010). Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunol. Res.* 47(1-3), 185-206.

Higuchi, M.L., Benvenuti, L.A., Reis, M.M., Metzger, M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Card. Research* 60, 96-107.

Higuchi, M.L., Reis, M.M., Aiello, V.D., Benvenuti, L.A., Gutierrez, P.S., Bellotti, G., Pileggi, F. (1997). Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(5), 485-489.

Ihle, J.N. (2001). The STAT family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology.* 13, 211-217.



Illum, N., Ralfkiaer, E., Pallesen, G., Geisler, C. (1991). Phenotypical and functional characterization of double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) αβ T-cell receptor positive cells from an immunodeficient patient. *Scand. J. Immunol.* 34, 635-645.

Jarvis, J.N., Kaplan, J., Fine, N. (1992). Increase in CD5<sup>+</sup> B cells in juvenile rheumatoid arthritis. Relationship to IgM rheumatoid factor expression and disease activity. *Arthritis Rheum.* 35(2), 204-207.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A. (2005). RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell.* 120(5), 635–647.

Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell.* 76, 253-262.

Kolls, J.K., Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467–476.

Kronenberg, M., Engel, I. (2007). On the road: progress in finding the unique pathway of invariant NKT cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 19(2), 186-193.

Krummel, M.F., Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182, 459-465.

Krutzik, P.O., Hale, M.B., Nolan, G.P. (2005). Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. *Journal of Immunology.* 175, 2366-2373.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for small expressed RNAs. *Science.* 294 (5543), 853-858.

Lanier, L.L., Buck, D.W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., Phillips, J.H. (1988). Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* 167(5), 1572-1585.

Lanier, L.L., Weiss, A. (1986). Presence of Ti (WT31) negative T lymphocytes in normal blood and thymus. *Nature* 324, 268-270.

Lao, K., Xu, N.L., Sun, Y.A., Livak, K.J., Straus, N.A. (2007). Real Time PCR profiling of 330 human micro-RNAs. *Biotechnol J.* 2(1), 33-35.

Leiby, D.A., Lenes, B.A., Tibbals, M.A., Tames-Olmedo, M.T. (1999). Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* 341 (16), 1237-1239.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233-258.

Lewis, D.E., Ng Tang, D.S., Wang, X., Kozinetz, C. (1999). Costimulatory pathways mediate monocyte-dependent lymphocyte apoptosis in HIV. *Clinical Immunology* 90(3), 302-312.

Linden, A., Laan, M., Anderson, G.P. (2005). Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur. Respir. J.* 25, 159-172.

Linsley, P.S., Ledbetter, J.A. (1993). The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 191-212.

Liuzzo, G., Kopecky, S.L., Frye, R.L., O'Falon, W.M., Maseri, A., Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (1999). Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 100, 2135-2139.

Livak, K.J., Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 25, 402-408.

Londei, M., Verhoef, A., De Berardinis, P., Kissonerghis, M., Grubeck-Loebenstien, B., Feldmann, M. (1989). Definition of a population of CD4<sup>+</sup> T cells that express the alpha beta T-cell receptor and respond to interleukins 2, 3, and 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (21), 8502-8506.

Lovett-Racke, A.E., Trotter, J.L., Lauber, J., Perrin, P.J., June, C.H., Racke, M.K. (1998). Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest*. 101(4), 725-730.

Mankan, A.K., Lawless, M.W, Gray, S.G., Kelleher, D., McManus, R. (2009). NF $\kappa$ B regulation: the nuclear response. *J. Cell. Mol. Med*. 13(4), 631-643.

Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simões, M.V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 115, 1109-1123.

Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., Martin, R. (2001). CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest*. 108, 1185-1194.

Marodon, G., Warren, D., Filomio, M.C., Posnett, D.N. (1999). Productive infection of double-negative T cells with HIV *in vivo*. *P.N.A.S.* 96(21), 11958-11963. Marodon, G., Warren, D., Filomio, M.C., Posnett, D.N. (1999). Productive infection of double-negative T cells with HIV *in vivo*. *P.N.A.S.* 96(21), 11958-11963.

Martens, P.B., Goronzy, J.J., Schaid, D., Weyand, C.M. (1997). Expansion of unusual CD4<sup>+</sup> T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Reum.* 40, 1106-1114.

Matsukawa, A. (2007). STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. *Act. Med. Okayama*. 61, 239-245.

Mendes-da-Cruz, D.A., de Meis, J., Cotta-de-Almeida, V., Savino, W. (2003). Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect.* 5, 824–831.

Menezes, C.A.S. Linfócitos T na doença de Chagas humana: estudo funcional de células CD28<sup>+</sup> e CD28<sup>-</sup> e análise do repertório TCR de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> provenientes de pacientes portadores de diferentes formas clínicas. *Tese de Doutorado*, 2006.

Menezes C.A.S., Rocha, M.O., Souza, P.E., Chaves, A.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2004). Phenotypic and functional characteristics of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin. Exp. Immunol.* 137, 129-138.

Metkar S.S., Menea C., Pardo J., Wang B., Wallich R., Freudenberg M., Kim S., Raja S.M., Shi L., Simon M.M., Froelich C.J. (2008). Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity*. 29, 720-733.

Minoprio, P., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B cell responses. *Scand. J. Immunol.* 24, 661-668.

Moncayo, A. (2003). Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional in the Southern Cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 577-591.

Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T.R. (1993). Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 165-190.

Moosing, F., Csernok, E., Wang, G., Gross, W.L. (1998). Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 114(1), 113-118.

Nagib, P.R., Dutra, W.O., Chiari, E., Machado, C.R. (2007) *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD4-CD8- T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp. Parasitol.* 116(4). 366-374.

Nakajima, T., Goek, O., Zhang, X., Kopecky, S.L., Frye, R.L., Goronzy, J.J., Weyand, C.M. (2003). De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ. Res.* 93, 106-113.

Nakayasu, E.S., D.V. Yashunsky, L.L. Nohara, A.C. Torrecilhas, A.V. Nikolaev, and I.C. Almeida. (2009). GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Syst Biol.* 5, 261.

Ohga, S., Nomura, A., Takahata, Y., Ihara, K., Takada, H., Wakiguchi, H., Kudo, Y., Hara, T. (2002). Dominant expression of interleukin 10 but not interferon  $\gamma$  in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>  $\alpha\beta$  T cells of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* 119, 535-538.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., Kastelein, R.A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.

O'Sullivan, L.A., Liongue, C., Lewis, R.S., Stephenson, S.E.M., Ward, A.C. (2007). Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Molecular Immunology.* 44, 2497-2506.

Pacheco, L.K., Scholl, D., Soares, M., Murta, S.M.F., Romanha, A.J., Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C., Steindel, M. (2005). Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from an acute outbreak of human Chagas disease in Santa Catarina state, southern Brazil. *Programa da XXI Reunião Annual da SBPZ – XXXII Reunião para Pesquisa Básica em Doença de Chagas – Internacional Symposium on Vesicle Trafficking in Parasitic Protozoa*. 07-09 Nov. Pp. 119.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*. 6, 1133–1141.

Patel, S.S., Wacholtz, M.C., Duby, A.D., Thiele, D.L., Lipsky, P.E. (1989). Analysis of the functional capabilities of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> human T cell clones. *J. Immunol*. 143, 1108-1117.

Plasterk, R.H. (2006). Micro RNAs in animal development. *Cell*. 124, 877-881.

Porcelli, S., Brenner, M.B., Greenstein, J.L., Balk, S.P., Terhorst, C., Bleicher, P.A. (1989). Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> cytolytic T lymphocytes. *Nature*. 341, 447-450.

Priatel, J.J., Utting, O., The, H.S. (2001). TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol*. 167:6188.

Prince, H.E., Jensen, E.R. (1991). HIV-related alterations in CD8 cell subsets defined by in vitro survival characteristics. *Cell Immunol*. 134(2), 276-286.

Procopio, D.O., Almeida, I.C., Torrecilhas, A.C., Cardoso, J.E., Teyton, L., Travassos, L.R., Bendelac, A., Gazzinelli, R.T. (2002). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKT cell pathway. *J Immunol*. 169, 3926-3933.

Reis, D.D., Jones, E.M., Tostes, S., Gazzinelli, G., Colley, D.G., McCurley, T. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 43, 637-644.

Ribeiro-dos-Santos, R., Rossi, M.A., Laus, J.L., Silva, J.S., Savino, W., Mengel, J. (1992). Anti-CD4 abrogates ejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 175(1), 29-39.

Rocha, M.O.C., Ribeiro, A.L.P., Teixeira, M.M. (2003). Clinical management of chronic chagas cardiomyopathy. *Front. In Biosci.* 8 (1), 44-54.

Rocha, M.O.C., Teixeira, M.M., Ribeiro, A.L. (2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5, 727-743.

Rodrigues Jr., V., Agrelli, G.S., Leon, S.C., Teixeira, D.N.S., Tostes Jr., S., Rocha-Rodrigues, D.B. (2008). Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes and Infection.* 10, 29-37.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genoma Research.* 14 (10A), 1902-1910.

Romero, V., Andrade, F. (2008). Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens.* 71(5), 409-416.

Sancho, D., Gómez, M., Sánchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology* 26(3), 136-140.

Sancho, D., Santis, A.G., Alonso-Lebrero, J.L., Viedma, F., Tejedor, R., Sanchez-Madrid, F. (2000). Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. *J. Immunol.* 165, 3868-3875.

Sardinha, L.R., Elias, R.M., Mosca, T., Bastos, K.R.B., Marinho, C.R.F., Lima, M.R.D., Álvarez, J.M. (2006). Contribution of NK, NK T,  $\gamma\delta$  T, and  $\alpha\beta$  T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 74(4), 2031-2042.

Schmittgen, T., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR by the comparative Ct method. *Nature Protocols*. 3(6), 1101-1108.

Sharma, A., Kumar, M., Aich, J., Hariharan, M., Brahmachari, S.K., Agrawal, A., and Ghosh, B. (2008). Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *PNAS*. 106(14), 5761-5766.

Shivakumar, S., Tsokos, G.C., Datta, S.K. (1989). T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) and CD4<sup>+</sup> T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* 143, 103-112.

Shresta, S., Pham, C.T.N., Thomas, D.A., Graubert, T.A., Ley, T. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current Opinion in Immunology* 10, 581-587.

Sieling, P.A., Porcelli, S.A., Duong, B.T., Spada, F., Bloom, B.R., Diamond, B., Hahn, B.H. (2000). Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c. *J. Immunol.* 165, 5338-5344.

Slack, F.J., Esquela-Kerscher, A. (2006). Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6, 259-269.

Souza, P.E.A. Alterações fenotípicas e funcionais em monócitos e linfócitos de pacientes chagásicos indeterminados e cardíacos após infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi*. *Tese de Doutorado*, 2003.



Souza, P.E.A., Rocha, M.O.C., Rocha-Vieira, E., Menezes, C.A.S., Chaves, A.C.L., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' Disease distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infection and Immunity* 72, 5283-5291.

Souza, P.E.A., Rocha, M.O.C., Menezes, C.A.S., Coelho, J.S., Chaves, A.C.L., Gollob, K.J., Dutra, W.O. (2007). *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. Immunol.* 75 (4), 1886-1894.

Spada, F.M., Grant, E.P., Peters, P.J., Sugita, M., Melian, A., Leslie, D.S., Lee, H.K., Van, D.E., Hanson, D.A., Krensky, A.M., Majdic, O., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Brenner, M.B. (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J. Exp. Med.* 191, 937-948.

Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22, 285-294.

Starr, T.K., Jameson, S.C., Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 21, 139-176.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10, 39-49.

Tarleton, R.L., Koller, B.H., Latour, A., Postan, M. (1992). Susceptibility of  $\beta$ 2 microglobulin deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* 356(6367), 338-340.

Tarleton, R.L., Grusby, M.J., Zhang, L. (2000). Increased susceptibility of stat4-deficient and enhanced resistance in stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology.* 165, 1520-1525.

Trapani, J.A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology*. 2 (12), 3014.1-3014.7.

Ulrichs, T., Moody, D.B., Grant, E., Kaufmann, S.H., Porcelli, S.A. (2003). T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 71, 3076-3087.

Vallabhapurapu, S., Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733.

Vallejo, A.N., Nestel, A.R., Schirmer, M., Weyand, C.M., Goronzy, J.J. (1998). Aging-related deficiency of CD8 expression in CD4<sup>+</sup> T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity. *J. Biol Chem.* 273, 8119-8129.

Van Deuren, M., Dofferhoff, A.S., van der Meer, J.W. (1992). Cytokines and the response to infection. *J. Pathol.* 168 (4), 349-356.

Venturini, L., Battmer, K., Castoldi, M., Schultheis, B., Hochhaus, A. Muckenthaler, M.U., and Ganser, A. (2007). Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34<sup>+</sup> cells. *Blood*. 109, 4399–4405.

von Boehmer, H., Kisielow, P. (1993). Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell*. 73(2), 207-208.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J. Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405-413.

Wiemer, E.A.C. (2007). The role of microRNAs in cancer: No small matter. *European Journal of Cancer*. 43, I529-I544.

World Health Organization, Geneva. (2002). Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series. 1-109.

Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., Armitage, R.J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 155, 5483-5486.

Zajonc, D.M., Kronenberg, M. (2007). CD1 mediated T cell recognition of glycolipids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17(5). 521-529.

Zhang, H.H., Wang, X.J., Li, G.X., Yang, E., Yang, N.M. (2007). Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 13, 2883-2888.

Ziegler, S.F, Ramsdell, F., Hjerrild, K.A., Armitage, R.J., Grabstein, K.H., Hennen, K.B., Farrah, T., Fanslow, W.C., Shevach, E.M., Alderson, M.R. (1993). Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur. J. Immunol.* 23(7), 1643-1648.

Zuckermann, F.A. (1999). Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 72, 55-66.

# ANEXO 1

## *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease<sup>∇</sup>

Fernanda Nobre Amaral Villani,<sup>1</sup> Manoel Otávio da Costa Rocha,<sup>2</sup> Maria do Carmo Pereira Nunes,<sup>2</sup> Lis Ribeiro do Valle Antonelli,<sup>3</sup> Luisa Mourão Dias Magalhães,<sup>1</sup> Janete Soares Coelho dos Santos,<sup>1</sup> Kenneth J. Gollob,<sup>4,5,6</sup> and Walderez O. Dutra<sup>1,6\*</sup>

Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais,<sup>1</sup> and Infectious Diseases and Tropical Medicine Graduate Course, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais,<sup>2</sup> Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; Instituto Oswald Cruz, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>3</sup>; SRI International, Biosciences Division, Center for Infectious Disease Research, Menlo Park, California<sup>4</sup>; Graduate Program in Biosciences and Medicine, Santa Casa Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>5</sup>; and INCT-DT, Brazil<sup>6</sup>

Received 22 February 2010/Returned for modification 29 March 2010/Accepted 27 July 2010

CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (double-negative [DN]) T cells have recently been shown to display important immunological functions in human diseases. They express  $\gamma\delta$  or  $\alpha\beta$  T-cell receptors that recognize lipid/glycolipid antigens presented via the nonclassical major histocompatibility complex molecules of the CD1 family. We recently demonstrated that while  $\alpha\beta$  DN T cells serve primarily to express inflammatory cytokines,  $\gamma\delta$  DN T cells express mainly interleukin-10 (IL-10) in patients with cutaneous leishmaniasis. We also demonstrated a correlation between DN T cells and the expression of gamma interferon in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. In this work, we sought to investigate whether  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells display distinct immunoregulatory potentials in patients with polar forms of human Chagas' disease. Our data showed that *in vitro* infection with *T. cruzi* leads to expansion of DN T cells in patients with the indeterminate and severe cardiac clinical forms of the disease. However, while  $\alpha\beta$  DN T cells primarily produce inflammatory cytokines in both forms of the disease,  $\gamma\delta$  DN T cells display a marked, significant increase in antigen-specific IL-10 expression in indeterminate patients relative to cardiac patients. Finally, higher frequencies of the IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells were correlated with improved clinical measures of cardiac function in the patients, suggesting a protective role for these cells in Chagas' disease. Taken together, these data show distinct functional characteristics for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  DN T cells associated with distinct morbidity rates and clinical forms in human Chagas' disease.

T-cell activation is a key event in the establishment of immune responses directed toward intracellular pathogens. Depending on the functional capacity of the activated T cells, the fate of the infection may take different paths either toward a protective or a pathogenic outcome. While it is important that a strong, activated immune response is elicited early on in the infection in order to eliminate (or control) the pathogen, the further control of this activation is necessary to reestablish homeostasis, avoiding tissue damage (17, 25).

One hallmark of most parasitic infections is that the great majority of individuals are able to trigger innate immunity and elicit an activated T-cell response during the acute infection, leading to the control of the parasite and establishment of a chronic infection. Interestingly, while many individuals develop severe forms of parasitic diseases once infection progresses to the chronic phase, most patients develop relatively mild forms, allowing for a host-parasite coexistence. One such example is observed upon human infection with the protozoan parasite

*Trypanosoma cruzi*, which leads to Chagas' disease. As a result of thousands of years of coevolution between human host and the parasite (6), most infected individuals develop an asymptomatic, or "indeterminate" (I), form of Chagas' disease. This form is characterized by a lack of clinical signs and symptoms and has been associated predominantly with a modulatory cellular immune response based on cytokine profiles and down-regulatory molecule expression (5, 20, 48, 49, 51). Chronic patients may also develop symptomatic clinical forms, mainly with digestive or cardiac alterations. Differential geographical prevalence of Chagas' disease clinical forms has been reported. In Brazil, 15 to 30% of Chagas' patients display the cardiac form, which is present in 20 states, while the digestive cases, observed in about 10% of infected individuals, have been reported in four states in the central region of the country (53). The digestive form is frequently found in Chile but is practically absent in Central America (42). These geographical differences might be related, in part, to host genetics and immune responses of local human populations, but it is believed that they are also related to the genetic diversity of *T. cruzi* strains (11). Different strains of parasite display tropism for different tissues, and, thus, an important factor determining the clinical course of disease might be the specific pool of infecting clones and their specific tropisms (29). However, a possible role for environmental, nutritional, and immunological aspects of the

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Bloco N3, Sala 302, Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil. Phone: 55 31 34092809. Fax: 55 31 34092655. E-mail: waldutra@gmail.com.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 9 August 2010.

host cannot be discounted. While digestive and cardiac forms present significant morbidity, the cardiac form is the one associated with highest mortality. It is caused by neuronal and cardiomyocyte damage, ultimately resulting in ventricular dilation and subsequent functional heart failure, which can lead to death (44). Cardiac patients display a T-cell-mediated inflammatory response *in situ* (13, 24, 41), which is responsible for the pathology; this inflammatory profile is also observed in circulating activated T cells found at high frequencies in these patients (2, 16, 19, 32). Although it is clear that a plethora of parasite and host factors influences the clinical outcome of Chagas' disease, recent studies have suggested that activation of functionally distinct T-cell populations in *T. cruzi*-infected individuals may be responsible for the establishment of different clinical forms (17, 20). Thus, identifying these populations and the factors responsible for their activation will be critical for driving immune-based interventions to prevent pathology.

While the great majority of T cells express either the CD4 or the CD8 molecules, which are important for stabilizing the peptide-major histocompatibility complex (MHC) complex and which favor T-cell activation, a minority population of T cells that do not express CD4 or CD8 molecules has been identified in humans (8, 10, 27, 37). These double-negative (DN) T cells have been shown to be important sources of immunoregulatory cytokines in human leishmaniasis (4), to display modulatory functions (38), but also, under different circumstances, to display cytolytic activity (10, 36). A subpopulation of DN T cells is activated through the engagement of  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  T-cell receptors (TCRs) in the recognition of nonclassical MHC molecules of the CD1 family, presenting lipid or glycolipid antigens (36). This particular lipid/glycolipid antigenic recognition, as well as the immunoregulatory potential and susceptibility to chronic stimulation of these cells, highlights the important role these cells play in parasitic infections.

In our work with Bottrel et al., we determined that DN lymphocytes were the second most prevalent cell type producing gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) in human cutaneous leishmaniasis and that this IFN- $\gamma$  production was seen after short-term cultures with medium alone, as well as after stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA) (9). The novel work of Antonelli et al. went on to demonstrate that DN T cells composed of two different cell populations are present in the blood of individuals infected with *Leishmania braziliensis* and that DN T cells expressing the  $\alpha\beta$  TCR displayed a profile consistent with activation of leishmanicidal and inflammatory activities (higher IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ]) while the DN subpopulation expressing  $\gamma\delta$  TCR had a modulatory potential via higher production of interleukin-10 (IL-10) (4). Interestingly, IFN- $\gamma$  production has been associated with pathogenic responses in human leishmaniasis in more than one clinical form (3, 7, 22). We recently demonstrated that rats infected with the CL-Brenner clone of *T. cruzi* displayed a marked increase in the frequency of circulating DN T cells during the acute phase of infection (33). Taken together, these data led to the question of the role that DN T-cell subpopulations play in the clinical dichotomy of chronic human Chagas' disease.

To answer these questions, we investigated the immunoregulatory potential of DN T cells in patients with the two polar forms of Chagas' disease: indeterminate (I) and dilated cardiac (DC). Our data demonstrated that although no quan-

titative differences were seen with regard to the nonstimulated frequency of DN  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell subpopulations between patients and nonchagasic individuals, *in vitro* infection with trypomastigote forms of *T. cruzi* induced a marked increase in the frequency of these cells from chagasic patients. Moreover, the expanded  $\alpha\beta$  DN T cells displayed a greater inflammatory potential from cardiac patients than from indeterminate patients. This was accompanied by a greater down-modulatory ratio of IL-10 to inflammatory cytokine frequencies by  $\gamma\delta$  DN T cells from individuals with indeterminate disease, suggesting distinct roles for these cells in modulating the response in chronic Chagas' disease. Finally, we observed a correlation between higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells and improved clinical measures of cardiac function, suggesting a protective role for these cells in human Chagas' disease. These data indicate that functionally distinct DN T cells are present in Chagas' disease patients and that they are associated with the resulting morbidity of the disease.

#### MATERIALS AND METHODS

**Patients.** This study employed a cross-sectional design involving patients from areas of endemicity within Minas Gerais, Brazil, under the medical care of Manoel O. D. C. Rocha. A total of 12 patients with positive specific serology for *T. cruzi*, within the chronic phase of the disease, and with well-defined clinical forms were enrolled in this study. Detailed evaluations, including physical examinations, electrocardiograms, chest X rays, and echocardiograms were performed in order to classify patients into different groups as previously defined by us (43). Clinical groups were assigned as follows: the I group ( $n = 7$ ), consisting of patients who did not present with any clinical manifestations or alterations upon clinical, radiological, and echocardiographic examination; the DC group ( $n = 5$ ), consisting of patients who presented with right and/or left ventricular dilation, global left ventricular dysfunction, and alterations in the cardiac electric impulse generation and conduction. In the latter group, the alterations were evident in electrocardiograms, chest X rays, and echocardiography, which showed the occurrence of heart enlargement in all cardiac patients analyzed. Left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular diastolic diameter (LVDD) were used as clinical parameters of ventricular function for the Chagas' patients (44). We also included in our analysis individuals without Chagas' disease (nonchagasic group [N];  $n = 7$ ), as determined by negative specific serological tests for Chagas' disease. Individuals with the digestive form of Chagas' disease were not included in this study due to low incidence of well-documented cases in our geographical location in Brazil. Characteristics of the study groups are summarized in Table 1. We excluded from our study individuals with any other chronic inflammatory diseases, valvular heart disease, coronary artery disease, arterial hypertension, diabetes mellitus, alcoholism, and bacterial infections. All individuals included in this work were volunteers, and treatment and clinical care were offered to all patients, as needed, despite their enrollment in this research project. This study is part of an extended project evaluating risk factors for cardiac damage/involvement in Chagas' disease, which has the approval of the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (COEP-UFMG-ETIC006/05) and is in accordance with the Helsinki Declaration. Peripheral blood was collected by venipuncture, and informed consent was obtained from all individuals.

**Parasites.** Trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* were grown in Vero or L929 cell lines, as previously performed by us (49). Briefly, cells were infected with 10 trypomastigotes/cell and, after free trypomastigotes were removed by washing with culture medium, were maintained in RPMI medium enriched with 5% fetal calf serum and antibiotics (penicillin, 500 U/ml; streptomycin, 0.5 mg/ml) for approximately 5 days. After this period, trypomastigotes ruptured the cells and were collected from the supernatant. The contamination with amastigote forms was always below 3%. Parasites obtained in such a manner were used for infecting blood cells from patients and nonchagasic individuals.

**Infection of blood cells from patients and nonchagasic individuals with *T. cruzi* trypomastigotes.** Infection of peripheral blood cells was performed using 10 trypomastigotes/cell, as previously described (49). Briefly, cells and parasites were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for a period of 3 h. After this time, cells were washed by centrifugation with phosphate-buffered saline (PBS) for removal of free trypomastigotes. After centrifugation, the supernatant was removed, and a

TABLE 1. Individuals analyzed in the study and their clinical status

Patient no.	Serology for Chagas' disease	Clinical form	Age (yr)	Sex	LVEF (%)	LVDD (mm)
N1	Negative		43	Female		
N2	Negative		27	Female		
N3	Negative		23	Female		
N4	Negative		31	Female		
N5	Negative		21	Male		
N6	Negative		19	Male		
N7	Negative		20	Male		
I1	Positive	Indeterminate	55	Male	60	55
I2	Positive	Indeterminate	38	Female	70	52
I3	Positive	Indeterminate	50	Female	68	50
I4	Positive	Indeterminate	34	Female	67	46
I5	Positive	Indeterminate	68	Female	ND <sup>a</sup>	ND
I6	Positive	Indeterminate	39	Female	69	46
I7	Positive	Indeterminate	38	Female	66	49
DC1	Positive	Cardiac	59	Female	34	70
DC2	Positive	Cardiac	53	Male	22	69
DC3	Positive	Cardiac	ND	Male	ND	ND
DC4	Positive	Cardiac	50	Male	51	64
DC5	Positive	Cardiac	63	Male	37	65

<sup>a</sup> ND, not determined.

volume of RPMI medium supplemented with antibiotic/antimycotic (amphotericin B, 0.25 µg/ml; penicillin, 200 U/ml; and streptomycin, 0.1 mg/ml) and L-glutamine (1 mM) equal to the amount of blood initially incubated was added to the tubes. Infected cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for a period of 14 h. After this period, brefeldin A (1 µg/ml) was added to prevent protein secretion, and cultures were reincubated for an additional 4 h. For all individuals, we carried out cultures of blood submitted to the same procedures described above, but in the absence of parasites, as nonstimulated controls.

**Determination of the frequencies of DN T cells and expression of cytokines by αβ and γδ DN T cells.** Frequencies of αβ and γδ DN T cells, as well as expression of IFN-γ, TNF-α, IL-17, and IL-10 by these DN T-cell subpopulations, were determined by flow cytometry. Infected cells (treated as described above) or noninfected blood cells were harvested after the final 18 h of culture and submitted to specific staining for the above-mentioned molecules. We used a combination of CyChrome-labeled anti-CD4 and -CD8 to detect DN T cells, as previously done by us (4). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-αβ or anti-γδ T cells were also used in the staining to identify the specific subpopulations. Cells were harvested and plated at a concentration of 200,000 cells/well and incubated with a 20-µl mixture of the surface antibodies (anti-CD4<sup>+</sup> anti-CD8<sup>+</sup> labeled with CyChrome and anti-αβ or anti-γδ labeled with FITC) for 15 min at 4°C. Samples were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS)-1% bovine serum albumin (BSA) and fixed by a 20-min incubation with a 2% formaldehyde solution. After the fixing solution was removed by centrifugation and cells were washed with PBS, we permeabilized the cells by incubation for 10 min with a 0.5% saponin solution and proceeded with intracellular cytokine labeling. Samples were incubated with phycoerythrin (PE)-labeled anticytokine monoclonal antibodies for 20 min at room temperature, washed twice with 0.5% saponin solution, resuspended in PBS, and read in a flow cytometer. A minimum of 40,000 gated events from each sample were collected and analyzed using the FlowJo program. Analysis was performed by gating on the lymphocyte population and further gating on the CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> αβ- or γδ-producing T cells to determine the expression of the different molecules, as previously done by us (4).

**Statistical analysis.** The means of the different groups were compared using Tukey-Kramer all-pair comparison analysis of variance contained within the JMP software from SAS. A paired *t* test was used to ascertain differences among noninfected versus infected cultures within the same group of patients. Correlation analysis was done using Pearson's correlation coefficient. Differences that returned *P* values of less than or equal to 0.05 were considered statistically significant from one another.

## RESULTS

**In vitro infection with trypomastigote forms of *T. cruzi* induces an expansion of αβ and γδ DN T cells from chronic Chagas' disease patients.** To determine the frequency of DN

T-cell subsets in chronic Chagas' patients and nonchagasic individuals, we performed flow cytometric analysis of peripheral blood cells from these individuals, as described above. The analyses were carried out using nonstimulated cells to provide information about the frequency of these cells *ex vivo* from the patients, as well as after *in vitro* infection with trypomastigote forms of *T. cruzi*, to determine whether contact with the parasite led to the expansion of these cells and, if so, to what extent in the different groups. Our analysis showed that the frequencies of αβ and γδ DN T cells in nonstimulated cultures were similar among groups (Fig. 1 A, white bars). Moreover, we observed that within the total DN T-cell population, the frequencies of αβ and γδ TCR-expressing T-cell subpopulations were similar among groups (means ± standard deviations for αβ TCR subpopulations were 23% ± 8% [N], 30% ± 11% [I], and 25% ± 7% [DC], while those for γδ TCR subpopulations were 77% ± 8% [N], 70% ± 11% [I], and 75% ± 7% [DC]). Exposure of the cells from indeterminate and cardiac patients, as well as nonchagasic individuals to trypomastigote forms of *T. cruzi* led to an expansion of αβ and γδ DN T cells in all groups (Fig. 1A, dark bars; representative fluorescence-activated cell sorting [FACS] plots are shown in B).

**αβ and γδ DN T cells from chagasic patients display distinct immunoregulatory profiles.** In order to determine the functional characteristics of αβ and γδ DN T cells from patients with polar clinical forms of Chagas' disease, we investigated the expression of inflammatory (IFN-γ, TNF-α, and IL-17) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by these cells in nonexposed cultures and cultures exposed to the parasite. We observed that, whereas there was no difference in the frequencies of αβ and γδ DN T cells expressing any of the cytokines in nonstimulated cultures of the different groups (Fig. 2 and 3, white bars), exposure to the parasite revealed dramatic differences among them. In contrast, stimulation of peripheral blood cells with *T. cruzi* led to a significant increase in the frequency of αβ DN T cells expressing IFN-γ, TNF-α, and IL-17 from chagasic patients but not from noninfected individuals (Fig. 2, left panels). The induction of inflammatory cytokines was more evident in cells from DC patients exposed to the parasite than from I patients, as demonstrated by the significantly higher frequency of cytokine-producing cells in the DC group than in the N group for all cytokines (Fig. 2, left panels). When the expression of inflammatory cytokines within the γδ DN T-cell population was analyzed, *T. cruzi*-induced increases in cells expressing IFN-γ, TNF-α, and IL-17 were seen for both clinical forms but not for nonchagasic individuals (Fig. 2, right panels). In this subpopulation, the induction of inflammatory cytokines was significantly higher in cells from the I and DC groups than from the N group after exposure to the parasite (Fig. 2, right panels).

Analysis of expression of the down-modulatory cytokine IL-10 within the αβ and γδ DN T-cell populations showed that this cytokine was dramatically induced in *T. cruzi* cultures with cells from indeterminate patients (Fig. 3A; a representative FACS plot is shown in B). This increase in the frequency of IL-10-producing cells from indeterminate patients was seen when unstimulated and *T. cruzi*-stimulated cultures were compared, as well as in comparisons of *T. cruzi*-stimulated cultures of the I group versus the N and DC groups within the γδ DN T-cell subpopulation (Fig. 3). To determine the regulatory

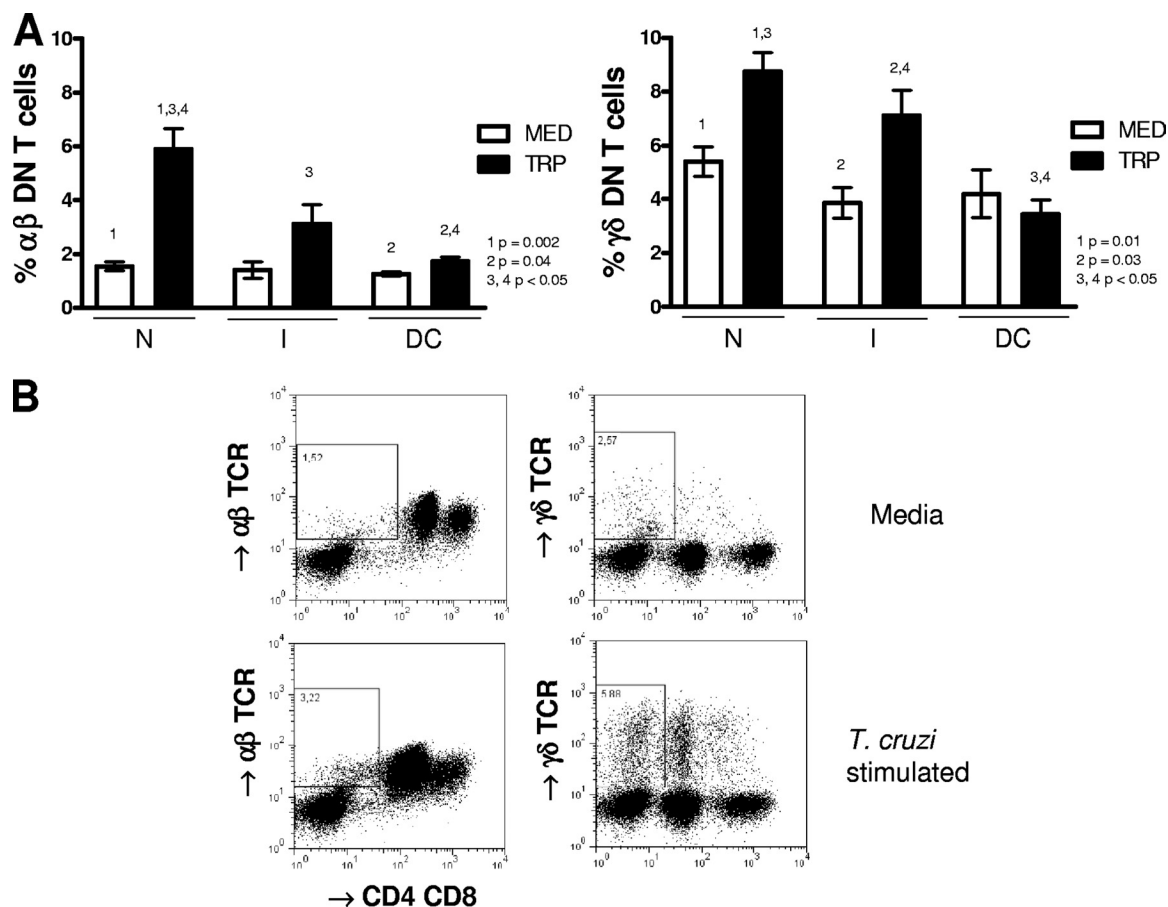


FIG. 1. *T. cruzi* activation of peripheral blood cells induces expansion of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  double-negative ( $CD4^- CD8^-$ ) T cells. Whole blood cells from noninfected controls (N), indeterminate chagasic patients (I), and dilated cardiac chagasic patients (DC) were incubated overnight as described in Materials and Methods with either medium alone (MED) or with live *T. cruzi* parasites (TRP) and then analyzed for the frequency of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$   $CD4^- CD8^-$  T cells using flow cytometry. Panel A shows the average frequencies for each group  $\pm$  standard deviations. The numbers of individuals in each group were as follows: N, seven; I, seven; and DC, five. Statistical significance is indicated in each graph, with differences between groups indicated by common numbers. Comparisons between groups were performed using a Tukey-Kramer comparison of all pairs, and comparisons within groups (MED versus TRP) were performed using a paired *t* test, as described in Materials and Methods. All patients were meticulously classified based on clinical criteria as described in Materials and Methods. Panel B shows representative dot plots from an indeterminate patient and gating for analysis of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$   $CD4^- CD8^-$  T cells. Both anti- $CD4^-$  and anti- $CD8^-$  antibodies were conjugated with CyChrome, allowing identification of the DN T cells using specific antibodies against both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell receptors conjugated with FITC. The gates used for determining the percentage of DN T cells and further analysis of cytokine expression in the DN T-cell populations are shown.

potentials of each subpopulation of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  DN T cells from I and DC patients, we calculated regulatory ratios by dividing the frequency of cells producing IL-10 by the frequency of cells producing either IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or IL-17. These results show that  $\gamma\delta$  DN T cells from group I have a much greater down-modulatory profile than  $\gamma\delta$  DN T cells from DC patients (Table 2). An analysis of the relative contribution by DN and other T cells to the overall frequency of IL-10-producing lymphocytes demonstrates that, on average, DN T cells account for at least 32% of the total IL-10 expression. This is a striking contribution, given that DN T cells represent a minority population of T cells. Interestingly, while the contribution of DN T cells to the overall IL-10 expression by lymphocytes in non-stimulated cultures from nonchagasic individuals was lower than that of  $CD4^+ CD8^+$  T cells ( $33\% \pm 8\%$  versus  $51\% \pm 13\%$ ;  $P < 0.05$ ), it was higher in nonstimulated cultures from indeterminate patients ( $49\% \pm 22\%$  versus  $27\% \pm 12\%$ ;  $P <$

$0.05$ ). No statistically significant changes were observed in comparisons of the DN T cells and  $CD4^+ CD8^+$  T cells from cardiac patients.

**Higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells are correlated with improved clinical parameters of heart function in human Chagas' disease.** Previous studies performed by our group have suggested that IL-10 has a protective role in human Chagas' disease through an association between the indeterminate clinical form of Chagas' disease and high-producing genotypes for IL-10 (12). In order to further determine if the IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T-cell subpopulation is correlated with improved cardiac function, and thus with a possible protective role in human Chagas' disease, we performed a correlative analysis between the frequency of these cells and two clinical parameters of cardiac function: left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular diastolic diameter (LVDD). These distinct clinical parameters are directly and inversely cor-



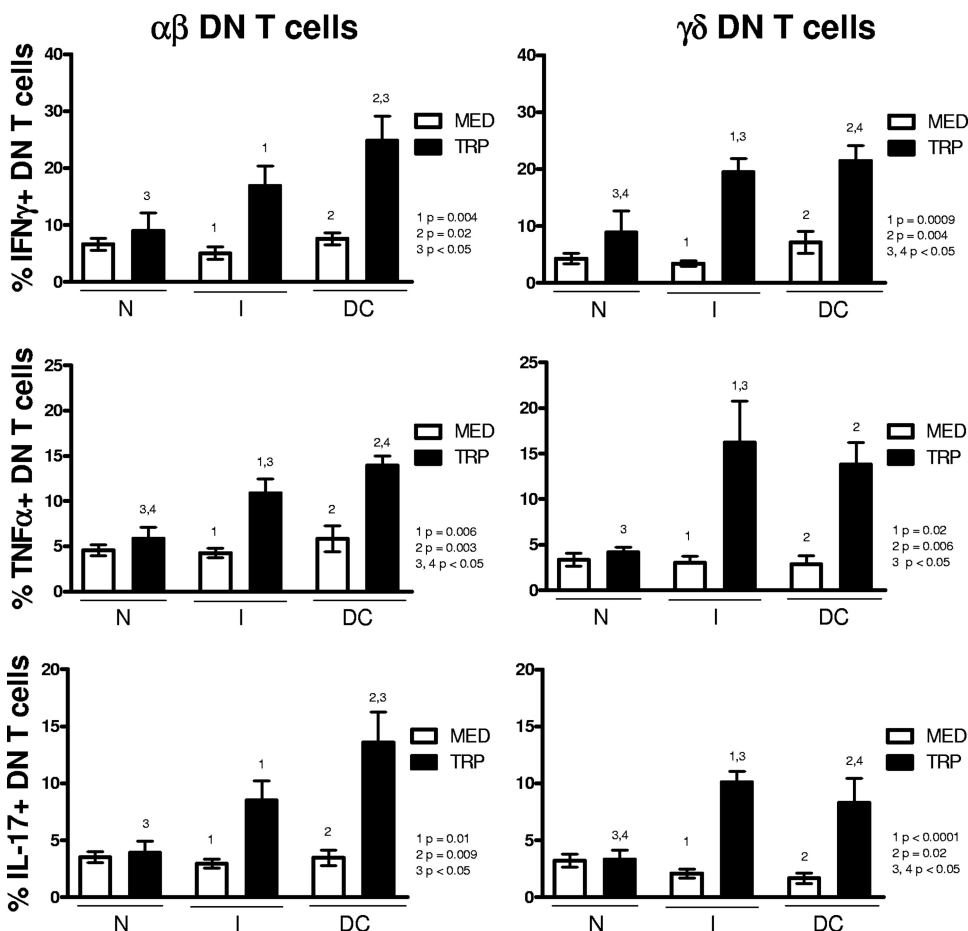


FIG. 2. *T. cruzi* activation of peripheral blood cells induces specific inflammatory cytokine production by  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  DN ( $CD4^- CD8^-$ ) T cells from both indeterminate and dilated cardiac chagasic patients. Whole blood cells from noninfected controls (N), indeterminate chagasic patients (I), and dilated cardiac chagasic patients (DC) were incubated overnight with either medium alone (MED) or with live *T. cruzi* parasites (TRP) and then analyzed for the frequency of  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells producing specific cytokines using flow cytometry, as described in Materials and Methods. The data represent the average for each group  $\pm$  standard deviations. The numbers of individuals in each group were as follows: N, seven; I, seven; and DC, five. The top panel shows the average percentage of IFN- $\gamma$ -producing cells within  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells from individual cultures without (MED) or with (TRP) stimulus. The middle panel shows the same for TNF- $\alpha$ -producing cells within  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells, and the bottom panel shows the values for IL-17-producing cells within  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells. Statistical significance is indicated in each graph, with differences between groups indicated by common numbers. Comparisons between groups were performed using a Tukey-Kramer comparison of all pairs, and comparisons within groups (MED versus TRP) were performed using a paired *t* test, as described in Materials and Methods. All patients were meticulously classified based on clinical criteria, as described in Materials and Methods.

related with better cardiac function, respectively (44). Strikingly, a significant positive correlation was seen between higher LVEF and higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells (Fig. 4 A). Moreover, a highly significant negative correlation between lower LVDD and higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells was also seen (Fig. 4 A). Interestingly, although  $\alpha\beta$  DN T cells also express IL-10 upon stimulation with the parasite, we did not observe correlations between the frequency of these cell subpopulations and the clinical parameters analyzed (Fig. 4 B). These data suggest that IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells display an important immunoregulatory role that leads to maintenance of better cardiac function in chagasic patients.

### DISCUSSION

Human infection with *T. cruzi* is the cause of Chagas' disease, an illness that currently affects approximately 18 million

people in Latin America, where it is considered endemic. In addition, it is estimated that 100 million people are at risk of infection with *T. cruzi*. Although treatment is available and relatively effective (40, 47), toxicity and lack of widely distributed pediatric formulations are still major problems in human Chagas' disease. While vector transmission was controlled in certain areas of South America, disease transmission via blood transfusion and organ transplant has brought the disease to the attention of health professionals in Latin America and other countries where the disease is not endemic, such as the United States and other countries (28). Moreover, cases of acute Chagas' disease have been described in areas where acute cases were not reported for over 15 years (50). Despite the fact that most Chagas' patients display a relatively mild, asymptomatic, clinical form of the disease, about 30% of the patients develop severe disease, leading to cardiac involvement and, often, death (44).

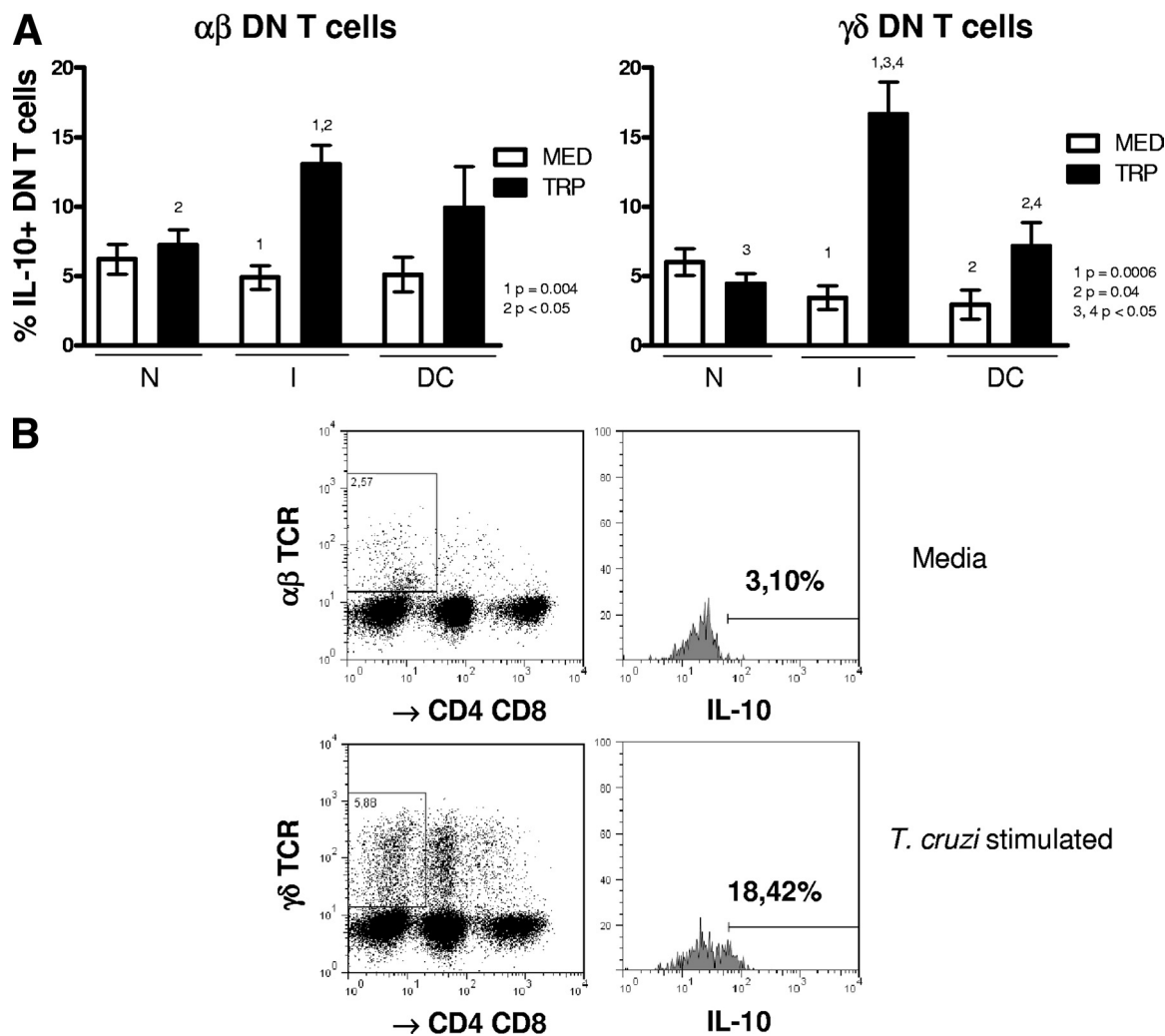


FIG. 3.  $\gamma\delta$  DN ( $CD4^- CD8^-$ ) T cells from indeterminate chagasic patients display a biased down-modulatory profile following stimulation with *T. cruzi*. Whole blood cells from noninfected controls (N), indeterminate chagasic patients (I), and dilated cardiac chagasic patients (DC) were incubated overnight with either medium alone (MED) or with live *T. cruzi* (TRP) and then analyzed using flow cytometry for the frequency of  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T cells producing IL-10, as described in Materials and Methods. The data represent the average for each group  $\pm$  standard deviations. The numbers of individuals in each group were as follows: N, seven; I, seven; and DC, five. Panel A shows the average percentage of IL-10-producing cells within the  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  DN T-cell population from individual cultures without (MED) or with (TRP) stimulus for each group. Statistical significance is indicated in each graph, with differences between groups indicated by common numbers. Comparisons between groups were performed using Tukey-Kramer comparison of all pairs, and comparisons within groups (MED versus TRP) were performed using a paired *t* test, as described in Materials and Methods. Panel B shows representative dot plots and gating for analysis of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$   $CD4^- CD8^-$  T cells producing IL-10. Both anti-CD4 and anti-CD8 antibodies were conjugated with CyChrome, allowing identification of the DN T cells using specific antibodies against both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cell receptors conjugated with FITC. The gates used for determining the percentage of DN T cells producing IL-10 were then determined in a histogram using anti-IL-10 conjugated with PE. The percentages of cells producing IL-10 from cultures either with medium alone or with *T. cruzi* stimulation were determined, as described in Materials and Methods. All patients were meticulously classified based on clinical criteria, as described in Materials and Methods.

Thus, the social and economic burdens caused by Chagas' disease place it among the most morbid of all parasitic diseases.

The mechanisms behind the development of the severe cardiac form of Chagas' disease have not been completely elucidated. However, it is well accepted that T cells are key players in mounting an immune response during the chronic phase of the disease (17). Thus, T-cell activation and function are critical in determining the clinical outcome of Chagas' disease. Cardiac patients display a highly activated, inflammatory T-cell response both *in situ* (13, 24, 41) and in the peripheral blood (2, 16, 19, 32). Interestingly, however, patients who do not develop

pathology and remain asymptomatic also display a high frequency of activated T cells in their bloodstream (18). This apparent contradiction has been better understood more recently, mainly due to the use of two important approaches: (i) clear definition of patient clinical forms by performing refined clinical analysis and (ii) identification and characterization of T-cell subpopulations that display distinct functional activities. Thus, recent studies using patients with well-defined clinical forms have shown that although T-cell activation is observed in severe and asymptomatic Chagas' patients, these cells have distinct functional potentials (17). Most studies have focused

TABLE 2. Indeterminate patients maintain a regulatory ratio of IL-10-producing cells

Patient group	Regulatory ratio <sup>a</sup>		
	IL-10/IFN- $\gamma$	IL-10/TNF- $\alpha$	IL-10/IL-17
Indeterminate	1.01 $\pm$ 0.26	1.26 $\pm$ 0.21	1.66 $\pm$ 0.21
Cardiac	0.32 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.55 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> The frequency of  $\gamma\delta$  DN T cells expressing the cytokines of interest following *in vitro* stimulation with *T. cruzi* was determined as described in Materials and Methods for each patient and then used to calculate regulatory ratios by dividing the frequency of cells producing IL-10 (a downregulatory cytokine) by the frequency of cells producing IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or IL-17.

<sup>b</sup> The values represent the average of ratios for IL-10/given cytokine  $\pm$  the standard error for seven indeterminate and five cardiac patients. In all cases the comparison between the ratios for the indeterminate versus the cardiac groups returned a *P* value of  $<0.01$ .

on the analysis of expression of factors that control the establishment of inflammatory responses in Chagas' disease, such as inflammatory cytokines and chemokines (20, 21). Studies performed by us and other groups have shown that major T-cell populations, defined by the expression of CD4 and CD8, display phenotypic and functional differences in individuals with different clinical forms of Chagas' disease. To this end, the frequencies of memory cells, as well as senescent cells, have been associated with the chronic cardiac form of Chagas' disease (1, 2, 23). While these studies have provided critical information, the determination of the contribution of distinct

subpopulations to the immunoregulation and functional activities, as well as the antigens that lead to their activation, is critical for the understanding the mechanisms of generation of pathogenic versus protective responses in Chagas' disease.

A quantitatively small subpopulation of T cells that does not express CD4 or CD8 molecules has been identified, and because of the ability of these cells to tolerate chronic stimulation due to the lack of the stabilizing CD4 or CD8 molecules, they have been shown to be critical in chronic immune diseases, especially auto-immune processes (8, 30). Furthermore, a large portion of these cells are activated by recognizing lipid/glycolipid antigens presented via CD1 molecules (36). Glycolipid determinants from *T. cruzi* have been shown to be important in the activation of cellular immune responses in experimental infection (34). Although previous studies of murine infection with *T. cruzi* suggested that CD1 molecules were not critical in eliciting cellular responses to parasite components (34, 39), others have shown that CD1 presentation is important for natural killer T (NKT)-cell activation (14, 15, 31).

The role of DN T cells in *T. cruzi* infection has not yet been clarified. It has been shown that mice infected with the parasite display a 40- to 100-fold increase in the frequency of liver  $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> lymphocytes, associated with expression of IFN- $\gamma$  (45). Interestingly, the same group later showed that the liver is an important organ for parasite clearance in chronic infection (46). An increase in the DN T-cell frequency in the liver of animals infected with *Plasmodium* was also associated with

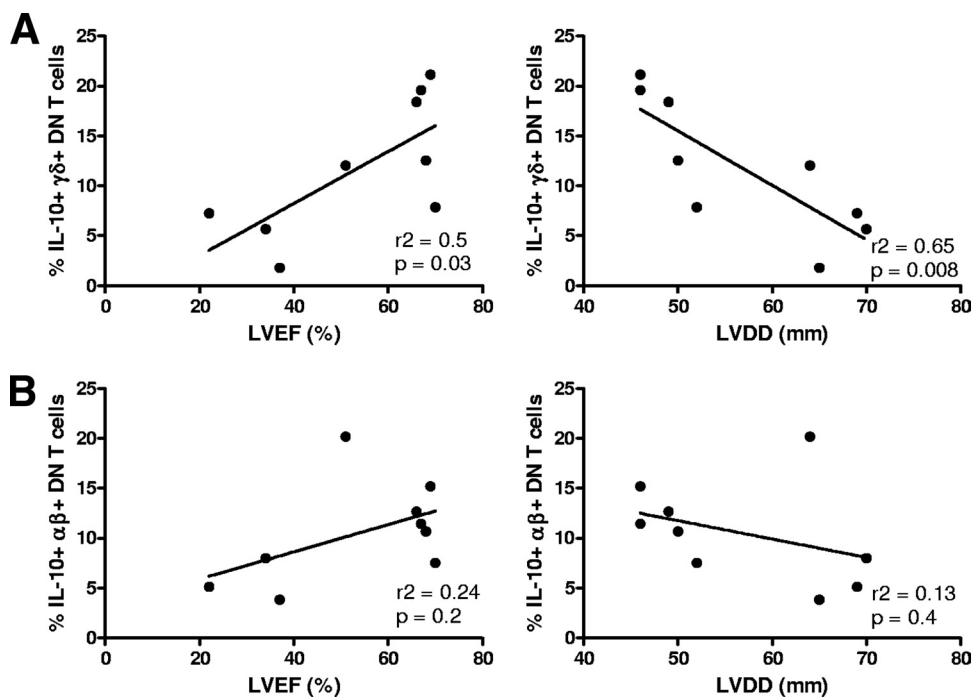


FIG. 4. Higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) T cells are correlated with better heart function in chagasic patients. The frequency of  $\gamma\delta$  DN T cells producing IL-10 following stimulation with *T. cruzi* was calculated from a group of chagasic patients who had associated detailed clinical data measuring ventricular function. These measurements were the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular diastolic diameter (LVDD). The higher the LVEF, the better the ventricular function, and the lower the LVDD, the better the ventricular function. Panel A shows Pearson's correlation plots between the frequency of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells and LVEF or LVDD. Both plots demonstrate a highly significant correlation between higher frequencies of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells and better ventricular function. In contrast, in panel B, no correlation is seen between IL-10-producing  $\alpha\beta$  DN T cells and measurements of ventricular function. Clinical data for a total of nine chagasic patients were used in this analysis. Statistical significance (*P* value) is indicated in each graph together with the  $r^2$  value.

parasite inhibition (35). Infection of rats with the highly virulent CL-Brenner clone of *T. cruzi* was associated with an expansion of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T cells and IFN- $\gamma$  production (33).

Recent studies have also pointed to important roles of DN T cells in human parasitic diseases. We have shown that  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  DN T cells display distinct immunoregulatory profiles in human cutaneous leishmaniasis (4, 25). Moreover, a high frequency of DN T cells was observed in the peripheral blood of individuals with *Plasmodium falciparum* malaria (52). In this work, we performed an analysis of the frequency of DN T cell  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  subpopulations in individuals with polar clinical forms of Chagas' disease. Our results showed that although there were no quantitative differences in the frequencies of these cells freshly isolated from chagasic patients and noninfected individuals, *T. cruzi* infection led to an expansion of DN T cells *in vitro*, and these cells were quite different in their immunoregulatory potentials. Although a parasite-induced expansion of DN T cells was observed in cultures of cells from patients as well as from noninfected individuals, the DN T cells from noninfected individuals did not express parasite-induced cytokines, compatible with a primary response. On the other hand, expanded cells from patients produced high levels of cytokines, indicative of an antigen-specific recall response, and also showed different cytokine expression profiles in indeterminate and cardiac patients. We observed that  $\alpha\beta$  DN T cells from individuals of the cardiac clinical form of Chagas' disease display higher expression of inflammatory cytokines upon *in vitro* stimulation with *T. cruzi*. Interestingly,  $\gamma\delta$  DN T cells from indeterminate patients displayed a markedly high expression of IL-10 following *T. cruzi* stimulation, which was not observed in cardiac patients. Analysis of the ratio IL-10/inflammatory cytokines revealed a clear down-modulatory environment associated with  $\gamma\delta$  DN T cells in indeterminate patients and not in cardiac patients. Given that we do not know the exact nature of the antigen responsible for the activation of these cells, we have not yet focused on any specific DN T-cell subpopulation, such as the DN NKT cells. Further studies are being carried out in our laboratory to clarify these questions. However, the observed functional differences presented here are clearly associated with important clinical features of the patients and continue to support earlier findings by our group and others defining key differences in the immunoregulatory environments between indeterminate and cardiac chagasic patients (20).

Monitoring cardiac function is an important procedure that permits one to follow the course of pathology development and worsening of human Chagas' disease. Unfortunately, due to the high costs of several of the required exams, it is not always possible to perform these procedures. We evaluated a group of clinically well-defined Chagas' patients in which two measures of cardiac function were performed: left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic diameter. These clinical characteristics, although physiologically related, reflect different levels of cardiac lesion. The greater the LVEF and the smaller the LVDD, the better the cardiac function. A positive correlation between a higher frequency of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells and improved cardiac function as measured by LVEF was seen. Moreover, the higher the frequency of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells, the lower the LVDD, which again indicates the association of IL-10-producing  $\gamma\delta$  DN T cells with

better cardiac function. Previous studies performed by us showed that a down-modulatory profile, as assessed mainly by IL-10 and CTLA-4 expression, was predominant in indeterminate patients (48, 49). Moreover, we demonstrated that IL-10 promoter gene polymorphism, which leads to high IL-10 expression, is associated with the occurrence of the indeterminate clinical form. Here, we suggest that IL-10 derived from  $\gamma\delta$  DN T cells may also be involved in protection. This is an important finding since these cells are likely activated via distinct mechanisms compared to the other cell populations studied to date. This could aid in the development of novel antigen-based prophylactic or therapeutic interventions.

An important question still unanswered is why these cell populations display distinct functional capabilities in patients with indeterminate and cardiac clinical forms. This is particularly intriguing when we remember that indeterminate patients, who apparently display a modulated response that may be important for avoiding tissue inflammation, may develop cardiac disease in the future. The hypothesis is that these individuals undergo cellular functional changes, which would lead to pathology establishment. Assuming that these changes are a cause and not a consequence of pathology, then identifying such differences and determining their causes will provide critical information for preventing cardiac damage and a worsening clinical pathology.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease, CNPq Universal grant, FAPEMIG, FINEP CT-Infra, and CNPq/Ministério da Saúde INCT-DT. W.O.D., M.O.D.C.R., L.R.D.V.A., L.M.D.M., and K.J.G. are CNPq fellows; F.N.A.V. and J.S.C.D.S. are CAPES fellows.

#### REFERENCES

- Albareda, M. C., S. A. Laucella, M. G. Alvarez, A. H. Armenti, G. Bertochi, R. L. Tarleton, and M. Postan. 2006. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int. Immunol.* **18**:465–471.
- Albareda, M. C., G. C. Olivera, S. A. Laucella, M. G. Alvarez, E. R. Fernandez, B. Lococo, R. Viotti, R. L. Tarleton, and M. Postan. 2009. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4<sup>+</sup> T cells to immune senescence. *J. Immunol.* **183**:4103–4108.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. P. Almeida, O. Bacellar, E. M. Carvalho, and K. J. Gollub. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **101**:226–230.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. R. Oliveira, K. C. Torres, L. H. Guimaraes, O. Bacellar, and K. J. Gollub. 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **74**:6317–6323.
- Araujo, F. F., J. A. Gomes, M. O. Rocha, S. Williams-Blangero, V. M. Pinheiro, M. J. Morato, and R. Correa-Oliveira. 2007. Potential role of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>HIGH</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* **12**:2797–2806.
- Aufderheide, A. C., W. Salo, M. Madden, J. Streitz, J. Buikstra, F. Guhl, B. Arriaza, C. Renier, L. E. Wittmers, Jr., G. Fornaciari, and M. Allison. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:2034–2039.
- Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollub, and E. M. Carvalho. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* **70**:6734–6740.
- Bleesing, J. J., M. R. Brown, J. K. Dale, S. E. Straus, M. J. Lenardo, J. M. Puck, T. P. Atkinson, and T. A. Fleisher. 2001. TcR-alpha/beta<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin. Immunol.* **100**:314–324.
- Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley, and K. J. Gollub. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequen-

- cies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **69**:3232–3239.
10. Brooks, E. G., S. P. Balk, K. Aupeix, M. Colonna, J. L. Strominger, and V. Groh-Spies. 1993. Human T-cell receptor (TCR)  $\alpha/\beta^+$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V $\beta$ -gene families, and phenotypically resemble memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:11787–11791.
  11. Buscaglia, C. A., and J. M. Di Noia. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* **5**:419–427.
  12. Costa, G. C., M. O. da Costa Rocha, P. R. Moreira, C. A. Menezes, M. R. Silva, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2009. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* **199**:451–454.
  13. Cunha-Neto, E., V. J. Dzau, P. D. Allen, D. Stamatou, L. Benvenuti, M. L. Higuchi, N. S. Koyama, J. S. Silva, J. Kalil, and C. C. Liew. 2005. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **167**:305–313.
  14. Duthie, M. S., M. Kahn, M. White, R. P. Kapur, and S. J. Kahn. 2005. Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **73**:1890–1894.
  15. Duthie, M. S., M. Kahn, M. White, R. P. Kapur, and S. J. Kahn. 2005. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **73**:181–192.
  16. Dutra, W. O., Z. M. da Luz, J. R. Cancado, M. E. Pereira, R. M. Brigido-Nunes, L. M. Galvao, D. G. Colley, Z. Brener, G. Gazzinelli, and J. F. Carvalho-Parra. 1996. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunol.* **18**:579–585.
  17. Dutra, W. O., and K. J. Gollob. 2008. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**:287–292.
  18. Dutra, W. O., O. A. Martins-Filho, J. R. Cancado, J. C. Pinto-Dias, Z. Brener, G. L. Freeman Junior, D. G. Colley, G. Gazzinelli, and J. C. Parra. 1994. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* **6**:499–506.
  19. Dutra, W. O., O. A. Martins-Filho, J. R. Cancado, J. C. Pinto-Dias, Z. Brener, G. Gazzinelli, J. F. Carvalho, and D. G. Colley. 1996. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **43**:88–93.
  20. Dutra, W. O., C. A. Menezes, F. N. Villani, G. C. da Costa, A. B. da Silveira, D. Reis, and K. J. Gollob. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**(Suppl 1):208–218.
  21. Dutra, W. O., M. O. Rocha, and M. M. Teixeira. 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* **21**:581–587.
  22. Faria, D. R., K. J. Gollob, J. Barbosa, Jr., A. Schriefer, P. R. Machado, H. Lessa, L. P. Carvalho, M. A. Romano-Silva, A. R. de Jesus, E. M. Carvalho, and W. O. Dutra. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**:7853–7859.
  23. Fiuza, J. A., R. T. Fujiwara, J. A. Gomes, M. O. Rocha, A. T. Chaves, F. F. de Araujo, R. C. Fares, A. Teixeira-Carvalho, A. Martins-Filho Ode, G. G. Cancado, and R. Correa-Oliveira. 2009. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**:e512.
  24. Fonseca, S. G., M. M. Reis, V. Coelho, L. G. Nogueira, S. M. Monteiro, E. C. Mairena, F. Bacal, E. Bocchi, L. Guilherme, X. X. Zheng, F. Y. Liew, M. L. Higuchi, J. Kalil, and E. Cunha-Neto. 2007. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8<sup>+</sup> T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand. J. Immunol.* **66**:362–371.
  25. Gollob, K. J., L. R. Antonelli, D. R. Faria, T. S. Keesen, and W. O. Dutra. 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int. Immunopharmacol.* **8**:1338–1343.
  26. Reference deleted.
  27. Illum, N., E. Ralfkiaer, G. Pallesen, and C. Geisler. 1991. Phenotypical and functional characterization of double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) alpha beta T-cell receptor positive cells from an immunodeficient patient. *Scand. J. Immunol.* **34**:635–645.
  28. Leiby, D. A., R. M. Herron, Jr., E. J. Read, B. A. Lenes, and R. J. Stumpf. 2002. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion* **42**:549–555.
  29. Macedo, A. M., and S. D. J. Pena. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* **14**:119–124.
  30. Magerus-Chatinet, A., M. C. Stolzenberg, M. S. Loffredo, B. Neven, C. Schaffner, N. Ducrot, P. D. Arkwright, B. Bader-Meunier, J. Barbot, S. Blanche, J. L. Casanova, M. Debre, A. Ferster, C. Fieschi, B. Florin, C. Galambrun, O. Hermine, O. Lambotte, E. Solary, C. Thomas, F. Le Deist, C. Picard, A. Fischer, and F. Rieux-Laucat. 2009. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR  $\alpha/\beta^+$  T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* **113**:3027–3030.
  31. Medeiros, M. M., J. R. Peixoto, A. C. Oliveira, L. Cardilo-Reis, V. L. Koatz, L. Van Kaer, J. O. Previato, L. Mendonca-Previato, A. Nobrega, and M. Bellio. 2007. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Leukoc. Biol.* **82**:488–496.
  32. Menezes, C. A., M. O. Rocha, P. E. Souza, A. C. Chaves, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2004. Phenotypic and functional characteristics of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin. Exp. Immunol.* **137**:129–138.
  33. Nagib, P. R., W. O. Dutra, E. Chiari, and C. R. Machado. 2007. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp. Parasitol.* **116**:366–374.
  34. Nakayasu, E. S., D. V. Yashunsky, L. L. Nohara, A. C. Torrecilhas, A. V. Nikolaev, and I. C. Almeida. 2009. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Syst. Biol.* **5**:261.
  35. Pied, S., J. Roland, A. Louise, D. Voegtli, V. Soulard, D. Mazier, and P. A. Cazenave. 2000. Liver CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J. Immunol.* **164**:1463–1469.
  36. Porcelli, S., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1992. CD1b restricts the response of human CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* **360**:593–597.
  37. Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner, and S. P. Balk. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>  $\alpha/\beta$  T cells demonstrates preferential use of several V $\beta$  genes and an invariant TCR  $\alpha$  chain. *J. Exp. Med.* **178**:1–16.
  38. Priatel, J. J., O. Utting, and H. S. Teh. 2001. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol.* **167**:6188–6194.
  39. Procopio, D. O., I. C. Almeida, A. C. Torrecilhas, J. E. Cardoso, L. Teyton, L. R. Travassos, A. Bendelac, and R. T. Gazzinelli. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKT cell pathway. *J. Immunol.* **169**:3926–3933.
  40. Rassi, A., A. O. Luquetti, A. Rassi, Jr., G. G. Rassi, S. G. Rassi, D. A. S. IG, and A. G. Rassi. 2007. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**:58–61.
  41. Reis, D. D., E. M. Jones, S. Tostes, E. R. Lopes, E. Chapadeiro, G. Gazzinelli, D. G. Colley, and T. L. McCurley. 1993. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**:192–200.
  42. Rezende, J. M., and A. O. Luquetti. 1994. Chagasic megavisceras. *PAHO Sci. Publ.* **547**:149–171.
  43. Rocha, M. O., A. L. Ribeiro, and M. M. Teixeira. 2003. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front. Biosci.* **8**:e44–54.
  44. Rocha, M. O., M. M. Teixeira, and A. L. Ribeiro. 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **5**:727–743.
  45. Sardinha, L. R., R. M. Elias, T. Mosca, K. R. Bastos, C. R. Marinho, M. R. D'Imperio Lima, and J. M. Alvarez. 2006. Contribution of NK, NK T,  $\gamma\delta$  T, and  $\alpha\beta$  T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **74**:2031–2042.
  46. Sardinha, L. R., T. Mosca, R. M. Elias, R. S. do Nascimento, L. A. Goncalves, D. Z. Bucci, C. R. Marinho, C. Penha-Goncalves, M. R. Lima, and J. M. Alvarez. 2010. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**:e578.
  47. Sosa-Estani, S., and E. L. Segura. 2006. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:583–587.
  48. Souza, P. E., M. O. Rocha, C. A. Menezes, J. S. Coelho, A. C. Chaves, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2007. *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.* **75**:1886–1894.
  49. Souza, P. E., M. O. Rocha, E. Rocha-Vieira, C. A. Menezes, A. C. Chaves, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. Immun.* **72**:5283–5291.
  50. Steindel, M., L. Kramer Pacheco, D. Scholl, M. Soares, M. H. de Moraes, I. Eger, C. Kosmann, T. C. Sincero, P. H. Stoco, S. M. Murta, C. J. de

- Carvalho-Pinto, and E. C. Grisard.** 2008. 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.* **60**:25–32.
51. **Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, R. L. Massara, J. D. Borges, P. S. Lage, M. Lana, A. Teixeira-Carvalho, J. C. Dias, S. M. Eloi-Santos, and O. A. Martins-Filho.** 2006. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin. Exp. Immunol.* **145**:81–92.
52. **Winkler, S., M. Willheim, K. Baier, W. Graninger, and P. G. Kremsner.** 1999. Frequency of cytokine-producing CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> peripheral blood mononuclear cells in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur. Cytokine Netw.* **10**:155–160.
53. **World Health Organization.** 2002. WHO Technical Report Series. Control of Chagas disease. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

---

*Editor:* J. F. Urban, Jr.

# ANEXO 2

## Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease

Walderez Ornelas Dutra<sup>1/+</sup>, Cristiane Alves Silva Menezes<sup>1,2</sup>, Fernanda Nobre Amaral Villani<sup>1</sup>, Germano Carneiro da Costa<sup>1</sup>, Alexandre Barcelos Morais da Silveira<sup>3</sup>, Débora d'Ávila Reis<sup>1</sup>, Kenneth J Gollob<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil <sup>3</sup>Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Canadá <sup>4</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

*Perhaps one of the most intriguing aspects of human Chagas disease is the complex network of events that underlie the generation of protective versus pathogenic immune responses during the chronic phase of the disease. While most individuals do not develop patent disease, a large percentage may develop severe forms that eventually lead to death. Although many efforts have been devoted to deciphering these mechanisms, there is still much to be learned before we can fully understand the pathogenesis of Chagas disease. It is clear that the host's immune response is decisive in this process. While characteristics of the parasite influence the immune response, it is becoming evident that the host genetic background plays a fundamental role in the establishment of pathogenic versus protective responses. The involvement of three complex organisms, host, parasite and vector, is certainly one of the key aspects that calls for multidisciplinary approaches towards the understanding of Chagas disease. We believe that now, one hundred years after the discovery of Chagas disease, it is imperative to continue with highly interactive research in order to elucidate the immune response associated with disease evolution, which will be essential in designing prophylactic or therapeutic interventions.*

Key words: pathology - protection - T-cells - immunoregulation - Chagas disease

### Chagas disease: contemporary concerns of a century disease

The first records of human infection with *Trypanosoma cruzi* date back nine thousand years, to a time when the first humans peopled the Andean coast. Molecular analyses of tissues extracted from human mummies of the Northern Chile and Southern Peru regions showed the presence of the parasite's kinetoplast DNA in 41% of the samples taken (Aufderheide et al. 2004). Contact of these human groups with other mammals infected with the parasite seemed to have been the main route of disease transmission. It is believed that upon the first human infections, the domiciliation process begun, which provided the vectors with protection to climate changes and predators, consolidating the human disease (Guhl et al. 2000).

Chagas disease was first detected in the Andes and even today it remains mostly restricted to Latin America. Several factors contribute to this restricted distribution, but the most important is likely related to socio-

economic factors. The close contact between the vector, the reservoirs and humans is critical for disease transmission. In fact, recent studies have shown that infected domestic animals are important reservoirs for sustaining natural transmission in endemic areas (Levy et al. 2006, Gurthler et al. 2007). Poor housing conditions offer an adequate nesting environment for the vectors and the proximity to mammals, including man, offers abundant food for these insects. Recent studies have demonstrated both the presence of potential vectors of *T. cruzi* in the United States and a large number of infected animal reservoirs (Beard et al. 2003, Hancock et al. 2005). Despite this, Chagas disease is not endemic in the United States, emphasizing the importance of both natural components and socio-economic aspects in maintaining endemicity.

While natural transmission is still the most important form of disease transmission in Latin America, other forms now have epidemiological importance. Infection via blood transfusion or organ transplantation, directly associated with the lack of blood/organ screening for the parasite, has brought the disease to non-endemic countries (Leiby et al. 2002). Moreover, ingestion of contaminated non-pasteurised fruit juices was recently responsible for new cases of Chagas disease in areas where acute cases had not been detected for over 15 years (Steindel et al. 2008), suggesting a repopulation by the vectors in such areas.

Thus, although Chagas disease was discovered 100 years ago, it remains a contemporary public health con-

Financial support: WHO/TDR Program, CNPq, FAPEMIG, NIH/NI-AID 1 R03 AI 066044-0181

+ Corresponding author: waldutra@gmail.com

Received 6 April 2009

Accepted 14 May 2009



cern, even more so because of the threat of its emergence in non-endemic areas and re-emergence in some endemic areas where it was thought to have been controlled. Taken together, these data point to a critical need for Chagas disease control in the following areas: (i) vector control programs that are not restricted to certain areas, but rather extended to all countries with active transmission; (ii) reliable blood bank surveillance, even in areas where the disease is considered non-endemic; (iii) improvement of socio-economic conditions; (iv) efficient parasite-targeted veterinary care and (v) reliable prophylaxis or therapeutic interventions. Multidisciplinary approaches and consistent support are essential for achieving these goals, which will ultimately lead to disease control at all levels.

### Clinical progression of human Chagas disease: from asymptomatic to severe forms

Following infection with *T. cruzi*, individuals undergo an acute phase that lasts between two and four months. With the exception of the mucosal edema that may appear at the site of infection (when in the eye, this is referred to as Romaña sign), the signs and symptoms associated to the acute phase of Chagas disease are mostly non-specific, making it difficult to detect infection at early stages. While the acute phase is characterised by high numbers of parasites in the bloodstream, blood smear examination requires expertise and is only performed upon suspicion of *T. cruzi* infection. If the infection is diagnosed, treatment is offered to the patients and cure may be observed in as many as 75% of cases (Sosa-Estani & Segura 2006, Rassi et al. 2007). This highlights the importance of developing reliable and easily available tests for detecting acute infection, as well as providing proper training to health professionals and care to the affected populations. Although a relatively high success rate is observed upon treatment, the currently available drugs are toxic and specific formulations for children, a group in which infection is highly prevalent, does not exist. Therefore, finding new parasitocidal compounds and new formulations will significantly improve disease treatment.

If the infection is not treated and cured, individuals will enter the chronic phase of the disease. The transition from acute to chronic phase is accompanied by a marked decrease in parasitaemia, due to the mounting of a relatively effective immune response, which keeps parasite frequency at below detectable levels in the host throughout the entire chronic phase of the disease. Despite the low parasite levels, it is during the chronic stage that patients may develop the most severe forms of Chagas disease. Figure 1 summarises the clinical progression of human Chagas disease.

As in most parasitic diseases, the vast majority of the individuals who are infected develop a relatively mild form of the disease, in which no clinical symptoms or signs are observed. Past or present infection with the parasite in many cases is only identified by the presence of specific antibodies directed against the pathogen. These individuals, who are serologically positive for anti-*T. cruzi* antibodies, are classified as indetermi-

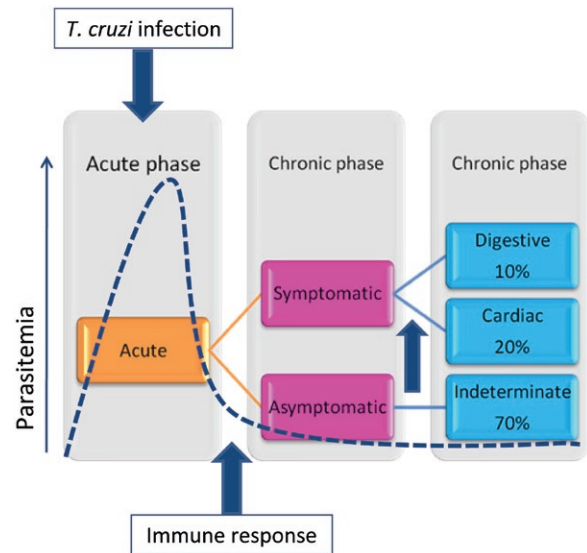


Fig. 1: clinical evolution of human Chagas disease. Upon infection with *Trypanosoma cruzi*, individuals undergo an acute phase that lasts between 2-4 months and is characterized by high parasitemia. Detection of acute disease is one of the challenges of human Chagas disease, since individuals who live in endemic areas often do not display symptoms and, if symptoms appear, they are usually unspecific. As infection is detected, treatment is offered to the patients and about 75% of the treated acute patients are cured. In the case that disease is not cured (or detected early on), patients will enter the chronic phase of disease. The transition from acute to chronic phase is accompanied by a marked decrease in parasitemia, as a result of the host's immune response. Most patients within the chronic phase are asymptomatic, classified as indeterminate. However, a significant percentage of the patients become symptomatic and develop pathology associated to cardiac or digestive tissues, which may lead to death. The reasons why some individuals remain asymptomatic while others develop severe pathology are not completely understood to date.

nate and often harbour the parasite throughout their entire lives without ever developing clinical disease. Thus, indeterminate patients represent a dramatic example of co-adaptation between host and parasite in Chagas disease and, considering the long co-evolution of the host-parasite relationship in this case, it makes sense that the majority of infected individuals remain asymptomatic. Still, a considerable percentage of infected patients will develop severe forms of Chagas disease. Destruction of neuronal and muscle fibres in the digestive system leads to the digestive form of Chagas disease which, in very severe cases, leads to dilation of digestive structures and loss of motility of the oesophagus and intestine. Among symptomatic individuals, the most frequent and morbid form is the cardiac clinical form, which presents as a spectra of different diseases. Chagas patients classified as cardiac may have relatively mild heart commitment, only detectable by refined clinical exams such as Doppler Echocardiography and 24-h Holter monitoring. Other patients, also classified as cardiac, present with severe heart disease as a result of damage to conductive or muscle structures, or both. In cardiac patients, it is common to

observe heart enlargement and loss of contractile function, characteristic of chronic chagasic cardiomyopathy, which often leads to death (Rocha et al. 2007).

The differences in the clinical courses observed in chronic Chagas disease, as well as the variation observed within the same clinical form, suggest that different pathogenic mechanisms are associated with the clinical status of the patients. Thus, refined clinical characterisation, obtained through well-defined patient groups, is a key element to be considered when analysing immunological as well as epidemiological data. The combination of clinical and basic research is essential in determining strategies for better understanding disease progression and pathology.

The million-dollar question in human Chagas disease research is "how can we halt the establishment of pathology?" In order to answer this question, researchers must first establish what factors mediate the different clinical progressions among patients. Given the complex nature of the host-pathogen relationship, this is not an easy task. However, it poses an exciting challenge and the pursuit of this knowledge will lead to concrete benefits to the large contingent of infected patients, as well as to those at risk of infection. In the following paragraphs, we will discuss the theories of pathology development and the immune response associated with pathology or protection in human Chagas disease.

### **Mechanisms of pathogenesis in human Chagas disease: controversies and consensus**

There are two main hypotheses seeking to explain the mechanisms of pathogenesis in human Chagas disease. The first of these defends the pivotal role of parasite's persistence in the host as a major cause of pathology, while the other postulates that an immune response against self antigens is responsible for the tissue damage observed in affected organs of chagasic individuals (Kierszenbaum 2005, Hyland & Engman 2006, Dutra & Gollob 2008).

The parasite persistence hypothesis is supported by evidence showing that *T. cruzi* is present close to, or within, damaged areas (Fuenmayor et al. 2005). Although immunohistochemical/histological techniques often fail to reveal parasites at lesion sites, studies using sensitive techniques such as polymerase chain reaction (PCR), and in situ hybridisation have shown *T. cruzi* persistence in affected organs (Jones et al. 1993, Vago et al. 1996). Benvenuti et al. (2005) detected *T. cruzi* DNA in endomyocardial biopsies after heart transplantation using PCR. In situ hybridisation using human cardiac tissue provided little evidence for the presence of intact *T. cruzi* at sites of marked inflammation. Nevertheless, remnants of both *T. cruzi* kinetoplast and nuclear DNA were detected (Elias et al. 2003). Furthermore, the transmission of *T. cruzi* via blood transfusion from chronic chagasic donors and the observation that there is reactivation of parasitaemia in immuno-suppressed patients both support the assertion that parasites persist in many hosts (Bocchi et al. 1996, Ferreira et al. 1997). Consistent with the parasite persistence hypothesis is the observation that patients treated with drugs that decrease

parasite load display concomitant decrease in disease severity. Viotti et al. (2006) observed that patients presenting with chronic disease and no heart failure treated with benznidazole exhibited reduced progression of Chagas disease and increased negative seroconversion. Reduction of electrocardiogram abnormalities were observed in chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol (Apt et al. 2003). Thus, it seems beyond doubt that parasite presence is strongly tied to pathology, since *T. cruzi* infection is the initial event responsible for triggering Chagas disease, persists in the host, and because an anti-parasite response is observed in chronic patients.

On the other hand, the contrast between the severity of the lesions observed during the chronic phase of Chagas disease and the low parasite load in the blood and tissues of chagasic patients suggests that the response to the parasite alone is insufficient to account for the observed pathology and that autoreactivity may contribute to disease aggravation. This idea led to the hypothesis that autoimmune responses take place during the development of pathology. Favouring this hypothesis is the fact that epitopes of parasite antigens elicit antibodies that cross react with epitopes of host tissues (Girones et al. 2005, Cunha-Neto et al. 2006). Furthermore, it was demonstrated that anti-parasite host-derived antibodies can mediate cellular reactivity (Gazzinelli et al. 1990, Reis et al. 1993a, Dutra et al. 2000). In addition to the presence of auto reactive antibodies, many studies demonstrated the existence of auto reactive T-cells in Chagas patients (Benoist & Mathis 2001, Cunha-Neto et al. 2006). To this end, molecular mimicry has been suggested to exist between components of the host and *T. cruzi* and, thus, strongly supports the participation of autoimmune reactivity in the pathogenesis of Chagas disease (Cunha-Neto et al. 1996).

Although the theories seeking to explain the mechanisms underlying the pathogenesis of Chagas disease are controversial, autoreactivity and parasite persistence theories are not mutually exclusive. It is clear that, as the studies are not decisive in excluding one another, both should be considered when attempting to understand the establishment and maintenance of Chagas disease pathology. Regardless of the origin/source of the antigens that trigger the immune response during chronic infection, there is a consensus that the host's immune system, particularly T-cell subpopulations, plays a central role in pathology development. The increasing technical ability of researchers to phenotypically and functionally define T-cell subpopulations has provided more information about the role of different T-cells during disease evolution, allowing for a more refined clinical classification of patients. This, in turn, is critical for defining what leads to protective *versus* pathogenic responses.

### **The role of different cell populations and cytokines in establishing pathogenic versus protective responses: association with clinical aspects**

The pathological manifestations of Chagas disease, both in the cardiac and in the digestive form, are associated with the occurrence of an inflammatory reaction.

Interestingly, the parasite is present in symptomatic as well as in indeterminate patients and, to date, there is no published evidence that parasite load is higher in the symptomatic groups as compared to the indeterminate groups. Moreover, T-cells from all groups of patients, regardless of the clinical form, display characteristics of activation (Dutra et al. 1994, 1996, Lemos et al. 1998) and are capable of proliferating *in vitro* in response to parasite antigens (Dutra et al. 2000). The apparent lack of differences amongst patients with distinct clinical forms of Chagas disease led to the idea that particular parasite populations could lead to the establishment of different clinical forms. Molecular genetic analyses of different *T. cruzi* isolates have demonstrated that distinct parasite populations are associated with different clinical forms of Chagas disease (Vago et al. 2000), suggesting that genetically distinct populations display characteristic tissue tropism and, thus, influence disease outcome. However, the observation that genetically similar parasite isolates have been found in different organs suggests that the host immune response is a critical factor in determining the outcome of infection (Lages-Silva et al. 2006). Also, as more refined clinical criteria are used, important immunological differences can be associated with patients with distinct clinical outcomes. Although studies of the human disease are still scarce in comparison to those using animal models, a collection of data has been made available in the literature describing aspects of the immune response observed in patients with different clinical forms. We will present some of these data below, with emphasis on the cellular immune response.

*Indeterminate form: equilibrium between host and parasite* - The indeterminate clinical form represents the ideal situation for both the host and the parasite. Individuals with this clinical form harbour the parasite, as demonstrated by a variety of methods, but have no symptoms of disease whatsoever. Thus, the type of immune response induced in these individuals seems to be critical in maintaining a "healthy" balance between the parasite and host.

Indeterminate patients present positive serological standard tests (at least 2 positive results using different methods) and display no clinical signs and symptoms related to Chagas disease. According to WHO (2002) criteria, indeterminate patients have normal electrocardiogram and radiological examination of the chest, oesophagus and colon. Patients with this form of the disease may progress to symptomatic forms eventually. However, many never develop clinical disease and die later in life of unrelated causes. Interestingly, despite the complete lack of clinical disease manifestations, indeterminate patients display quite a robust immune response. The idea that these individuals do not develop disease because they do not display cellular reactivity, therefore, is incorrect. Rather, the quality of this cellular reactivity is what seems to set these patients apart from other groups.

Most studies concerning the cellular immune response in Chagas disease, especially in indeterminate

patients, who do not display associated lesions, have been performed using peripheral blood cells (PBC). Early studies have demonstrated that PBC from indeterminate patients proliferate upon stimulation with *T. cruzi*-derived antigens and that this proliferative response does not differ quantitatively from those observed in patients with the cardiac clinical form of the disease (Morato et al. 1986, Dutra et al. 2000). Also, cells from indeterminate chagasic patients proliferate when stimulated with anti-epimastigote antibodies derived from patients with Chagas disease (Gazzinelli et al. 1990, Dutra et al. 2000). However, this particular response to the antibody stimulus seems to be lower in patients with the indeterminate form compared to cardiac patients. Reis et al. (1993a), studying the response to anti-epimastigote antibodies of chagasic individuals, showed that anti-epimastigote antibodies derived from indeterminate patients displayed a lower stimulatory capacity than antibodies isolated from cardiac patients. These data suggest that, although indeterminate patients do display anti-epimastigote antibodies in their bloodstream that can stimulate T-cells, these antibodies are less stimulatory, which may contribute to a lower cellular response *in vivo*.

Analysis of the expression of activation markers by T-cells showed that indeterminate patients have a high frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells expressing HLA-DR and CD45RO (Dutra et al. 1994). Moreover, the vast majority of these T-cells do not express the co-stimulatory molecule CD28 (Dutra et al. 1996, Menezes et al. 2004, Albareda et al. 2006). Because CD28-negative T-cells were so frequent in indeterminate patients, further studies were designed to better characterise these cells with regards to their immunoregulatory potential through the analysis of cytokine expression. Interestingly, we found a positive correlation between the frequency of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cells and the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in indeterminate patients (Menezes et al. 2004). This suggested that this subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> activated T-cells from indeterminate patients displayed down modulatory capacity. It is known that, upon activation and consequent down-regulation of CD28, T-cells express the co-stimulatory molecule CTLA-4. This molecule recognises the same ligands as CD28 but, instead of leading to cell activation, it leads to modulation of T-cell responses. When we evaluated the expression of CTLA-4 in T-cells from indeterminate patients, we observed an upregulation of CTLA-4, especially within the CD8<sup>+</sup> T-cell population (Souza et al. 2007). These data suggest that CD8<sup>+</sup> T-cells from indeterminate patients may be self-regulated, possibly due to intrinsic regulation via CTLA-4. Given that CD8<sup>+</sup> T-cells seem to be the best candidate for tissue destruction, as we will discuss below, it is possible that this regulatory mechanism, working in tandem with others, helps prevent pathology in indeterminate patients. Thus, activated T-cells from indeterminate patients, although present at similar levels as those in cardiac patients, are associated with modulatory capacities (e.g., IL-10 and CTLA-4 expression).

An effective T-cell response requires appropriate stimulation via antigen-presenting cells. Antigen pre-

senting cells are mechanistically essential for T-cell activation and cytokines produced by these cells may create an environment that will influence T-cell function. Since unique T-cell characteristics have been observed in indeterminate patients, the question arises as to whether they were associated with characteristics of antigen presenting cells. It was observed that in vitro infection of monocytes from indeterminate patients with the trypomastigote form of *T. cruzi* led to a decrease in the expression of HLA-DR and, at the same time, an increase in the expression of CD80 (Souza et al. 2004). While the lower expression of HLA-DR may help keep T-cell activation at lower levels (since this molecule is important for antigen presentation), the increase of CD80, a ligand for CTLA-4 which is increased on the T-cells from these patients, will likely lead to a modulation of the T-cell response. Importantly, the exposure of monocytes from indeterminate patients to the parasite in vitro leads to a high expression of IL-10, consistent with a modulatory response. Other researchers have also shown that monocytes from indeterminate patients are an important source of this immunoregulatory cytokine (Gomes et al. 2003). An interesting study by Vitelli-Avejar et al. (2006), evaluating children at the early stages of the indeterminate form of Chagas disease, showed a high frequency of proinflammatory monocytes and regulatory cells, as compared to non-infected children. Thus, different kinetics of cytokine expression may be important for determining the fate of infection. Considering all these data, we hypothesise that, at early stages of indeterminate disease (which follows recent infection), expression of inflammatory cytokines is important to help control parasite levels. However, later on, it is critical to establish modulation of the inflammatory response to avoid tissue destruction. In this later stage, IL-10 may play an essential role in controlling disease. A recent study performed by our group demonstrated a biased distribution of the high expression the IL-10 allele amongst indeterminate chagasic patients (Costa et al. 2009). Thus, the ability to express IL-10 at sufficiently high levels may be genetically determined and may influence disease outcome.

Whether the immunological characteristics associated with the protective response observed in indeterminate patients can be achieved via the use of immunological interventions is still unclear. Adding to the complexity of the host-parasite interaction is the host's genetic background, which may be a key factor in disease development. However, it is clear that some elements of the overall immune response, such as IL-10, are consistently associated with the generation of this partially protective phenotype. Dissecting the mechanisms that control IL-10 expression, the expression of its functional receptor and the subsequent intracellular signalling triggered by IL-10 will certainly lead to important information on how to achieve (or maintain) this desirable response.

*Immune-pathology of megaesophagus and megacolon: consequences of neuronal destruction* - Megaesophagus and megacolon are the major causes of

morbidity in the digestive clinical form of chronic Chagas disease. Pathologically, both the oesophagus and colon exhibit striking luminal enlargement and muscular hypertrophy. Microscopically, inflammatory infiltrates and fibrosis are found associated with lesions of muscle cells and of the intramural nervous system (Koberle 1968, Adad et al. 2001). The inflammatory infiltrates are composed mainly of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD20<sup>+</sup> B lymphocytes, CD57<sup>+</sup> NK cells and CD68<sup>+</sup> macrophage-like cells (Corbett et al. 2001, d'Avila Reis et al. 2001). The observation that *T. cruzi* kDNA persists in the chronic lesion suggests a role for the parasite in the maintenance of cell activation and of the late inflammatory process (Jones et al. 1993, Vago et al. 1996, Vago et al. 2000).

Denervation, characterised by a striking reduction in the number of neurons, has been considered the hallmark of the chronic digestive disease (Adad et al. 1991, 2001). A reduction of about 85% in the number of neurons is necessary for the development of megaesophagus, while megacolon is associated with a neuronal loss of at least 50% (Koberle 1968). Assessment of denervation in chagasic megacolon and megaesophagus has also been performed by computerised morphometric analyses after immunolabelling with anti-PGP-9.5 monoclonal antibody, specific for neurons and nerve fibres (da Silveira et al. 2005, 2007c, 2008a). In patients with megacolon or megaesophagus, these studies have demonstrated both decreased expression of the integrated PGP-9.5 area and thinning of the nerves, which has been interpreted as a loss of axons in the fibre bundles.

More recently, the denervation process in chagasic megacolon has been further analysed by immunophenotyping the enteric neurons in the colon. Since the enteric nervous system contains between 10-100 million neurons with a great variety of neurotransmitters and/or neuropeptides (Furness 2000), destruction of certain selective neuronal classes in Chagas disease could easily affect the peristalsis and vascular tonus, favouring the development of pathology. In fact, in chagasic megacolon, inhibitory motor neurons (VIP and NOS immunoreactive) are preferentially destroyed. This may explain, at least in part, the partial inability of the involved colon and internal anal sphincter to relax, which seems to induce a mechanical obstruction and dilation of the organ (da Silveira et al. 2007b, 2008b).

The cause of neuronal destruction in Chagas disease has been debated in the literature. In the acute phase, when *T. cruzi* is present in high numbers in the tissue, the parasite may be responsible for the neuronal lesions. In contrast, the parasite load is very low in chagasic lesions during the chronic phase; moreover, the frequent occurrence of ganglionitis and periganglionitis in patients developing megaesophagus and/or megacolon points to participation of immune system cells in these processes (da Silveira et al. 2005). A strong association between the denervation rate and presence of cells with potential cytotoxicity has been demonstrated. Chagasic patients with megacolon present increased numbers of eosinophils and masT-cells compared with both non-infected individuals and chagasic patients without mega-

colon (da Silveira et al. 2007a). It is well known that these cells, when associated with inflammatory processes, can participate in tissue injury through the secretion of cytokines such as IL-1, TNF-alpha and IL-6, which activate the cytotoxic process (Cardoso et al. 2006). In this context, it has already been demonstrated that NK cells and TIA-1+cytotoxic lymphocytes are prevalent in the oesophagus and colon of chronic chagasic patients, with or without digestive disease (d'Avila Reis et al. 2001, da Silveira et al. 2005, 2007a). Moreover, eosinophils and masT-cells themselves can cause tissue injury by secreting, when activated, a variety of enzymes, nitric oxide and free radicals. MasT-cells and eosinophils are probably also implicated in the development of fibrosis, another important factor in the pathogenesis of megacolon and megaesophagus (Adad et al. 1991, 2001).

Another important co-factor in cell-mediated pathology of megaesophagus and megacolon is the enteric glial cell. These cells are activated by inflammatory activity and may contribute actively to inflammatory pathology via antigen presentation and cytokine synthesis. The participation of enteric glial cells in the pathology of megacolon was suggested primarily by the demonstration that these cells have different phenotypes based on whether or not they are associated with an intense inflammatory process, and whether they are in dilated or non-dilated portions of the organ. The non-dilated portion of chagasic megacolon exhibits increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) compared with both the dilated portion of the colon in the same patient and also with the colons of non-infected individuals (da Silveira et al. 2007c, 2009). As a constituent of the intermediate filaments, one of the functions of GFAP is to increase the cohesion between enteric glial cells (Steinkamp et al. 2003, von Boyen et al. 2004). It is thus tempting to speculate that the increased expression of GFAP on glial cells in chagasic patients creates a barrier of protection for the neuronal cell bodies and represents an attempt to protect the neurons against destruction by the inflammatory processes. Studies designed to identify signalling molecules, including cytokines, neurotransmitters and neurotrophic factors, which lead to GFAP expression by the enteroglia cells, are crucial for understanding, not only the pathogenesis of chagasic megacolon, but also the feedback of the enteric nervous system under inflammatory conditions.

The alterations suffered as a result of neuroimmune integration have been the subject of research in several different diseases that affect the gastrointestinal tract. In Chagas disease, it is possible that the study of the enteric nervous system, as well as its association with the inflammatory process, could provide a basis for understanding neuroimmune alterations that may somehow be involved in the development of mega-organs, allowing for the design of interventions to control immune and nervous cells, and prevent disease.

*Cardiac disease: a lack of proper immunological modulation?* - The pathology that characterises chronic chagasic cardiomyopathy is associated with the presence of an intense inflammatory infiltrate in the myocardium

of the patients, especially at sites where *T. cruzi* antigens are observed (Fuenmayor et al. 2005). This inflammatory infiltrate is mainly composed of mononuclear cells, especially CD8<sup>+</sup> T-cells (Reis et al. 1993b). These CD8<sup>+</sup> T-cells display characteristics of activated cells, since they are associated with the expression of inflammatory cytokines and cytotoxic molecules, such as TNF-alpha and granzyme A (Reis et al. 1993b). Recent studies have suggested that cytokines such as IL-7 and IL-15 are critical for maintenance of these cells and of their activation state in the heart tissue of cardiac chagasic patients (Fonseca et al. 2007).

The T-cell activation observed in situ is also observed in the circulating cells of cardiac patients. Several studies have shown that PBC from cardiac patients proliferate in vitro upon exposure to both parasite and host-derived antigens (Dutra et al. 2000). Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> circulating T-cells from cardiac patients display high expression of HLA-DR and lower expression of CD28, similar to what was described in indeterminate patients (Dutra et al. 1994, 1996). However, significant differences at the functional level distinguish these activated cell populations between the two clinical forms. While a modulatory profile in activated T-cells from indeterminate patients has been observed, CD28<sup>-</sup> T-cells from cardiac patients are associated with the expression of inflammatory cytokines such as TNF-alpha (Menezes et al. 2004). A correlation between serum levels of TNF-alpha and the occurrence of severe chagasic cardiomyopathy has also been established (Ferreira et al. 2003). These data were expanded by findings demonstrating an inverse correlation between high levels of TNF-alpha or the chemokine CCL2 and the left ventricular ejection fraction (lower fractions, as assessed by echocardiography, indicate worse heart function) in severe cardiac chagasic patients (Talvani et al. 2004). Interestingly, the activated T-cells from cardiac patients, which lack CD28 at the same levels as cells from indeterminate patients, do not up-regulate CTLA-4 (Souza et al. 2007). While this molecule is expressed intracellularly, it is not seen on the cell membrane, suggesting a defect in CTLA-4 expression by T-cells from cardiac chagasic patients. This event could determine a lack of control in T-cell responses and aid in tissue destruction. This mechanism is under investigation in our laboratory.

Our lab demonstrated that CD4<sup>+</sup> T-cells from indeterminate and cardiac patients display a biased expression of the T-cell receptor region Vbeta5, suggesting the response to a dominant peptide or to a superantigen in the chronic phase of Chagas disease (Costa et al. 2000). We observed a positive correlation between the frequency of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>Vbeta5<sup>+</sup> T-cells and the frequency of TNF-alpha and IL-10 producing cells in indeterminate patients, while amongst cardiac patients the same T-cell population was only correlated with the expression of TNF-alpha producing cells (Fig. 2). We have previously described a similar finding in human leishmaniasis, where the patients with the mild form of the disease (coetaneous) presented a co-regulation of expression of inflammatory and anti-inflammatory cytokines, suggesting a balanced control of the response, and patients with

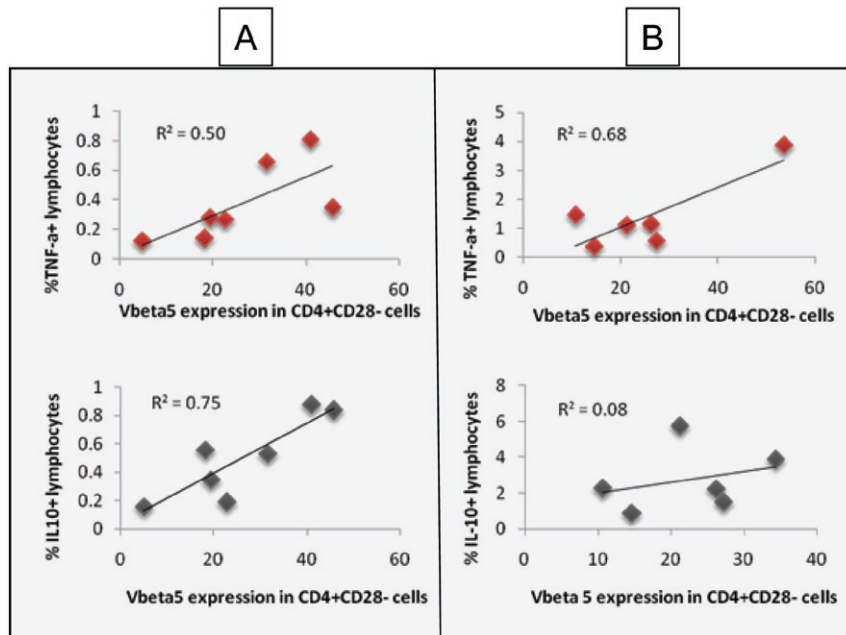


Fig. 2: immunoregulation in human Chagas disease: distinct functions of CD28- T-cells. Correlative analysis of the frequency of CD4<sup>+</sup>CD28-Vbeta5<sup>+</sup> T-cells and TNF-alpha or IL-10-expressing cells was performed in indeterminate (A) and cardiac (B) chagasic patients. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from indeterminate and severe cardiac chagasic patients and analyzed using flow cytometry to determine the values obtained in X and Y axis, as previously done by us (Menezes et al. 2004). The data showed a positive correlation between the frequency of CD4<sup>+</sup>CD28-Vbeta5<sup>+</sup> cells and IL-10 as well as TNF-alpha in indeterminate, suggesting a balance in the expression of these cytokines by this cell sub-population, leading to a co-regulation of inflammatory/anti-inflammatory responses. On the other hand, a positive correlation was only observed between CD4<sup>+</sup>CD28-Vbeta5<sup>+</sup> cells and TNF-alpha, but not IL-10, in cardiac patients. This suggests a predominance of inflammatory function of these cells in cardiac patients, which could be associated to the establishment of an unregulated immune response, favoring pathology development.

the severe form (mucosal) did not display this balance (Antonelli et al. 2004, Gaze et al. 2006, Gollob et al. 2008). The same rationale can be used to interpret these data, where patients with cardiac disease would display a lack of immunoregulatory control that may contribute to the establishment and maintenance of pathology.

Activated T-cells are not the only important source of TNF-alpha; monocytes from cardiac patients produce this important inflammatory mediator as well. We have shown that in vitro exposure to *T. cruzi* trypomastigotes induces expression of TNF-alpha by monocytes of cardiac patients, as opposed to IL-10 preferentially expressed by monocytes from indeterminate patients, under the same conditions (Souza et al. 2004).

Another inflammatory cytokine consistently associated with cardiac disease is IFN-gamma. It has been shown that PBC from cardiac patients express higher levels of IFN-gamma as compared to PBC from indeterminate patients (Menezes et al. 2004) and that there is a direct correlation between disease severity (as determined by different degrees of cardiomyopathy) and expression of IFN-gamma (Gomes et al. 2003). In addition, it has been shown that T-cell clones derived from the heart of cardiac patients produce predominantly IFN-gamma (Abel et al. 2001). It has been shown that the main sources of IFN-gamma in chagasic patients

are CD4<sup>+</sup> T-cells (Gomes et al. 2003). However, recent studies in our laboratory have suggested that other cell populations such as CD4-CD8- T-cells are an important source of this cytokine in cardiac chagasic patients (unpublished data), which again was paralleled by a finding from our group in human leishmaniasis (Antonelli et al. 2006). Taken together, these findings concerning the expression of IFN-gamma and TNF-alpha are consistent with the inflammatory immune response observed in situ. However, others have found an opposite correlation between the expression of IFN-gamma and cardiac disease (Lauccella et al. 2004). Moreover, Bahia-Oliveira et al. (2000) demonstrated that the levels of IFN-gamma were higher in cured former chagasic individuals than in those submitted to therapy, but not cured, suggesting a role for IFN-gamma in the mechanisms of disease resolution. Again, this is suggestive that the balance of inflammatory and anti-inflammatory cytokines determines the fate of infection and the progression of disease.

Although cells from cardiac patients are able to produce IL-10, the ratio of this cytokine to TNF-alpha seems to be lower in cardiac patients (Souza et al. 2004). The lower expression of IL-10 has been associated with the occurrence of a gene polymorphism in the promoter region of the *IL-10* gene (Costa et al. 2009). The association of this polymorphism with cardiac Chagas disease

points to an important genetic susceptibility factor that could influence the outcome of the immune response in these patients.

Genetic susceptibility to development of cardiomyopathy has been described with regards to polymorphism in genes that code for molecules involved in the control of the immune response, especially cytokines. Recently, an

association with polymorphisms in lymphotoxin, *MCP-1*, *Bat-1* and *NFkB* genes, among others, was described for cardiac Chagas disease in the Brazilian population (Ramazawmy et al. 2006a, b, 2007, 2008). Taken together, these data show that genetic predisposition can also influence the outcome of Chagas disease. Thus, typing of gene polymorphisms could be an important approach

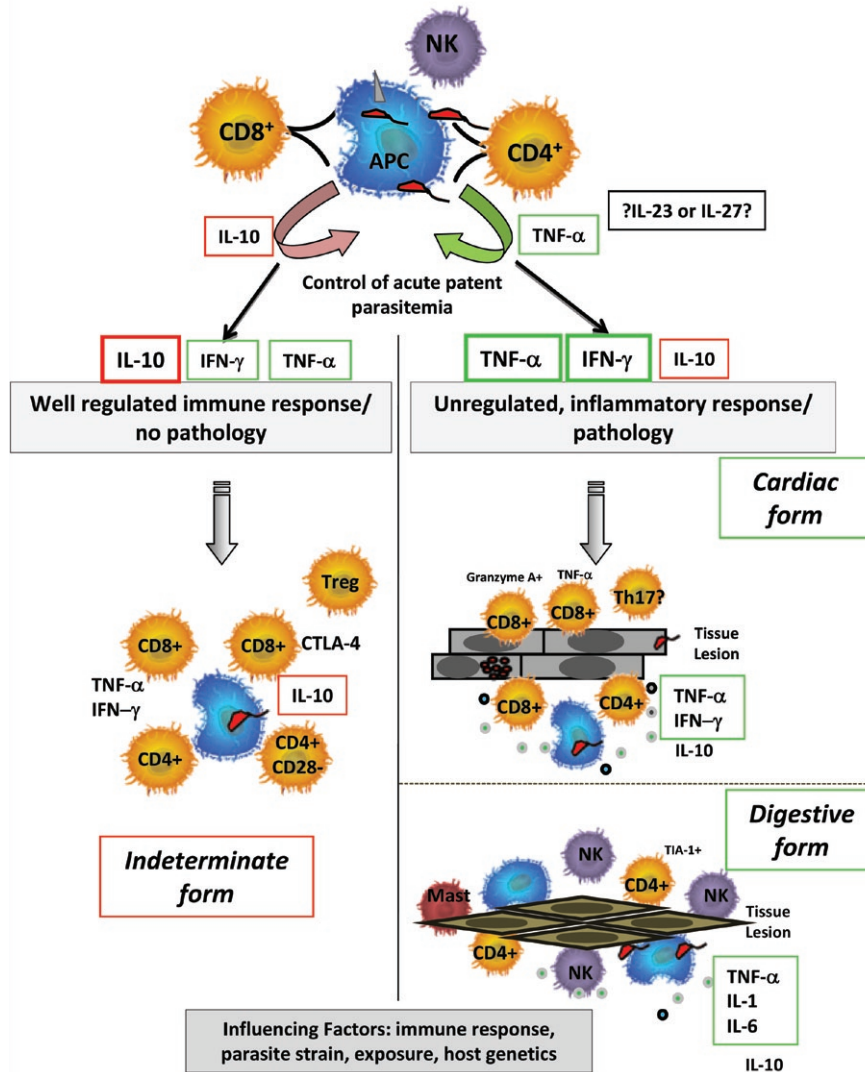


Fig. 3: cytokines and cell populations involved in the generation of protective and pathogenic responses in chronic Chagas disease. Shortly following infection by *Trypanosoma cruzi*, patent parasitemia will be controlled and patients enter the chronic phase of disease. During this phase, differential immune responses may be the defining factor which allow establishment of a well controlled immune response for maintaining the parasite in check (indeterminate clinical form) vs. a response which continues to control patent parasitemia, yet leads to pathology (cardiac and digestive clinical forms). The initial interaction between the parasite and the host is likely key in establishing effective control of patent parasitemia and at the same time is critical in the formation of cytokine microenvironments which could orchestrate subsequent differentiation of regulatory and effector T-cell populations. Depending on the balance between biologically active T-cell subpopulations and their relative life spans, activation thresholds and functional activity, the overall response will be successful in maintaining the indeterminate clinical form or progressing into the more severe cardiac or digestive forms. Several studies have demonstrated that activated CD4 and CD8 T-cells are present in all clinical forms with the production of inflammatory and regulatory cytokines, however, recent studies have also demonstrated differences among clinical forms in terms of relative production of inflammatory cytokines, expression of IL-10 and expression of regulatory molecules such as CTLA-4. To date, the roles of Th17 cells in pathology, or of Treg cells in controlling inflammation are unknown in human Chagas disease. In addition to differential immune responses, several other factors likely influence the differential progression of individuals into distinct clinical forms of Chagas disease including the parasite strain, the strength of inoculation, environmental factors, such as previous immunological experience and nutrition, and host genetics.

for identifying groups of individuals at risk of developing severe disease.

The current picture shows that cardiac chagasic patients display an inflammatory cytokine profile, consistent with the tissue damage observed in these individuals. Moreover, specific cell populations are involved in the establishment of the cytokine environment that favours inflammation. Most importantly, all of the data, taken together, suggest that a lack of control of the inflammatory response is a major cause of pathology establishment in cardiac Chagas disease.

A critical analysis of the data presented in this review suggests that the generation of protective or pathogenic responses in human Chagas disease is highly influenced by the complexity of the immune response generated during *T. cruzi* infection. The anti-parasitic response, crucial for chronification of infection, may work as a double-edged sword if not properly modulated. It is clear that while an activated, inflammatory, response may be beneficial in the early stages of infection, lack of control of this response later on will allow for the establishment of pathology. Fig. 3 summarises the cellular immunological characteristics of the different clinical forms. Parasite, environmental and genetic factors are the key players in the establishment of the different responses. The use of genetic studies to identify groups at risk of developing severe disease opens new perspectives for disease surveillance. However, it is likely that more than one approach needs to be taken towards designing strategies for disease control and prevention. Our ongoing quest for efficient diagnosis, therapy and prevention is fully justified.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To all the researchers whose scientific contributions, cited here or not, have allowed for great progress towards the understanding of Chagas disease.

#### REFERENCES

- Adad SJ, Andrade DC, Lopes ER, Chapadeiro E 1991. Pathological anatomy of chagasic megaesophagus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 443-450.
- Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, Lopes ER 2001. Neuron count reevaluation in the myoenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch* 438: 254-258.
- Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Ponstan M 2006. *T. cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18: 465-471.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341-348.
- Antonelli LR, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KC, Guimaraes LH, Bacellar O, Gollob KJ 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) alphabeta and gammadelta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 74: 6317-6323.
- Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J 2003. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 23-29.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZM, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R 2000. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 182: 634-638.
- Beard CB, Pye G, Steurer FJ, Rodriguez R, Campman R, Peterson AT, Ramsey J, Wirtz RA, Robinson LE 2003. Chagas disease in a domestic transmission cycle, Southern Texas, USA. *Emerg Infect Dis* 9: 103-105.
- Benoist C, Mathis D 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2: 797-801.
- Benvenuti LA, Roggério A, Sambiasi NV, Fiorelli A, Higuchi M de L 2005. Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation: a case report and review of the literature. *Cardiovasc Pathol* 14: 265-268.
- Bocchi EA, Bellotti G, Mocelin AO, Uip D, Bacal F, Higuchi ML, Amato-Neto V, Fiorelli A, Stolf NA, Jatene AD, Pileggi F 1996. Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. *Ann Thorac Surg* 61: 1727-1733.
- Cardoso GM, Morato MJ, Gomes JA, Rocha MO, Bonfim IP, Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Reis MR, Magalhães EF, Correa-Oliveira R 2006. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci* 11: 1158-1163.
- Corbett CE, Ribeiro U Jr, Prianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J 2001. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum* 44: 993-998.
- Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO 2009. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199: 451-454.
- Costa RP, Gollob KJ, Fonseca LL, Rocha MO, Chaves AC, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, Colley DG, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G, Carvalho-Parra J, Dutra WO 2000. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scand J Immunol* 51: 511-519.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39: 41-54.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98: 1709-1712.
- da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D 2007a. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology* 134: 789-796.
- da Silveira AB, Arantes RM, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D 2005. Comparative study of the presence of *T. cruzi* kDNA, inflammation and denervation in



- chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 131: 627-634.
- da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Matsuyama H, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, d'Avila Reis D 2008a. Decreased expression of IK channels in neurons from enteric nervous system is associated with the development of chagasic megacolon. *Hum Pathol* 39: 1406-1407.
- da Silveira AB, D'Avila Reis D, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, Correa-Oliveira R, Furness JB 2007b. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci* 52: 2877-2883.
- da Silveira AB, de Araújo FF, Freitas MA, Gomes JA, Chaves AT, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, da Cunha Souza G, Bernardino Júnior R, Fujiwara R, d'Avila Reis D, Correa-Oliveira R 2009. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol* 70: 65-7.
- da Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB, Correa-Oliveira R, d'Avila Reis D 2008b. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology* 135: 1337-1342.
- da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D 2007c. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* 38: 1256-1264.
- d'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, McCurley T, Correa-Oliveira R, Machado CR 2001. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 177-178.
- Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, Coffman RL, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra JF 2000. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol* 51: 91-97.
- Dutra WO, Gollob KJ 2008. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 21: 287-292.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Júnior GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC 1994. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas disease. *Int Immunol* 6: 499-506.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, Carvalho JF, Colley DG 1996. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol* 43: 88-93.
- Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levin MJ, Berek C 2003. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 68: 242-247.
- Ferreira MS, Nishioka S, Silvestre MT, Borges AS, Nunes-Araujo FR, Rocha A 1997. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 25: 1397-1400.
- Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E 2003. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 407-411.
- Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairana EC, Bacal F, Bocchi E, Guilherme L, Zheng XX, Liew FY, Higuchi ML, Kalil J, Cunha-Neto E 2007. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8<sup>+</sup> T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol* 66: 362-371.
- Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S 2005. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol* 60: 33-67.
- Furness JB 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81: 87-96.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 63: 70-78.
- Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Cançado JR, Cardoso JE, Brener Z, Colley DG 1990. Two models of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas disease: correlations with clinical forms of infection. *Res Immunol* 140: 757-761.
- Girones N, Cuervo H, Fresno M 2005. *T. cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 296: 89-123.
- Gollob KJ, Antonelli LR, Faria DR, Keesen TS, Dutra WO 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 8: 1338-1343.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71: 1185-1193.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Cárdenas A-Arroyo F, Aufderheide A 2000. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 553-555.
- Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE 2007. Domestic dogs and cats as sources of *T. cruzi* infection in rural Northwestern Argentina. *Parasitology* 134: 69-82.
- Hancock K, Zajac AM, Pung OJ, Elvinger F, Rosypal AC, Lindsay DS 2005. Prevalence of antibodies to *T. cruzi* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of Northern Virginia. *J Parasitol* 91: 470-472.
- Hyland KV, Engman DM 2006. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol* 22: 101-102.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL 1993. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-357.
- Kierszenbaum F 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21: 513-516.
- Köberle F 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6: 63-116.
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvão LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 44: 2167-2171.
- Lauella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL 2004. Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *T. cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 189: 909-918.

- Leiby DA, Herron RM Jr, Read EJ, Lenes BA, Stumpf RJ 2002. *T. cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion* 42: 549-555.
- Lemos EM, Reis D, Adad SJ, Silva GC, Crema E, Correa-Oliveira R 1998. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 150-155.
- Levy MZ, Bowman NM, Kawai V, Waller LA, Cornejo del Carpio JG, Cordova Benzaquen E 2006. Periurban *T. cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. *Emerg Infect Dis* 12: 1345-1352.
- Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO 2004. Phenotypic and functional characteristics of CD28C and CD28K cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 137: 129-138.
- Morato MJ, Brener Z, Cançado JR, Nunes RM, Chiari E, Gazzinelli G 1986. Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *T. cruzi* strains and clones. *Am J Trop Med Hyg* 35: 505-511.
- Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Martello FG, Müller NG, Cavalcanti VL, Ianni B, Mady C, Kalil J, Goldberg AC 2006a. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. *Clin Infect Dis* 43: 305-311.
- Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Müller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, Ianni B, Mady C, Kalil J, Goldberg AC 2006b. *BATI*, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 193: 1394-1399.
- Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Borba SC, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J 2008. Variants in the promoter region of *IKBL/NFKBIL1* gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *T. cruzi*-infected individuals. *Mol Immunol* 45: 283-288.
- Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, Drigo SA, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J 2007. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 196: 1836-1843.
- Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG 2007. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation* 115: 1101-1108.
- Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG 1993a. Antibodies to *T. cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas disease. *J Immunol* 150: 1611-1618.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL 1993b. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- $\alpha$  cells and dominance of granzyme AC, CD8C lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 637-642.
- Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 727-743.
- Sosa-Estani S, Segura EL 2006. Etiological treatment in patients infected by *T. cruzi*: experiences in Argentina. *Curr Opin Infect Dis* 19: 583-587.
- Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO 2007. *T. 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* 75: 1886-1894.
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO 2004. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72: 5283-5291.
- 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 2008. Characterization of *T. 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* 60: 25-32.
- Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M 2003. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124: 1748-1757.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM 2004. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 38: 943-950.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 348: 891-892.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724-734.
- 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 2006. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 145: 81-92.
- von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53: 222-228.
- WHO - World Health Organization 2002. *Control of Chagas disease*, WHO Technical Report Series 905, Geneva, 109 pp.