

Daniela Valente Andrade

*Aspectos imunorregulatórios nas fases
aguda e crônica recente da doença de
Chagas : expressão de citocinas e análise
de potencial citotóxico*

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

Belo Horizonte – MG

2012

Daniela Valente Andrade

Aspectos imunorregulatórios nas fases aguda e crônica recente da doença de Chagas : expressão de citocinas e análise de potencial citotóxico

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 Mestre em Biologia Celular.

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

Co-orientadores: Dra. Juliana de Assis Gomes Estanislau, Departamento de
Morfologia – ICB, UFMG

Dr. Kenneth John Gollob, Instituto de Ensino e Pesquisa do Programa da Santa
Casa de Misericórdia-Belo Horizonte e SRI International

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte –MG

2012

Esta dissertação foi desenvolvida nos Laboratórios de Biologia das Interações Celulares do ICB-UFMG e Tropical Diseases Research Program do SRI International, sob a orientação dos professores Dra. Walderez Ornelas Dutra, Dr Kenneth John Gollob e Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.

O trabalho contou, ainda, com a colaboração do Dr. Germano Carneiro (Universidade Federal de Viçosa), Dras. Adriana de Jesus e Dilma de Souza (Secretaria de Estado de Saúde do Pará) e Leonardo Damasceno (Universidade Federal de Minas Gerais).

Agências financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Organização Mundial de Saúde - OMS

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Wal, por confiar no meu trabalho, ensinamentos e por ter me proporcionado a excelente oportunidade de estagiar no SRI International.

Ao meu co-orientador Ken, pelas valiosas contribuições essenciais a esse trabalho.

À minha co-orientadora Juliana, pela colaboração e conselhos.

Aos meus pais, Luis e Márcia, pelo apoio incondicional e exemplos de perseverança.

Aos amigos, por estarem sempre torcendo por mim nos momentos de grande expectativa.

Aos professores do Programa de Biologia Celular, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, pela colaboração.

Ao Dr. Germano Carneiro, pela realização da primeira etapa de coletas do estudo.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, pela agradável convivência.

Aos colegas do SRI International, por terem me acolhido com carinho.

Aos pacientes que se voluntariaram para participar do projeto.

Às CAPES pela concessão da bolsa.

“Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	8
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Resumo	14
Abstract.....	15
1. Introdução.....	16
1.1 Considerações gerais sobre a Doença de Chagas	16
1.2. Considerações gerais sobre o sistema imunológico.....	20
1.3. Eventos imunológicos na infecção inicial com o <i>T.cruzi</i>	24
1.3.1. Resposta imune na infecção aguda experimental.....	25
1.3.2. Reatividade imunológica na doença de Chagas humana	29
2. Justificativa.....	33
3. Objetivos.....	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. Pacientes, material e métodos.....	35
4.1. Seleção dos pacientes.....	35
4.2. Coleta, armazenamento e obtenção de células para citometria de fluxo	38
4.3. Imunofluorescência para análise de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas	38
4.4. Aquisição e análise dos dados	40
4.5. Análise estatística	42
5. Resultados- parte I.....	43
5.1. Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, comparando-se os dados aos obtidos de indivíduos não infectados	43
5.2. Expressão de HLA-DR em linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ em pacientes chagásicos agudos e indivíduos não-infectados	43

5.3. Comparação do perfil de citocinas entre pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados	44
5.3.1. Contribuição das populações celulares para a produção de citocinas em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de indivíduos não infectados.....	45
5.3.2. Balanço de citocinas inflamatórias e modulatórias em pacientes chagásicos agudos, comparando os dados aos obtidos de indivíduos não infectados	47
5.3.3. Análise da correlação da expressão de citocinas em pacientes chagásicos em fase aguda	48
5.4. Expressão de Granzima A em células TCD4 ⁺ , TCD8 ⁺ e CD4 ⁻ CD8 ⁻ de pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados	50
5.4.1. Contribuição das populações celulares para a produção de Granzima A em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de indivíduos não infectados.....	51
5.5. Correlação de células TCD8 ⁺ HLA-DR ⁺ e Granzima A em pacientes chagásicos em fase aguda	52
5.6. Comparação da frequência de células TCD8 ⁺ Granzima ⁺ produtoras de IL-6, IL1- β e TNF- α em pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados	52
6. Resultados- parte II.....	54
6.1. Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, comparando os dados aos obtidos de pacientes chagásicos em fase crônica recente	54
6.2. Perfil de citocinas em pacientes chagásicos agudos, comparando-se os dados dos mesmos em fase crônica	54
6.2.1. Contribuição das populações celulares na produção de citocinas em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de indivíduos não infectados.....	55
7. Discussão	57
8. Conclusão	65
9. Referências	66

Lista de abreviaturas

Ag- paciente chagásico agudo

APC- célula apresentadora de antígeno

CD – *cluster of differentiation*

Chg – paciente chagásico agudo

Cr – paciente chagásico crônico

CMSP – células mononucleares do sangue periférico

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CTLA-4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

DN – duplo negativa

FITC- isotiocianato de fluoresceína

Gran- Granzima A

HLA- antígeno leucocitário humano

IFN- γ – interferon gama

IgG- imunoglobulina G

IL- interleucina

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

NI – indivíduo não infectado

NO- óxido nítrico

NK – *natural killer*

PBS – *phosphate buffer solution*

PE – ficoeritrina

TCR – receptor de célula T

T. cruzi- Trypanosoma cruzi

Th- linfócito T *helper*

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

WHO – *World Health Organization*

$\alpha\beta$ - alfa beta

$\gamma\delta$ – gama delta

Lista de Figuras

- Esquema 1: Relação entre as formas clínicas da Doença de Chagas e ativação do sistema imune..... 18
- Esquema 2: Fenômenos imunológicos estabelecidos na infecção inicial com o *T. cruzi*. .. 25
- Esquema 3: Representação das etapas de execução do projeto..... 35
- Esquema 4: A. Gráfico dot-plot representativo do perfil da localização dos linfócitos de acordo com o tamanho e granulosidade, população essa alvo de nosso interesse B. Distribuição representativa em *dot-plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais não relacionados marcados com PerCpCy5.5 (controle isotípico); C. Gráfico *dot-plot* representativo do perfil obtido para marcação de moléculas de superfície CD4-APCCy7 e CD8-PercpCy5.5. Dentro do quadrante Q1, selecionamos a população positiva para CD4 (R1)..... 41
- Esquema 5:A. Histograma referente à fluorescência observada para marcação de controle de isotipo IgG1- PercpCy5.5 dentro de R1 B. Histograma referente à fluorescência observada para marcação de CD8- PercpCy5.5 dentro de R1..... 41
- Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.** Figura 1: Análise da frequência de células TCD4+ (A), TCD8+ (B) e CD4-CD8- (C) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (barras escuras, n=27) e não infectados- NI (barras claras, n=5). Células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-fluorocromo APCCy7 e anti-CD8-fluorocromo PercpCy5.5 para determinação da frequência de populações, conforme descrito em materiais e métodos. As barras representam as médias \pm desvio-padrão. 43
- Figura 2: Análise da frequência de células TCD4+HLA-DR+ (A) e TCD8+ HLA-DR+ (B) no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (barras escuras, n=27) e indivíduos não-infectados-NI (barras claras, n=5). Células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-fluorocromo APCCy7, anti-CD8-fluorocromo PercpCy5.5 e anti- HLA-DR-fluorocromo V500 para definição das frequências das populações TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando HLA-DR, conforme descrito em materiais e métodos. As barras representam as médias \pm desvio-padrão. * representa diferença significativa com $p < 0.05$ 44
- Figura 3: Análise de razão das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela citocina modulatória IL-10 em linfócitos totais do sangue periférico de pacientes chagásicos agudos agudos-Chg (barras escuras, n=27) e indivíduos não-infectados NI (barras claras, n=5). As barras representam as médias \pm desvio-padrão. * representa diferença significativa com $p < 0.05$ 48
- Figura 4: Análise de correlação das citocinas inflamatórias IFN- γ (A), IL-17 (B), IL1- β (C), IL-6 (D) e TNF- α (E) com a citocina IL-10 em pacientes chagásicos em fase aguda (n=27).49

Figura 5: Análise da correlação da frequência de células TCD8+Granzima A+ e células TCD8+HLA-DR+ no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=20)... 52

Figura 6: Análise da frequência de células TCD4+ (A), TCD8+ (B) e CD4-CD8- (C) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda-Ag e crônica recente - Cr. 54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação dos pacientes voluntários participantes do estudo e respectivas datas de coleta	37
Tabela 2: Relação dos anticorpos monoclonais para identificação de moléculas de superfície	39
Tabela 3: Relação dos anticorpos monoclonais para identificação de moléculas intracitoplasmáticas	39
Tabela 4: Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4 ⁺ , TCD8 ⁺ e CD4 ⁺ CD8 ⁻ positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (n=20) e indivíduos não infectados-NI (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre grupos Chg e NI estão indicadas por **.	45
Tabela 5: Análise da proporção das populações celulares na expressão de citocinas presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=20) e indivíduos não infectados (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.	47
Tabela 6: Porcentagem de expressão de granzima a dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4 ⁺ , TCD8 ⁺ e CD4 ⁺ CD8 ⁻ positivas para Granzima A presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (barras escuras, n=20) e não infectados- NI (barras claras, (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.	51
Tabela 7: Análise da proporção das populações celulares expressando Granzima A no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=20) e indivíduos não infectados (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.	51
Tabela 8: Análise da frequência de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , e IL-6 em células TCD8 ⁺ Granzima ⁺ no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (n=20) e indivíduos não-infectados-NI (n=5). **. representa diferença significativa com p<0.05. ...	53
Tabela 9: Porcentagem de expressão de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4 ⁺ , TCD8 ⁺ e CD4 ⁺ CD8 ⁻ positivas para essas citocinas presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Ag (n=7) e crônicos-Cr (n=7). Para determinar se há diferença entre os grupos foi utilizado o Teste T pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ag e Cr estão indicadas por **.	55

Tabela 10: Análise da proporção das populações celulares para a produção de cada uma das citocinas no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda-Ag (n=7) e crônica recente -Cr (n=7). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ag e Cr estão indicadas por **. 56

Resumo

Uma vez considerada uma doença endêmica de áreas rurais, a doença de Chagas hoje apresenta um novo perfil de incidência, dada a sua disseminação em áreas não endêmicas principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e surgimento de surtos de contaminação por via oral. Apesar de ter sido descoberta há mais de cem anos, a doença de Chagas ainda é negligenciada, destacando-se que um dos grandes desafios no tocante a ela consiste na identificação de biomarcadores de prognóstico e evolução clínica diferencial em indivíduos cronicamente infectados. Deve-se ressaltar que a falta de entendimento aprofundado da fase aguda da doença em humanos, ainda muito pouco estudada, representa um profundo entrave a esses avanços, dado que os eventos imunológicos que são desencadeados na fase aguda podem ser determinantes para a progressão da doença na fase tardia. Dessa forma, nosso trabalho objetivou caracterizar o perfil imunológico de pacientes de área endêmica em fase aguda da doença, determinando o perfil de ativação celular e expressão de citocinas utilizando como metodologia a citometria de fluxo. A segunda etapa do nosso projeto consistiu em avaliar os parâmetros imunológicos dos mesmos pacientes que participaram da primeira etapa do estudo, e que agora se encontram em fase crônica recente, comparando-se os dados da fase aguda com a fase crônica recente. Nossos resultados mostraram que, na fase aguda, há predomínio de populações celulares ativadas, como demonstrado pelo aumento da frequência de células TCD4⁺HLA-DR⁺. Com relação ao perfil de citocinas, observou-se menor frequência de células TCD4⁺ expressando IL-10 e IL-17 em pacientes chagásicos em fase aguda comparando-se a indivíduos não infectados. A partir da análise de contribuição das populações celulares na expressão das citocinas analisadas, destaca-se a importância das células TCD4⁺CD8⁻ como principal fonte tanto de IFN- γ quanto de IL-10 em pacientes chagásicos agudos. A avaliação do potencial citotóxico mostrou que, nos pacientes chagásicos em fase aguda, as células TCD4⁺ são a principal fonte de Granzima A. Observou-se que há aumento significativo da frequência de células CD8⁺granzima A⁺ expressando as citocinas IL-1 β e TNF- α . A evolução da fase aguda para a fase crônica recente não é acompanhada por alteração na frequência das populações celulares TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻, porém a avaliação do perfil funcional mostrou diferenças significativas quanto ao padrão de expressão de citocinas. O estudo da fase crônica recente revela que há menor frequência de células TCD8⁺ expressando IFN- γ comparando-se aos dados obtidos da fase aguda, sendo também observado que, nos pacientes de fase crônica recente, a principal fonte produtora de IFN- γ são as células TCD4⁻CD8⁻. Nossos dados são amplos e de grande contribuição para a caracterização da fase aguda e, ao acompanharmos os fenômenos imunológicos ao longo da progressão da doença, fornecemos consistente embasamento para a construção de ferramentas que possam ser usadas para o prognóstico e monitoramento, assim como novas formas terapêuticas na doença de Chagas.

Abstract

Chagas disease is an infectious disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* that affects approximately 10 million people. Once a neglected disease from poor areas in Latin American countries, it has now spread to nonendemic areas due to globalization, bringing Chagas disease to a global threat status. Despite high mortality and morbidity rates, patients

are challenged by the lack of a specific effective therapy and biomarkers of disease progression. Considering the range of immunological events elicited during acute infection and its association with distinct clinical aspects and disease outcome, the understanding of cell populations and molecules are a very attractive lead for development of a successful immunotherapy. Considering this, our cutting-edge work aims to identify specific cell populations and/or cytokines elicited during the acute phase that could be determinant to disease evolution towards a protective or pathological condition in the chronic phase. We compared the immunological profiles of patients in the acute phase and after they entered the chronic phase, at an early stage. Considering that major T cell populations play an important role in the immunopathology of human Chagas disease, we evaluated the frequency of CD4⁺, CD8⁺ and TCD4⁻CD8⁻ (double negative - DN) T cells in acute Chagasic patients (Chg) and non-infected individuals (NI). Similar frequencies of these cell populations between Chg and NI groups were observed. Induction of effector mechanisms by T cells is extensively dependent on their activation profile, which was evaluated by the expression of the surface molecule HLA-DR. We demonstrated that Chg display higher levels CD4⁺HLA-DR⁺ compared to NI. Following T cell activation, establishment of immune responses directed against *T. cruzi* infection is extensively based on the fine balance of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. We observed that DN T cells are compromised with production of IFN- γ and IL-10 in acute chagasic patients. In conjunction with cytokines, we evaluated the involvement of cytotoxic events in the immune responses against *T. cruzi* infection. By analyzing the expression of Granzyme A in CD8⁺ T cells, we demonstrated that, although there is no expansion of CD8⁺Granzyme A⁺ cells in Chg compared to NI, expression of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-1- β in CD8⁺Granzyme A⁺ cells was higher in the first group. In our follow-up study, we compared the immunological profile of chagasic patients in the acute (Ac) and chronic (Chr) phase. As disease progresses to chronic phase, we observed a lower frequency of CD8⁺ IFN- γ . This data, altogether, show an activated immune profile of patients in acute phase and as disease progresses, cell populations with distinct functional could be controlling an exacerbated inflammatory response.

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre a Doença de Chagas

Descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas é causada por infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual foi identificado no sangue de uma criança febril de dois anos de idade no norte de Minas Gerais. Carlos Chagas foi protagonista de um fato inédito na história da medicina, uma vez que foi ele que desvendou todo o ciclo da doença, agente infeccioso e reservatórios silvestres do parasito. Além disso, o médico e pesquisador descreveu a sintomatologia apresentada pelos doentes acometidos pela parasitose (Chagas, 1909).

Aproximadamente 10 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* na América Latina, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Nos países da América do Central e do Sul, a doença de Chagas representa uma séria questão de saúde pública, apresentando elevada prevalência, além de alta morbidade e mortalidade (Dias et al., 2002). Como qualquer outra doença parasitária, a doença de Chagas está intimamente relacionada ao desenvolvimento social e econômico uma vez que precárias condições de vida facilitam a domiciliação do inseto vetor (WHO, 2002). Embora gere um grande impacto sócio-econômico, a doença de Chagas é ainda negligenciada, isso porque, em diversas áreas, o controle epidemiológico é precário, os tratamentos atualmente disponíveis tem maior eficácia apenas quando administrado na fase aguda da doença e biomarcadores de prognóstico e risco para o desenvolvimento das formas mais graves da doença são inexistentes.

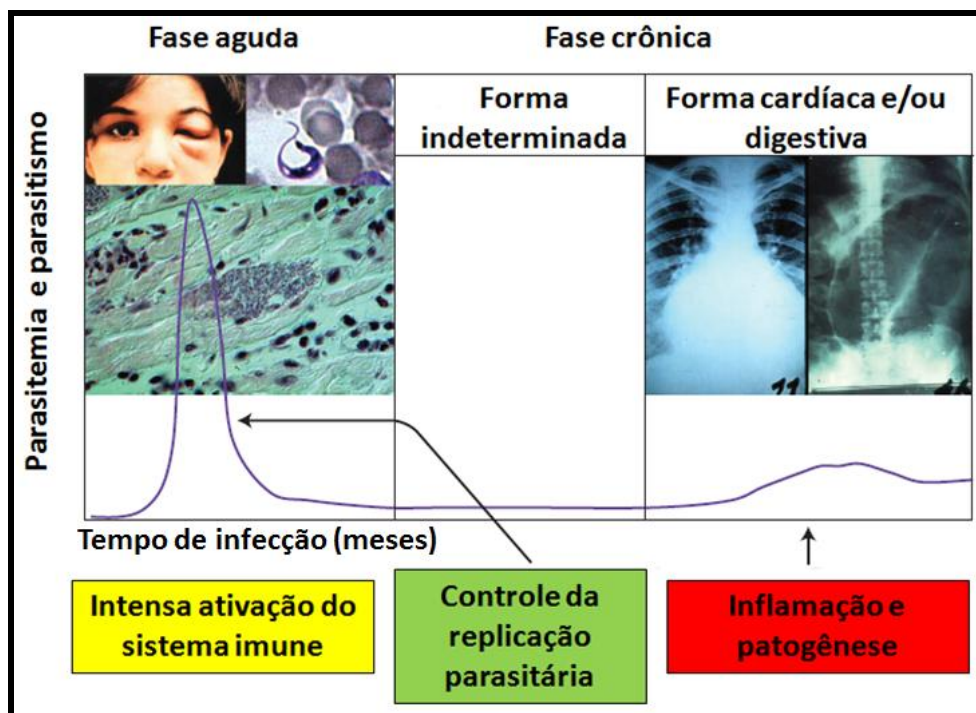
A transmissão vetorial da doença é o mecanismo primário de difusão da doença de Chagas, sendo conhecida a existência de vetores desde o sul dos Estados Unidos à Argentina. São mais de cem espécies responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *T. cruzi* (Vinhaes e Dias, 2000), das quais 48 são encontradas no Brasil e 30 dessas identificadas em ambientes domiciliares. As espécies com maior importância na transmissão da doença ao homem são *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (Ministério da Saúde, 2005). A implementação 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 transmissão por via vetorial descritos recentemente mostram a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica no país (Borges et al., 2006).

Uma vez considerada uma endemia rural, atualmente a doença de Chagas apresenta um novo perfil de incidência, devido à transmissão alternativa por transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Nesse contexto, o intenso fluxo migratório de indivíduos infectados afetou centros urbanos e inclusive países não endêmicos onde não foram implementadas

medidas de vigilância contra o *T. cruzi* nos bancos de sangue e órgãos, ou se as foram, aconteceram recentemente, de forma que a doença de Chagas tem alcançado índices epidemiológicos alarmantes (Bern et al., 2011). Nos Estados Unidos, estima-se que 300.000 pessoas estejam infectadas (Bern et al., 2011, Di Girolamo et al., 2011), enquanto que na Europa dados epidemiológicos estimam haver 59.000 a 108.000 casos de doença de Chagas, destacando-se Espanha e Itália com o maior número de casos (Angheben et al., 2011).

Outra via alternativa de contaminação que tem contribuído para o novo perfil de incidência da doença de Chagas ocorre por ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi* (Steindel et al., 2008; Barbosa, 2006), a qual representa atualmente o principal modo de transmissão no Brasil (Coura et al., 2007). No Brasil, foram relatados, desde 1965, numerosos surtos de contaminação por via oral nos estados do Rio Grande do Sul, Amapá, Pará, Santa Catarina e Bahia (Pinto et al., 2004., Dias et al., 2008), requerendo atenção por parte das agências públicas, devido às sérias consequências epidemiológicas. Atualmente os principais focos são encontrados na região Amazônica devido, principalmente, ao consumo de suco de açaí. Nas imediações das áreas de produção e manuseio do suco, o inseto vetor é moído em meio ao açaí (Yoshida et al., 2009). Estudos em modelos animais mostraram que os tripomastigotas invadem a mucosa gástrica epitelial e uma vez interagindo com componentes estruturais do hospedeiro, exacerbam a capacidade invasiva do parasito (Covarrubias et al., 2007). Embora ainda não comprovadas em humanos, essas observações poderiam explicar a gravidade dos sintomas apresentados por pacientes infectados por via oral (Bastos et al., 2010), cujas taxas de mortalidade são altas, principalmente no período após duas semanas de infecção e acometimento cardíaco é observado em 80% dos indivíduos (Pinto et al., 2004; Dias et al., 2008).

Na evolução da doença de Chagas são observadas duas fases distintas, a aguda e a crônica (Esquema 1), baseadas em critérios clínicos e laboratoriais.



Esquema 1: Relação entre as formas clínicas da Doença de Chagas e ativação do sistema imune. Adaptado de Junqueira et al., 2010. Após infecção com o parasito, o paciente apresenta alta parasitemia e parasitismo, caracterizando a fase aguda da doença, com duração de dois a quatro meses. Devido à intensa ativação do sistema imune, há controle da replicação do parasito, de forma que há diminuição dos níveis de parasitemia e parasitismo, dando início à fase crônica. A fase crônica apresenta quatro formas clínicas distintas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Estima-se que 70% dos infectados chagásicos apresentem a forma indeterminada da doença e, embora o prognóstico desses pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses pacientes podem evoluir, anualmente, para as formas sintomáticas da doença, sejam essas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva com distintas manifestações patológicas que refletem o grau de morbidade associado à infecção.

A fase aguda, que persiste pelos primeiros dois a quatro meses de infecção, é caracterizada por elevada parasitemia e parasitismo tecidual. Essa fase pode ser aparente - na qual o paciente apresenta sinais de “porta de entrada” para o parasito e manifestações sistêmicas clássicas, tais como febre, mal-estar, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia - ou inaparente, frequentemente apresentando somente um quadro febril passageiro e inespecífico. Estudo longitudinal com duração de 30 anos, realizado em Minas Gerais por Dias e colaboradores (1982), concluiu que pacientes que apresentaram sintomas exacerbados na fase aguda da doença desenvolveram sintomas graves na fase crônica. Assim, faz-se necessária intervenção quimioterápica o mais precocemente possível, uma vez que as taxas de sucesso, que variam de 30 a 80% dos pacientes tratados (Sosa-Estani e Segura, 2006), são maiores quanto mais precocemente o tratamento for administrado.

O curso da doença após a fase aguda é imprevisível. Dados obtidos por Prata (2001) mostraram que 5 a 10 % dos pacientes sintomáticos morrem na fase aguda. Na maioria dos casos agudos, porém, os sintomas desaparecem espontaneamente e os indivíduos evoluem para a fase crônica, na qual a queda da parasitemia ocorre em consequência da resposta imune efetora do hospedeiro.

A fase crônica apresenta quatro formas clínicas distintas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva, as quais podem ser observadas ao longo dos anos após a infecção. Um dos intrigantes aspectos da fase crônica são os intensos processos inflamatórios associados a uma escassez parasitária (Andrade, 1999). Sabe-se, no entanto, que as distintas manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são consequência de múltiplos fatores relacionados tanto ao parasito (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo), quanto ao hospedeiro (idade, sexo, raça e perfil da resposta imune) (Dias et al., 2002).

A existência de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* que não apresentam manifestações clínicas da doença foi reconhecida, ainda em 1916, pelo pesquisador Carlos Chagas, o qual então elaborou o termo “forma crônica indeterminada”. Esses pacientes são assintomáticos, apresentam exames radiográficos e eletrocardiográficos normais, de maneira que a doença é evidenciada apenas pela positividade em testes sorológicos específicos (Rocha et al., 2003). Estima-se que aproximadamente 70% dos infectados chagásicos apresentem essa forma da doença e, embora o prognóstico desses pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses pacientes podem evoluir, anualmente, para as formas sintomáticas da doença (Dias et al., 1989).

A forma clínica cardíaca, principal manifestação mórbida da doença de Chagas, incide em aproximadamente 20-30% dos pacientes crônicos, os quais manifestam distúrbios de condução e contratilidade do coração, e consequente surgimento de arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (Rocha e al., 2003). A cardiopatia chagásica crônica é a principal responsável pela elevada morbidade-mortalidade da doença, com grande impacto social e médico-trabalhista (Dias et al., 2002).

Alterações anatômicas e funcionais do trato gastrointestinal caracterizam a forma digestiva da doença de Chagas, a qual acomete 5 a 10% dos pacientes crônicos. Nesses pacientes, ocorre denervação da musculatura lisa que reveste a parede do tubo digestivo, ocasionando dificuldades na deglutição e defecação. Além dessas manifestações, há dilatação de estruturas esofagianas e intestinais, mais conhecidas como megas (de Oliveira et al., 1998).

A associação de distúrbios nos sistemas cardíaco e digestivo caracteriza a forma cardiodigestiva da doença de Chagas, a menos freqüente entre os pacientes (Dias et al., 1989), porém com alto grau de morbidade.

Considerando-se os aspectos imunológicos, o longo período assintomático em que alguns pacientes permanecem estabelece-se devido a uma resposta imune eficiente. Em uma proporção significativa dos pacientes, porém, fatores ainda não completamente elucidados causam um distúrbio na regulação da resposta imune, favorecendo o surgimento de manifestações patológicas que refletem o grau de morbidade associado à infecção. Nesse contexto, o entendimento mais aprofundado dos mecanismos celulares e humorais desencadeados pela infecção inicial com o *T. cruzi* é de fundamental relevância para compreensão dos fenômenos imunológicos na cronificação diferencial da doença.

1.2. Considerações gerais sobre o sistema imunológico

O sistema imunológico constitui-se de células e moléculas que reconhecem e interagem com componentes do próprio organismo e com agentes agressores. No contexto da infecção parasitária, por exemplo, a resposta imune é capaz de controlar os níveis de parasitemia e parasitismo, conferindo resistência à infecção. Por outro lado, se a homeostasia do sistema imune não for alcançada, pode induzir patologia associada ao parasitismo.

A imunidade inata consiste de mecanismos celulares e moleculares existentes anteriormente ao estabelecimento de uma infecção, representando a linha de defesa inicial contra os microrganismos. Os componentes celulares mais importantes são os fagócitos (neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas) e algumas populações celulares como células *natural killers* (NK), células NKT e células dendríticas plasmocitóides, além de mastócitos, basófilos e eosinófilos (revisto por Pluddemann et al., 2011). Os componentes bioquímicos, por sua vez, constituem-se de proteínas do sistema do complemento, mediadores da inflamação e de citocinas, que coordenam diversas atividades da imunidade inata, inclusive conectando-a à resposta adaptativa.

O sistema de reconhecimento do sistema imune inato é caracterizado pela identificação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), por meio de receptores denominados “receptores de reconhecimento de padrões” (PRRs) nas células do sistema imune inato do hospedeiro (Kumar et al. 2011). Distintas classes de PRRs foram descritas até o momento, dentre eles os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores

semelhantes a NOD (NLRs) e receptores de DNA. O reconhecimento de PAMPs induz rapidamente as respostas imunes no hospedeiro, via ativação de cascatas de sinalização que induzem respostas inflamatórias mediadas, principalmente, por citocinas e quimionas (Takeuchi e Akira, 2010).

O sistema imune adaptativo é composto por células que reconhecem especificamente determinantes antigênicos variados. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, que se destacam pela produção de anticorpos. Esses linfócitos também ativam outras células do sistema imune, tanto por meio da produção de mediadores protéicos quanto pela função de apresentação de antígenos. Os linfócitos T, por sua vez, são células centrais na resposta imune e, de acordo com a expressão das moléculas co-receptoras CD4 e CD8, são categorizadas em quatro grupos: linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, T CD4⁻CD8⁻ e TCD4⁺CD8⁺. 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⁺ 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 (revisto por Coffman, 2006). Os linfócitos TCD8⁺ desempenham atividades efetoras importantes para a eliminação de patógenos intracelulares, sendo conhecidos como citotóxicos (revisto por Shresta et al., 1998). A definição de se um linfócito T será CD4⁺ ou CD8⁺ acontece ainda no timo, em um processo denominado seleção positiva, que envolve diferentes etapas de reconhecimento celular (revisto por Germain, 2002). As células duplo negativas (DN) seriam amadurecidas no timo por meio do escape da seleção negativa, seguida por uma migração para periferia e possível expansão quando expostas a um antígeno (Dácquisto e Crompton, 2011). Em modelos experimentais, acredita-se que essas células são selecionadas por reconhecerem antígenos apresentados por moléculas não clássicas de MHC (revisto por Kronenberg e Engel, 2007). Em humanos, o processo de seleção dessas células ainda não foi completamente elucidado. Em diversos modelos de infecção, as células T DN estão associadas como sendo altas produtoras de IL-17, uma citocina pró-inflamatória (Cowley et al., 2010), porém estudos mais recentes têm demonstrado que essa subpopulação celular também está envolvida em imunossupressão (Priatel et al., 2001, Wang et al., 2002). Células T duplo positivas CD4⁺CD8⁺ foram encontradas no sangue periférico de humanos representando de 1 a 3% do total de população linfocitária, mas tal frequência pode aumentar em condições de inflamação (Parel et al., 2007). Embora seja minoritária, essa subpopulação é

altamente diferenciada no fenótipo de memória (CD45RO⁺) sendo células da imunidade adaptativa muito atuantes no combate a infecções (Nascimbeni et al., 2004).

Independentemente da subpopulação de célula T, sua ativação depende do reconhecimento de determinantes antigênicos. Essas etapas exigem a participação de células apresentadoras de antígenos (Al-Daccak et al., 2004), que são as células dendríticas, os fagócitos mononucleares e, em algumas circunstâncias, linfócitos B. As células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam moléculas de superfície codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Classicamente, o reconhecimento de peptídeos pelas células T depende da ligação dos peptídeos às moléculas de MHC, as quais apresentam duas classes estruturalmente diferentes, designadas como MHC classe I e MHC classe II (McDevitt, 2000). O MHC classe I é encontrado nas células nucleadas, ligando-se a peptídeos derivados de proteínas citosólicas e reconhecido por células TCD8⁺. O MHC II, por sua vez, se liga a peptídeos derivados de proteínas endocitadas, sendo encontrado na membrana das APCs e reconhecidas por linfócitos TCD4⁺. O HLA-DR é um dos produtos do gene do MHC de classe II humano (Prince et al., 1991) que também passa a ser expresso em linfócitos T após ativação, porém temporalmente após uma outra molécula marcadora de ativação, o CD69.

O complexo estável de peptídeo/MHC formado na membrana plasmática das APCs liga-se ao receptor de células T (TCR) (Guermontprez et al., 2002). Na maioria das células T, o TCR é composto de duas cadeias polipeptídicas transmembrânicas, ligadas por pontes bissulfeto denominadas α e β (Pennington et al., 2005). Associadas ao heterodímero TCR $\alpha\beta$, as proteínas CD3 e ζ tem função de transduzir o sinal após reconhecimento do antígeno, efetivando a ativação das células T (Risueno et al., 2008).

Encontradas no sangue periférico em menor proporção (2 a 4% das células T) e também nos tecidos linfóides periféricos, as células T com TCR composto por cadeias γ e δ são de grande relevância, uma vez que contribuem em todos os aspectos da resposta imune, participando da defesa contra vírus, bactérias, parasitos e tumores (Champagne, 2011). As células T com TCR $\gamma\delta$, embora com atividades biológicas semelhantes às células T com TCR $\alpha\beta$, apresentam algumas peculiaridades. Dados recentes mostraram que antígenos solúveis podem ativar células T com TCR $\gamma\delta$ mesmo na ausência de APCs (Born e O' Brien, 2009).

O reconhecimento de antígenos pelas células T DN ocorre, principalmente, no contexto de moléculas de MHC não clássicas, as moléculas CD1, as quais são glicoproteínas associadas a microglobulina $\beta 2$ expressa pela maioria das células apresentadoras de antígenos

(Spada et al., 2000). Estas células são particularmente ativadas por lipídeos e carboidratos, ao invés de peptídeos protéicos como o são as células T CD4⁺ ou CD8⁺.

Além do sinal fornecido pela ligação do antígeno ao seu receptor, as células T necessitam de um segundo sinal essencial para a proliferação, sobrevivência e função efetora dessas células. Esse sinal é fornecido por moléculas denominadas co-estimuladoras, proteínas de membrana expressas nas APCs e que se ligam a receptores específicos na superfície das células T. A via mais caracterizada é a interação CD28/CD80 e CD86. O CD28 é uma glicoproteína transmembrana constitutivamente expressa em células T virgens, e cuja expressão é perdida com a ativação celular (Vallejo et al., 2005). As moléculas CD80 e CD86, por sua vez, são induzidas nas células apresentadoras de antígenos após estimulação (revisito por Goronzy e Weyand, 2008). Após interagir com seu ligante, a cauda citoplasmática do CD28 interage com moléculas sinalizadoras que induzem a síntese de IL-2, citocina que atua como fator de crescimento autócrino e parácrino, estimulando a proliferação linfocitária e impedindo o estado de anergia (Frauwirth e Thompson, 2002). Estruturalmente semelhante ao CD28, o CTLA-4 é membro da família das imunoglobulinas expresso após estimulação celular (Greenwald et al., 2005). Ao contrário do CD28, o CTLA-4 ao ligar-se com CD80 ou CD86, inibe a ativação dos linfócitos T, seja por regulação da expressão de moléculas acessórias, interferência no ciclo celular ou na síntese de IL-2 (Chen, 2011).

O processo de ativação e proliferação de células T deve ser finamente regulado, uma vez que o estado funcional dessas células pode determinar uma condição de proteção ou patogênese. Nesse contexto, mediadores protéicos denominados citocinas são elementos fundamentais na regulação da magnitude das respostas imunes inatas e adaptativas (Guidotti e Chisari., 2006). Inúmeras citocinas já foram descritas, estando citadas abaixo algumas cuja participação é importante na resposta imunológica durante a infecção experimental ou humana pelo *T. cruzi*.

A IL-12 é a principal citocina mediadora da resposta imune inata (Ma e Trinchieri, 2001), sendo secretada principalmente pelos fagócitos mononucleares ativados e células dendríticas. A secreção de IL-12, citocina pró-inflamatória, é crítica para estimular a produção de IFN- γ pelas células NK e pelas células T (Rogge et al., 1997). O IFN- γ é uma citocina inflamatória produzida principalmente por células T CD4⁺, T CD8⁺, T CD4⁻CD8⁻ e células NK, muitas vezes em resposta ao sinal de ativação de IL-12 (Pestka et al., 2004). A apresentação de antígenos é potencializada por essa citocina, a qual aumenta a expressão de MHC I e II. É a principal citocina ativadora de macrófagos, exacerbando a função

microbicida dessas células e recrutando-os para o sítio da infecção e estimulando a produzir outras citocinas, como TNF- α (Trinchieri, 2004). O TNF- α , cujas principais fontes celulares são os fagócitos mononucleares, estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os focos de infecção. A citocina IL-6, originalmente identificada como fator de diferenciação dos linfócitos B, tem propriedades inflamatórias (Stelzer et al., 2012). Ao contrário destas, a IL-10, produzida por células Th1 e Th2, além de células T reguladoras e da imunidade inata, tem propriedades antiinflamatórias (O'Garra et al., 2008), inibindo a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas. Enquanto IL-10 tem papel regulador das respostas inflamatórias, de forma a evitar danos teciduais excessivos, a citocina IL-17 tem efeitos pró-inflamatórios intensos e induz dano tecidual no decorrer de doenças autoimunes (revisado por Bettelli et al., 2008). No entanto, trabalhos recentes tem sugerido um papel protetor de IL-17, não associado à destruição tecidual em condições inflamatórias (Guedes et al., 2012; Magalhães et al., 2012).

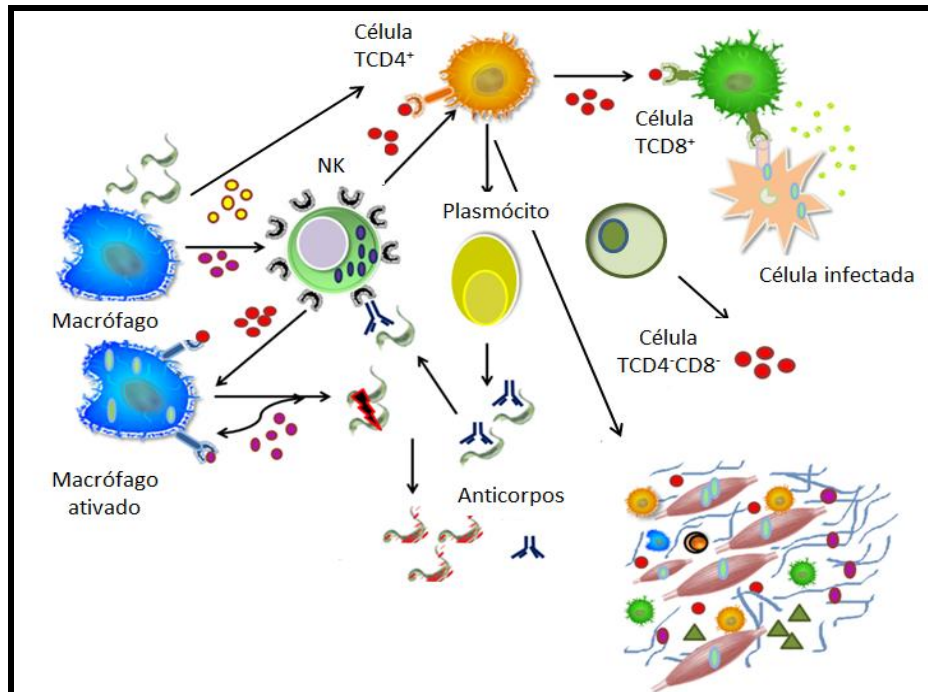
Considerando-se a variedade de células e mediadores químicos, o estudo dos mecanismos envolvidos nas interações entre as células e patógenos constitui ferramenta importante para compreensão das dinâmicas que levam à cura ou ao desenvolvimento de processos patológicos.

Diante do exposto, podemos afirmar que há diversos mecanismos complexos envolvidos nas respostas imunes, os quais mantêm a homeostase do sistema. A infecção com o *T. cruzi* gera um distúrbio nesta rede, de forma que a reatividade decorrente da infecção, embora seja imprescindível para controlar a replicação parasitária, pode desencadear dano tecidual e conseqüente quadro patológico. Dessa forma, um fino balanço da reatividade imunológica é crítico para a proteção do hospedeiro.

1.3. Eventos imunológicos na infecção inicial com o T.cruzi

Assim como em outras infecções por patógenos intracelulares, a infecção do hospedeiro pelo *T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos celulares e humorais da imunidade inata e adquirida (Esquema 2). Os mecanismos imunológicos que controlam a infecção natural ou experimental pelo *T. cruzi* têm sido muito estudados nas últimas décadas. Hoje está bem estabelecido que células e mecanismos efetores do sistema imune desencadeados na infecção inicial com o *T. cruzi* são fundamentais para o controle da replicação parasitária,

porém se a resposta imune não for devidamente controlada, pode induzir patologia associada ao parasitismo.



Esquema 2: Fenômenos imunológicos estabelecidos na infecção inicial com o T. cruzi. Os macrófagos são alvos de infecção pelo T. cruzi, os quais secretam a citocina IL-12, que ativa células NK a produzirem a citocina IFN- γ . Esta age reciprocamente sobre macrófagos, ativando-os para a atividade microbicida. Enquanto os mecanismos efetores da resposta imune contribuem para reduzir e controlar a replicação do parasito nos tecidos, ela também prepara e otimiza o sistema imune para gerar uma resposta adquirida eficaz, a qual é mediada por células TCD4⁺ e células TCD8⁺. As células TCD4⁺ ativam linfócitos B, auxiliando na produção de anticorpos líticos protetores. As células CD4⁻CD8⁻ produzem citocinas, como o IFN- γ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasito em células infectadas. Outro ponto importante para a efetivação das respostas imunes consiste no recrutamento de leucócitos para áreas de injúrias, sendo a citocina IFN- γ importante na modulação da produção de quimiocinas, que direcionam o infiltrado inflamatório observado durante as fases aguda e crônica. Essa cascata de fenômenos imunológicos é bem descrita em modelos murinos e embora a tradução para a patologia em humanos deva ser criteriosa, eles elucidaram muitos aspectos inerentes à infecção com o T. cruzi.

1.3.1. Resposta imune na infecção aguda experimental

O sistema imune inato tem participação em pelo menos dois aspectos importantes da infecção com o *T. cruzi*: o controle da replicação parasitária e geração das reações inflamatórias em tecidos infectados do hospedeiro, que, concomitante ao papel protetor, são causadoras de dano tecidual e disfunção dos sistemas.

A ativação de macrófagos é um fenômeno relevante do sistema imune inato que confere resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Seguindo-se à fagocitose dos parasitos, os macrófagos produzem, principalmente, as citocinas inflamatórias IL-12 e TNF- α , as quais, agindo sobre as células NK, estimularão a produção de IFN- γ por essas (Silva et al., 1992). A citocina IFN- γ mostra-se atuante na redução da parasitemia e da mortalidade nos animais infectados, ativando os macrófagos e consequente produção de derivados de oxigênio, os quais são tóxicos ao parasito (Silva *et al.*, 1992; Cardillo et al., 1996; Holscher et al., 1998; Silva et al., 1995; Vespa et al., 1994).

No entanto, dados experimentais mostram que o sistema imune se auto regula, de forma a reduzir a ativação dos macrófagos e a produção local de NO. Estudos *in vitro* mostraram que as citocinas IL-10 e TGF- β inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ (Silva et al., 1991, Roffê et al., 2012). É possível que essas citocinas sejam necessárias para antagonizar os efeitos potencialmente tóxicos, pró-inflamatórios e autoimunes criados pela produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ durante a replicação exponencial do *T. cruzi* nos tecidos do hospedeiro.

Embora o sistema imune atue como primeira linha de defesa, moléculas parasitárias podem modular a resposta imune do hospedeiro, resultando na persistência do parasito. A permanência do antígeno estimula células do sistema imune adaptativo, caracteristicamente os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, os quais participam ativamente na tentativa de retorno à homeostasia do organismo. Na infecção experimental, a importância das células T foi comprovada em diversos estudos *in vivo*, (Vieira et al., 2012; Dominguez et al., 2012; Mariano et al., 2008; Padilla et al., 2008). A ativação do sistema imune adaptativo é caracterizada pelo fenômeno de ativação policlonal de linfócitos T e B frente à infecção com o *T. cruzi*, gerando distúrbio na homeostasia do sistema imune. Essa vigorosa ativação linfocitária poderia causar a ativação de clones auto-reativos, os quais seriam perpetuados dada a persistência do auto-antígeno e a existência do ambiente inflamatório criado pela infecção (Minoprio et al., 1986). Além de uma participação na geração do fenômeno de autoimunidade, a ativação policlonal poderia estar envolvida na imunossupressão característica da infecção aguda com o *T. cruzi*, como demonstrado em modelos murinos, nos quais a diminuição da resposta humoral específica confere maior susceptibilidade à infecção (Bryan et al., 2010).

Diferentes subpopulações de linfócitos T apresentam grande importância na reatividade celular da doença de Chagas, como as células CD4⁻CD8⁻ e células T com TCR $\gamma\delta$

(Villani et al., 2010). Em um modelo de infecção experimental em ratos, no qual foram inoculadas duas cepas diferentes do *T. cruzi*, CL Brener e JG, demonstrou-se expansão das células duplo negativas e que as mesmas são altas produtoras de IFN- γ , cujos altos níveis foram associados ao controle parasitário (Nagib et al., 2007). Em outro estudo, observou-se que camundongos com infecção aguda induzida pelo *T. cruzi* apresentam níveis elevados de células TCD4⁻CD8⁻ e TCD4⁺CD8⁺ 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). Sugere-se, dessa forma, que a presença desses tímócitos imaturos na periferia poderia contribuir para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica por meio de uma resposta autoimune. Ainda dentro da população duplo negativa, Sardinha e colaboradores (2006) descreveram que grande parte dessas é constituída por TCR $\gamma\delta$, e que há uma expansão de 40 a 100 vezes no fígado de animais agudamente infectados. Nomizo e colaboradores (2006) mostraram que a deleção dessa população com uma cadeia específica anteriormente à infecção da cepa Y em animais Balb/C aumenta a susceptibilidade à infecção com o *T. cruzi*, fenômeno esse que estaria diretamente relacionado à menor frequência de IFN- γ . Outro aspecto avaliado nesse estudo foi a diminuição da transição de linfócito virgem para de memória/efetor, o que sugere uma participação das células T com TCR $\gamma\delta$ como auxiliares para atividade efetora dos linfócitos TCD4 do tipo Th1.

Outro ponto importante para a efetivação das respostas imunes consiste no recrutamento de leucócitos para áreas de injúrias. A constante migração de células T e outros leucócitos para sítios variados permite o contato dessas células com uma variedade de alvos antigênicos, desencadeando processos que visarão à proteção do organismo. As células TCD8⁺ são o principal tipo celular ativo no sítio inflamatório de camundongos infectados (Silvério et al., 2012), sendo, provavelmente, ativadas por antígenos do parasito e do hospedeiro. Estudos importantes mostraram que no pico da infecção, 30% dos linfócitos TCD8⁺ eram específicos por epítopos imunodominantes da família da transialidase (Martin et al., 2004). Considerando-se a complexidade do genoma do *T. cruzi* (>12000 genes no genoma haplóide) (El-Sayed et al., 2005), esse é um fato marcante. Também tem sido verificada a participação de células TCD8⁺ na imunidade e patogênese chagásica, principalmente nos mecanismos envolvendo citólise e fibrose que levam à destruição da miofibra cardíaca na cardiopatia chagásica (Cunã e Cunã, 1995). No processo de degradação da matriz extracelular

destacam-se as vias citotóxicas, sendo a da granzima A uma das principais (Metkar et al., 2008).

A ativação de células T culmina, além da diferenciação funcional, na secreção de citocinas. Durante a infecção com *T. cruzi*, assim como a fundamental dicotomia das citocinas IL-10 e IFN- γ , outras citocinas são determinantes na evolução dessa infecção. Nesse contexto enquadra-se a IL-17, cuja fonte principal é a subpopulação Th17, mas também pode ser produzida por células TCD8⁺, NK e T com TCR $\gamma\delta$ (revisto por Zhang et al., 2011). No modelo experimental de infecção, foi mostrado que as principais fontes de produtoras de IL-17 são as células NK e T com TCR $\gamma\delta$, e que essa citocina induz a produção de IL1- β e TNF- α por macrófagos, assumindo, dessa forma, um papel protetor (Miyazaki et al., 2010). Corroborando com esses dados, Guedes e colaboradores (2010), mostraram que IL-17, no modelo de infecção murino, regula o influxo de células para o miocárdio e, conseqüentemente, controla a miocardite induzida pela presença dos parasitos.

Além do perfil de citocinas influenciar o curso da infecção, é importante enfatizar que a cinética da produção também deve ser considerada como determinante. Em dois modelos experimentais, a linhagem C57BL6, resistente à infecção, e Balb/C sensível, observou-se que nos animais resistentes há produção precoce de IFN- γ e IL-6. Nos animais suscetíveis, por sua vez, foi observado um predomínio de IL-10 no pico da infecção, e as citocinas IFN- γ e IL-6 foram detectadas apenas no estágio mais tardio da infecção (Bryan et al., 2010).

A infecção experimental aguda pelo parasito causa, no modelo murino, uma ativação intensa e policlonal de linfócitos B, com hiperprodução de imunoglobulinas, porém com apenas alguma fração específica contra antígenos parasitários. O aparecimento de anticorpos específicos está relacionado com a queda de parasitemia, e os isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b estão associados com anticorpos envolvidos na eliminação de formas sanguíneas do parasito (Brodskyn et al., 1989).

Em 1982, Krettli e Brener, estudando camundongos infectados pelo *T. cruzi*, descreveram os anticorpos líticos, o que foi inovador no sentido em que foi demonstrado haver uma dissociação entre os anticorpos envolvidos no diagnóstico da doença de Chagas e aqueles envolvidos na resistência contra o parasito. Esses últimos reagem com as formas vivas dos tripomastigotas e induzem nestes a lise mediada por complemento, conferindo proteção ao hospedeiro. O nível de anticorpos líticos decai rapidamente no soro de animais cronicamente infectados, após tratamento quimioterápico eficaz, enquanto que os anticorpos convencionais permanecem presentes. Outra questão importante a ser considerada sobre os

anticorpos líticos é a maior ação opsonizante desses para a fagocitose de formas tripomastigotas, sendo mais um mecanismo de eliminação do parasito (Araújo-Jorge, 1993).

Como explicitado nesse tópico, a infecção do hospedeiro mobiliza múltiplos mecanismos celulares e moleculares tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. O entendimento desses fenômenos em modelos experimentais, associado a ferramentas imunológicas modernas, é de grande contribuição para elucidação da imunopatologia da doença de Chagas.

1.3.2. Reatividade imunológica na doença de Chagas humana

A reatividade do sistema imune frente à infecção pelo *T. cruzi* tem sido investigada extensivamente em modelos experimentais na tentativa de se conhecer os fatores relacionados ao estabelecimento de cura ou patogênese. Embora os estudos realizados no modelo murino apontem para vias que podem ser importantes no desenvolvimento da doença, uma extrapolação direta para a doença em humanos deve ser considerada com restrições, o que enfatiza a necessidade de elaboração de estudos sobre a imunologia da doença de Chagas humana. Entre os diversos aspectos intrigantes relacionados à imunologia da doença de Chagas, sua evolução clínica diferencial em indivíduos cronicamente infectados assume, certamente, um papel de grande destaque.

A doença de Chagas caracteriza-se, na fase aguda, por alto parasitismo e parasitemia, com intensa mobilização do sistema imune. Acredita-se que o reconhecimento do *T. cruzi* pelo sistema imune inato ocorra através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Akira et al., 2006), desencadeando uma série de eventos importantes no combate à infecção. A ativação da produção de citocinas inflamatórias por esses receptores representa importante mecanismo de defesa do hospedeiro (Campos et al., 2004).

Embora os mecanismos ainda não estejam esclarecidos em humanos, acredita-se que o controle da replicação parasitária e da disseminação nos tecidos do hospedeiro nos estágios iniciais da infecção com o *T. cruzi* seja efetuado por células da imunidade inata, como as células NK e macrófagos. As células NK são importantes fontes produtoras de IFN- γ e TNF- α , citocinas essas que são relevantes na ativação de macrófagos. Essa população celular foi um dos objetos de estudo de Sathler-Avelar e colaboradores (2003), os quais avaliaram o perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico de crianças chagásicas em fase aguda. Observou-se que a ativação do sistema imune inato logo nos estágios iniciais da infecção

ocorre através da ativação de células NK CD16⁺CD56⁻, fenômeno esse que se configura como importante elo entre os eventos imunológicos inatos e adaptativos, dada à produção de IFN- γ por essas células. Ainda neste estudo, observou-se maior expressão de CD54 (ICAM-1) em monócitos, porém não em linfócitos T, apoiando dados anteriores da literatura que hipotetizam que a imunidade não dependente de células T durante a fase aguda da doença de Chagas é devida às atividades de moléculas da superfície do parasito (Argibay et al., 2002).

Importantes adaptações do sistema imune são verificadas no decorrer da infecção chagásica, sendo as respostas mediadas por células T determinantes para o controle da infecção parasitária. A ativação das células T é um evento chave contra patógenos intracelulares, sendo bem estabelecido que, de acordo com a atividade funcional dessas células ativadas, a doença evolui para um perfil protetor ou patogênico. Como o reconhecimento e a resposta antigênica dependem do repertório de TCR, estudos que visem a identificar, detalhadamente, as células T envolvidas nas respostas imunes são de grande interesse, porém os mecanismos relacionados à ativação de linfócitos T que ocorre durante a fase aguda e persiste pela fase crônica da doença não estão ainda esclarecidos.

Costa e colaboradores (2000) analisando o repertório de células T no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda observaram um decréscimo da frequência de células TCD4⁺V β 5⁺, que poderia refletir uma migração dessas células para sítios de lesão ou mesmo para órgãos periféricos. Na fase crônica, por sua vez, observou-se que um aumento da frequência de células TCD4⁺V β 5⁺ em pacientes cardíacos comparando-se com forma clínica indeterminada. Estes resultados revelam que antígenos específicos do parasito estimulam uma porção do repertório de células T com uso preferencial de V β 5-TCR, sugerindo um possível envolvimento destas células na patologia chagásica.

Seguindo-se ao engajamento com o TCR, ocorre a sinalização co-estimuladora mediada, principalmente, por moléculas da família B7 (B7.1 e B7.2) nas APCs e por moléculas da família CD28 (CD28 e CTLA-4) na superfície dos linfócitos T. Com relação à expressão de moléculas co-estimuladoras, sabe-se que a expressão de CD28 está diminuída em linfócitos T de pacientes chagásicos crônicos (Dutra et al., 1996; Menezes et al., 2004), sugerindo intensa ativação celular. O aumento de células CD28⁻ pode estar relacionado a eventos citotóxicos na patogênese da doença de Chagas, uma vez que células T ativadas CD28⁻, principalmente pertencentes à sub-população CD8, apresentam função citotóxica exacerbada (Azuma et al., 1993). Por outro lado, a expressão da molécula co-estimuladora CTLA-4, associada ao controle da resposta imune, está diminuída em pacientes chagásicos

cardiopatas (Souza et al., 2007). Após o processo eficiente de ativação dos linfócitos T, esses passam por uma série de modificações fenotípicas e bioquímicas que culminarão com o desempenho de sua função. Algumas dessas modificações envolvem a expressão de moléculas da superfície celular, tais como o HLA-DR, um marcador de ativação tardio. No contexto *ex vivo*, observou-se um aumento de células TCD4⁺ e CD8⁺ expressando a molécula HLA-DR nos indivíduos chagásicos em relação aos não-infectados (Dutra et al., 1994; Sathler-Avelar et al., 2003).

O perfil reativo do sistema immune frente à infecção com *T. cruzi* pode ser regulado através das citocinas produzidas pelas células imunocompetentes, as quais associadas a outras células presentes no microambiente inflamatório, são fundamentais no estabelecimento da patologia. Dentre as diversas citocinas, o IFN- γ tem sido associado, tanto em modelos experimentais (Romanha et al., 2002, Ferraz et al., 2007) quanto em humanos, com resistência do hospedeiro à infecção. Segundo Bahia-Oliveira, 2000, o IFN- γ em conjunto com terapia específica pode levar à eliminação do parasito em pacientes agudos. Analisando o perfil imunológico de pacientes em fase aguda, Samudio e colaboradores, 1998, mostraram que o IFN- γ é a citocina determinante para o controle da infecção parasitária. Na fase crônica, por sua vez, Gomes e colaboradores, 2003, classificaram pacientes chagásicos em duas categorias, com base nos níveis de secreção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em cultura: altos e baixos produtores. Foi observado uma maior frequência de pacientes cardíacos com alta produção de IFN- γ comparando-se a pacientes indeterminados. Por outro lado, esses últimos apresentaram maior produção de IL-10, a qual tem importância imunorregulatória. Interessante ressaltar que as populações comprometidas com a produção de IFN- γ e IL-10 foram as células TCD4⁺ e os monócitos, respectivamente, sugerindo que essas células sejam fundamentais em orquestrar a resposta imune nos pacientes chagásicos, influenciando a evolução clínica da doença (Gomes et al, 2003; Souza et al., 2004, 2007). Um dado interessante é que, embora seja correlacionada com o estabelecimento de um perfil modulatório em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, a citocina anti-inflamatória IL-10 é também produzida por CMSP de pacientes cardiopatas, enfatizando-se que mais que a produção de uma dada citocina por si só, o balanço entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas ao longo da doença é fundamental para determinar o curso da infecção. Guedes e colaboradores, 2012, mostraram que na doença de Chagas humana, baixos níveis de IL-17 e IL-10, contraposto a altos níveis de IFN- γ e TNF- α , estão correlacionados à gravidade das lesões do miocárdio em pacientes chagásicos,

observação essa que poderia estar relacionada à uma deficiência nas atividades supressoras de células reguladoras. Trabalhos de nosso grupo mostraram que pacientes indeterminados possuem maior frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando IL-17 do que pacientes da forma cardíaca, e que a expressão dessa citocina está associada a melhor função cardíaca (Magalhães et al., 2012, no prelo). Nesse contexto, é fundamental que os fatores que determinam a produção dessas citocinas, sejam esses os estímulos antigênicos associados à infecção assim como a ocorrência de polimorfismos gênicos, sejam elucidados.

Infiltrados de células mononucleares podem ser observados no coração de pacientes infectados com o *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da infecção (Higushi et al., 1997), sendo que essas células produzem, principalmente, as citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α (Reis et al. 1993, 1997). O TNF- α também tem, isoladamente, um importante papel no processo de indução da expressão de adesinas, essenciais na localização de sítios de infecção pelas células mononucleares (Fearon e Locksley, 1996).

Também envolvidas na gênese das lesões teciduais estão as citocinas IL-6 e IL-1, as quais modulam a expressão de moléculas de adesão, que participam no recrutamento de linfócitos para os sítios de inflamação. A citocina IL-6, a qual foi relacionada à patogênese e progressão de doenças cardiovasculares, também foi associada à progressão dos danos do miocárdio em pacientes chagásicos (López et al., 2006).

Considerando-se que a evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada por uma diminuição da parasitemia e do parasitismo tecidual, fica claro que tanto células da imunidade inata como da adquirida desempenham um importante papel na resposta imune na doença de Chagas. O desafio consiste em identificar quais mecanismos imunológicos tornam as pessoas suscetíveis às formas mais graves da doença de Chagas na fase crônica. Nossa **hipótese de trabalho** é de que a infecção aguda pelo *T. cruzi* leva a alterações na frequência e produção de citocinas por subpopulações de células T, e que essas diferenças podem influenciar a progressão das diferentes formas clínicas da doença de Chagas humana. Um entendimento mais aprofundado da fase aguda da doença de Chagas, proposto nesse projeto inédito, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos imunopatogênicos relacionados à evolução diferencial da doença de Chagas.

2. Justificativa

Mais de cem anos desde a sua descrição, a doença de Chagas ainda é negligenciada, muito porque em diversas regiões o controle epidemiológico é inexistente ou pouco rigoroso e o tratamento tem eficácia limitada. Tão grave quanto esses fatores deve-se citar também que o diagnóstico muitas vezes não é prontamente realizado e não foram identificados, até o momento, biomarcadores de prognóstico e desenvolvimento das formas graves da doença. Muitos desses entraves são consequências da escassez de dados relativos ao estudo da fase aguda da doença em humanos, a qual é crítica em vários aspectos. Primeiro, deve-se citar que é nesse momento que se instala o contato do parasito com o hospedeiro. Segundo, a detecção na fase inicial da infecção permite a intervenção quimioterápica, a qual apresenta taxas de cura favoráveis quanto mais precocemente administrada. Por fim e tão essencial quanto, os eventos imunológicos que são desencadeados na fase aguda são determinantes para a progressão da doença numa fase tardia.

Considerando-se esse cenário, nosso estudo representa três aspectos únicos que fornecem consistente subsídio para o desenvolvimento de intervenção terapêutica nos pacientes chagásicos: (1) ao analisar o perfil imunológico de pacientes em fase aguda, poderemos identificar populações celulares e/ou moléculas que se encontram altamente ativadas nessa fase; (2) ao acompanharmos a progressão dos pacientes da fase aguda para a fase crônica, entenderemos como a dinâmica das respostas imunes acontece frente a um estágio da infecção onde a escassez de parasitemia se contrapõe à intensidade e gravidade das lesões; (3) ao estudarmos pacientes originados de uma área endêmica, no norte do Brasil, e cuja provável forma de contaminação ocorreu por via oral, poderemos identificar mecanismos celulares e/ou moleculares que causam sintomatologia clínica mais exacerbada nesses pacientes comparando-se a pacientes contaminados por via vetorial.

Dessa forma, acreditamos que o nosso trabalho venha a esclarecer diversos aspectos enigmáticos da doença de Chagas e, conseqüentemente, nortear o desenvolvimento de terapias imunológicas que favoreçam melhoria nas condições de vida dos pacientes portadores da doença.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a frequência de subpopulações celulares, sua expressão de citocinas e seu potencial citotóxico, em pacientes na fase aguda e na fase crônica recente da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar, no sangue periférico dos pacientes chagásicos nas fases aguda e crônica recente e de indivíduos não infectados:

- Frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻;
- A ativação das subpopulações de linfócitos T pela análise da expressão do marcador de ativação celular HLA-DR.

3.2.2. Avaliar perfil imunorregulatório de células do sangue periférico dos pacientes chagásicos nas fases aguda e crônica recente e de indivíduos não infectados pela determinação de:

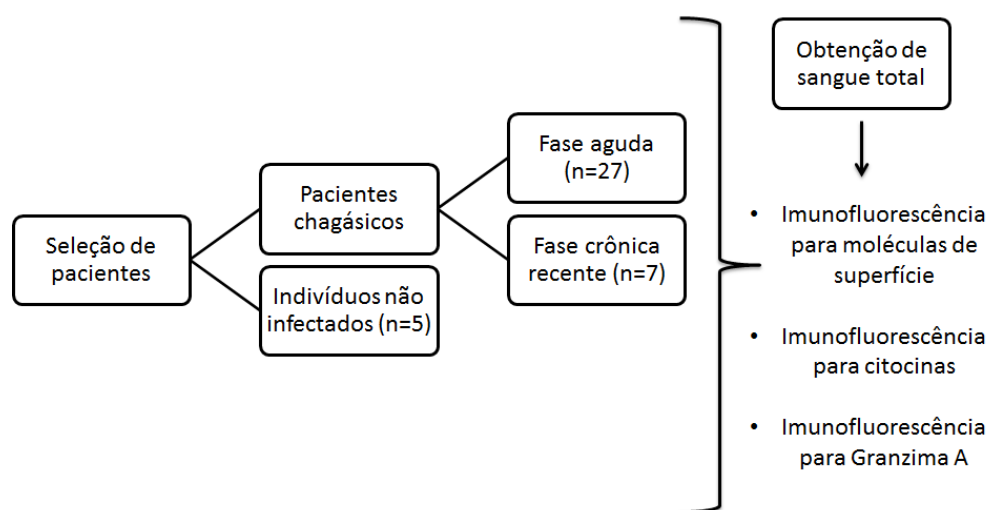
- Frequência de células expressando as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10, IL-1 β e IL-6;
- Fontes produtoras destas citocinas.

3.2.3. Avaliar o potencial citotóxico de células do sangue periférico dos pacientes chagásicos em fase aguda comparando aos dados de indivíduos não infectados pela determinação de:

- Frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ expressando Granzima A;
- Produção de citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 em células TCD8⁺Granzima A⁺.

4. Pacientes, material e métodos

O projeto desenvolvido baseou-se, resumidamente, no seguinte delineamento experimental (Esquema 3), o qual permite visualizar os objetivos específicos propostos em nosso estudo em duas etapas. A primeira etapa consistiu em avaliar o perfil imunológico de pacientes em fase aguda da doença comparando-se a indivíduos não infectados, e a segunda, por sua vez, consistiu em avaliar o perfil imunológico de alguns desses pacientes chagásicos de fase aguda que progrediram para a fase crônica:



Esquema 3: Representação das etapas de execução do projeto

4.1. Seleção dos pacientes

Os pacientes voluntários participantes desse estudo foram selecionados no estado do Pará sob responsabilidade das Dras. Adriana Almeida e Dilma Souza no Hospital de Clínicas Gaspar Vianna, em Belém. Todos os pacientes foram doadores voluntários e o acesso ao tratamento e acompanhamento foram independentes da participação no estudo (Tabela 1). Na primeira fase, foram incluídos pacientes agudos de Doença de Chagas que apresentam a seguinte sintomatologia: febre por período superior a 7 dias e uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: adenomegalia, exantema, edema de face ou membros, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda, manifestações hemorrágicas, icterícia, sinal de Romanã ou chagoma de inoculação. Exames parasitológicos, sorológicos e epidemiológicos foram efetuados a fim de se confirmar os casos. Indivíduos não infectados da área endêmica também participaram do estudo, constituindo o grupo controle (n=5). Na segunda fase do estudo, por

sua vez, foram recrutados alguns dos mesmos pacientes que se encontravam em fase aguda e que progrediram para a fase crônica.

Paciente	Idade	Sexo	Fase da doença	Data coleta	Fase da doença	Data coleta
P1	25	Feminino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P2	49	Feminino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P3	61	Feminino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P4	8	Feminino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P5	63	Masculino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P6	36	Masculino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P7	35	Feminino	Agudo	Out. 2009	Crônico	Fev.2011
P8	11	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P9	16	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P10	9	masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P11	23	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P12	81	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P13	26	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P14	18	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P15	34	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P16	31	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P17	13	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P18	21	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P19	21	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P20	8	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P21	63	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P22	43	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P23	31	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P24	28	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P25	54	Masculino	Agudo	Out. 2009	-	-
P26	31	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
P27	10	Feminino	Agudo	Out. 2009	-	-
C1	23	Feminino	Controle	Out. 2009	-	-
C2	45	masculino	Controle	Out. 2009	-	-
C3	29	Feminino	Controle	Out. 2009	-	-
C4	40	Feminino	Controle	Out. 2009	-	-
C5	45	Feminino	Controle	Out. 2009	-	-

Tabela 1: Relação dos pacientes voluntários participantes do estudo e respectivas datas de coleta

A pesquisa atendeu aos preceitos éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade, tendo aprovação do COEP (parecer ETIC #077/06)

4.2. Coleta, armazenamento e obtenção de células para citometria de fluxo

Uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de cada paciente e distribuída em alíquotas de 1mL de sangue em criotubos. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C *overnight* e então transferidas para freezer -80 °C, conforme descrito por Yssel (2002). O processamento do sangue total para marcação de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas iniciou-se com o descongelamento lento a 37°C em banho-maria, seguido de incubação em PBS por 10 minutos e centrifugação por 8 minutos a velocidade de 1400 rpm.

4.3. Imunofluorescência para análise de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas

Os protocolos para avaliação da frequência de populações celulares específicas, assim como da expressão de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas foram baseadas no protocolo de Dutra e colaboradores, 2002.

Foram plaqueadas 250.000 células em cada poço da placa de 96 poços de fundo U com solução contendo anticorpos monoclonais por 15 minutos, a 4°C ao abrigo de luz. A diluição dos anticorpos foi realizada em solução de PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,01% azida sódica e 0,2% de albumina sérica bovina (BSA). Seguindo-se à incubação com anticorpos de superfície (Tabela 2), procedeu-se à lavagem das células com PBS 1X gelado por centrifugação (1200 rpm, 10', 4°C). Em seguida, as células foram fixadas com Fixation Buffer (Biolegend).

Após a marcação de superfície, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a velocidade de 1200 rpm e o sobrenadante gerado foi descartado. A placa foi homogeneizada em vórtex e seguiram-se três ciclos de lavagem com solução permeabilizante (PermBuffer Solution, Biolegend). Em seguida as células foram incubadas com solução de anticorpos com especificidade para moléculas intracitoplasmáticas (Tabela 3), diluídos em solução permeabilizante, por 30 minutos. Essa etapa foi finalizada com mais dois ciclos de centrifugação 10' com solução permeabilizadora e um ciclo com solução de PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,01% azida sódica e 0,2% de albumina sérica bovina (BSA). Por fim, as células

foram ressuspensas em PBS 1X e mantidas ao abrigo da luz até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

Especificidade	Fluorocromo	Marca	Clone
HLA-DR	V500	BDPharmigen	L243
CD4	APCCy7	Biolegend	OKT4
CD8	PerCpCy5.5	Biolegend	HIT8a
TCR $\alpha\beta$	FITC	BDPharmigen	WT31

Tabela 2: Relação dos anticorpos monoclonais para identificação de moléculas de superfície

Especificidade	Fluorocromo	Marca	Clone
IL-17	Pacific Blue	Biolegend	BL168
IL-10	PE	Biolegend	JES3-19F1
TNF- α	APC	Biolegend	MAb11
IFN- γ	Pacific Blue	Biolegend	4S.B3
Granzima A	FITC	Biolegend	CB9
IL1- β	Pacific Blue	Biolegend	H1b-98
IL-6	APC	Biolegend	MQ2-13A5

Tabela 3: Relação dos anticorpos monoclonais para identificação de moléculas intracitoplasmáticas

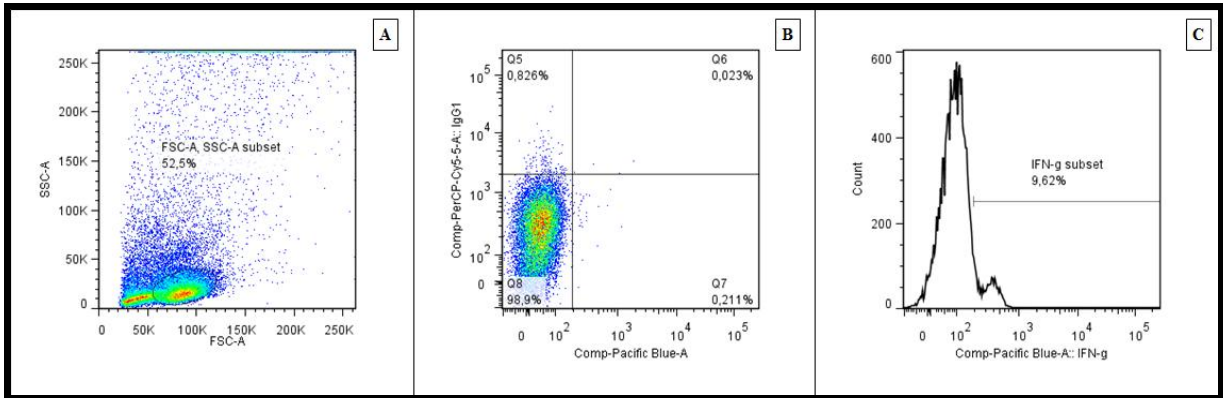
4.4. Aquisição e análise dos dados

A citometria de fluxo é uma técnica muito sensível e precisa que foi escolhida como metodologia principal de nosso estudo, uma vez que permite a análise fenotípica e funcional das células de nosso interesse. Por meio da marcação diferencial, foi possível avaliar várias moléculas de superfície e intracitoplasmáticas que são determinantes nas respostas imunes.

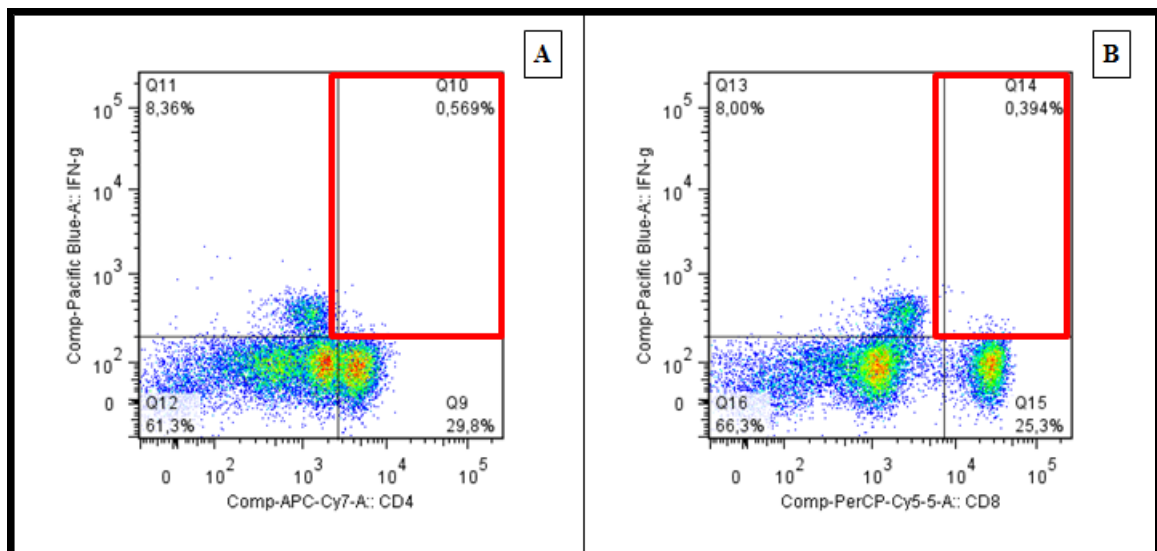
As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas no citômetro de fluxo modelo LSRII (Becton & Dickinson) imediatamente após a coloração, anteriormente descrita. Durante a aquisição dos dados foram coletados 30000 eventos.

Os dados coletados foram analisados utilizando o programa *Flowjo* (Tree Star). A primeira etapa do processo de análise consistiu na determinação da população celular de interesse. Isto foi feito baseando-se no perfil de tamanho e granulidade das populações adquiridas (Esquema 4A).

Uma vez definidas as populações celulares de interesse, procedeu-se às análises de fluorescência. Para isto, foram montados gráficos pontuais de expressão de fluorescência. A delimitação dos quadrantes foi definida a partir do posicionamento de células marcadas com os controles de isotipo. Nestas marcações, os quadrantes foram posicionados de forma que, no mínimo 97-99 % das células estivessem no quadrante inferior esquerdo (Esquema 4B). A partir do posicionamento das células nestes gráficos, procedeu-se à análise da expressão de citocina total no histograma (Figura 4C). Além disso, foi possível determinar a frequência de a frequência de células duplo-positivas (Esquemas 5A e 5B). Definido o posicionamento dos quadrantes, o programa *Flowjo* forneceu a porcentagem ou no número absoluto de células posicionadas em cada quadrante, dentro das regiões definidas.



Esquema 4: A. Gráfico *dot-plot* representativo do perfil da localização dos linfócitos de acordo com o tamanho e granulosidade, população essa alvo de nosso interesse B. Distribuição representativa em *dot-plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais não relacionados marcados com PerCpCy5.5 (controle isotópico); C. Histograma representativo da frequência total de IFN- γ .



Esquema 5: A. Distribuição representativa em *dot-plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais para marcação de células TCD4⁺ e IFN- γ . B. Distribuição representativa em *dot-plot* obtida pela marcação de sangue total com anticorpos monoclonais para marcação de células TCD8⁺ e IFN- γ

4.4.1 Cálculo das proporções celulares

Com o objetivo de verificarmos quais populações celulares são as principais fontes das citocinas estudadas, assim como da molécula citotóxica Granzima A, realizamos o cálculo das proporções celulares. Para obtermos a contribuição das células TCD4⁺ na produção de IFN- γ , por exemplo, multiplicamos o valor do quadrante Q10 (Esquema 5A) por 100 e então fizemos a razão pelo valor de IFN- γ total obtido no histograma (Esquema 4C). O mesmo procedimento foi realizado para cálculo da contribuição de células TCD8⁺ na produção de IFN- γ . Dada a

soma da contribuição das células TCD4⁺ e TCD8⁺ na produção de IFN- γ , subtrai-se esse valor do total de linfócitos (100%), de forma a então termos a contribuição das células TDN.

4.5. Análise estatística

Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados no Excel, sendo aplicado o teste T-student para cálculo estatístico das diferenças entre os grupos de comparação. Para avaliar a frequência e a expressão dos marcadores em estudo comparando-se indivíduos chagásicos agudos e não infectados foi utilizado o teste T não pareado. Para determinar a diferença no perfil dos marcadores utilizados comparando-se chagásicos agudos e crônicos, foi utilizado o teste T pareado. As análises de correlação foram baseadas no coeficiente de correlação de Pearson, análise essa realizada no *software* JMP. Foram consideradas significativas as comparações em que $p < 0,05$.

5. Resultados- parte I

5.1. Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, comparando-se os dados aos obtidos de indivíduos não infectados

A primeira análise de nosso estudo foi baseada na investigação de uma possível expansão das principais populações de células T durante os estágios iniciais da infecção com o *T. cruzi*, as quais já foram demonstradas como determinantes na imunopatologia chagásica crônica. Dessa forma, avaliamos a frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻ (TDN) no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados. Observou-se que não há alteração significativa da frequência das populações celulares comparando-se pacientes chagásicos agudos (Chg) e indivíduos não infectados (NI) (Figura 1).

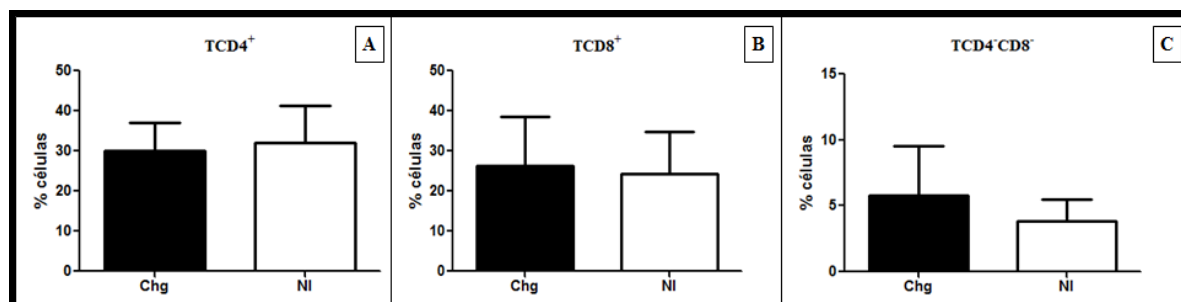


Figura 1: Análise da frequência de células TCD4⁺ (A), TCD8⁺ (B) e TCD4⁻CD8⁻ (C) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (barras escuras, n=27) e indivíduos não infectados- NI (barras claras, n=5). Células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-APCCy7 e anti-CD8-PerCPy5.5 para determinação da frequência de populações, conforme descrito em materiais e métodos. As barras representam as médias \pm desvio-padrão.

5.2. Expressão de HLA-DR em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ em pacientes chagásicos agudos e indivíduos não-infectados

A análise do marcador de ativação tardia o HLA-DR, foi considerada como pertinente para o nosso estudo uma vez que ele é expresso na superfície de linfócitos humanos após a ativação. Na infecção chagásica humana, foi demonstrado por Dutra e colaboradores (2000) que antígenos de tripomastigotas estimulam preferencialmente células TCD4⁺HLA-DR⁺. Dessa forma, avaliamos a frequência de células TCD4⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺ em pacientes chagásicos comparando-se a indivíduos não infectados. Nossos resultados mostraram haver maior frequência de células TCD4⁺HLA-DR⁺ em pacientes chagásicos

agudos em relação aos indivíduos não infectados (Figura 2A), fenômeno esse não significativo para a subpopulação CD8⁺HLA-DR⁺ (Figura 2B).

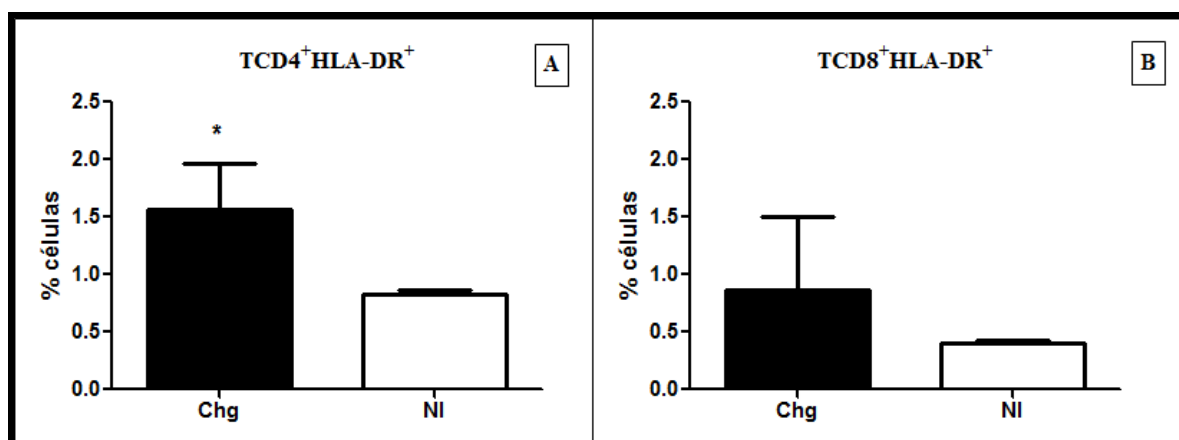


Figura 2: Análise da frequência de células TCD4⁺HLA-DR⁺ (A) e TCD8⁺HLA-DR⁺ (B) no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (barras escuras, n=27) e indivíduos não-infectados-NI (barras claras, n=5). Células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4- APCCy7, anti-CD8- PercpCy5.5 e anti- HLA-DR-V500 para definição das frequências das populações TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando HLA-DR, conforme descrito em materiais e métodos. As barras representam as médias ± desvio-padrão. * representa diferença significativa com p<0.05.

5.3. Comparação do perfil de citocinas entre pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados

Além do status de ativação, a reatividade celular se manifesta pela produção de citocinas, as quais são derivadas de distintas populações celulares que estão continuamente interagindo, e são essenciais para o curso da infecção. Nesse contexto, analisamos a frequência das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-1 β , TNF- α e IL-6 dentro da população total de linfócitos. Ao compararmos os dados de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados, não observamos diferença significativa na frequência das citocinas analisadas dentro da população linfocitária total. Em relação às células TCD4⁺ expressando IL-10, observa-se que nos indivíduos não infectados a frequência é significativamente maior comparando-se aos dados de pacientes chagásicos agudos. Analisando-se a a citocina IL-17, por sua vez, observa-se que a frequência tanto de células TCD4⁺ quanto TCD8⁺ expressando essa citocina é significativamente maior nos indivíduos não infectados em relação aos pacientes chagásicos agudos. Comparando-se a frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TDN expressando as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 em indivíduos não infectados e pacientes chagásicos agudos, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 4).

	Grupos	Citocina total	%TCD4 ⁺ Citocina ⁺	%TCD8 ⁺ Citocina ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁺ Citocina ⁺
IFN- γ	NI (n=5)	10,31 \pm 4,80	4,58 \pm 3,06	1,41 \pm 1,37	4,31 \pm 2,63
	Chg (n=27)	9,02 \pm 4,85	2,41 \pm 2,34	0,88 \pm 0,95	5,73 \pm 3,73
IL-10	NI (n=5)	4,93 \pm 3,73	**3,55 \pm 3,37	0,93 \pm 0,43	0,45 \pm 0,31
	Chg (n=27)	2,78 \pm 2,76	1,18 \pm 1,26	0,6 \pm 0,78	1 \pm 1,44
IL-17	NI (n=5)	11,55 \pm 3,90	**4,22 \pm 3,55	**1,84 \pm 1,01	5,50 \pm 1,19
	Chg (n=27)	6,89 \pm 5,39	1,59 \pm 1,55	0,87 \pm 0,93	4,43 \pm 4,06
TNF- α	NI (n=5)	0,86 \pm 0,34	0,35 \pm 0,16	0,23 \pm 0,13	0,29 \pm 0,07
	Chg (n=20)	2,19 \pm 1,39	0,62 \pm 0,36	1,03 \pm 0,79	0,54 \pm 0,57
IL1- β	NI (n=5)	12,70 \pm 3,39	3,89 \pm 3,79	1,70 \pm 1,10	7,12 \pm 5,23
	Chg (n=20)	10,16 \pm 3,95	2,93 \pm 2,56	0,90 \pm 0,82	6,33 \pm 3,86
IL-6	NI (n=5)	6,49 \pm 4,94	1,02 \pm 0,98	1,06 \pm 0,83	4,41 \pm 5,08
	Chg (n=20)	4,34 \pm 1,11	2,44 \pm 0,85	1,01 \pm 0,54	0,89 \pm 0,42

Tabela 4: Porcentagem de expressão de citocinas dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁺CD8⁺ positivas para cada uma das citocinas analisadas no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (n=27) e indivíduos não infectados-NI (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre grupos Chg e NI estão indicadas por **.

5.3.1. Contribuição das populações celulares para a produção de citocinas em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de indivíduos não infectados

Baseando-se na perspectiva de que diferentes subpopulações celulares estariam comprometidas predominantemente com a produção de determinada citocina e na premissa que a identificação dessas fontes majoritárias de citocinas pode ser alvo de intervenção terapêutica, analisamos separadamente a proporção de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁺CD8⁺ na produção de cada uma das citocinas estudadas: IFN- γ , IL-10, IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em relação à citocina IFN- γ , observa-se que as células TDN são a principal fonte linfocitária nos pacientes agudos, seguidas das células T CD4⁺ e com uma pequena contribuição de menos de 10% das células CD8⁺. Interessantemente, nos não chagásicos, células TDN e CD4⁺ contribuíram de forma semelhante, seguidas das células T CD8⁺. A produção de IFN- γ pelas células TDN foi significativamente maior nos pacientes agudos do que nos indivíduos não infectados. Já em relação à IL-10, obsevou-se que as principais fontes dessa citocina foram as

células T CD4⁺ e TDN, seguidas de TCD8⁺ nos chagásicos, enquanto que nos não infectados, as células CD4⁺, foram a principal fonte, seguidas de TCD8⁺ e então de células TDN. A produção de IL-10 pelas células TDN foi significativamente maior nos pacientes agudos e menor nas células TCD4⁺ dos pacientes agudos do que nos indivíduos não infectados. As células DN são as principais produtoras de IL-17 nos pacientes chagásicos agudos, seguindo-se das células TCD4⁺ e TCD8⁺, respectivamente., observação essa também válida para os indivíduos não infectados. Com relação à citocina TNF- α , observa-se que nos pacientes chagásicos as células TCD8⁺ são as que mais contribuem para a expressão da citocina, seguidas das células TCD4⁺ e TDN. Nos indivíduos não infectados, as principais fontes foram as células TDN e TCD4⁺, seguidas das células TCD8⁺. Nos dois grupos estudados, observamos que as células TDN são as que mais expressam IL-1 β , seguindo-se de células TCD4⁺ e uma pequena expressão por células TCD8⁺. Analisando-se a citocina IL-6, por sua vez, os dados mostraram que nos pacientes chagásicos as células TCD4⁺ são as principais fontes produtoras desta citocina, seguida de células TCD8⁺ e TDN com frequências semelhantes. Já nos indivíduos não infectados, as células TDN são as principais produtoras, seguindo-se de células TCD4⁺ e então células TCD8⁺. A produção de IL-6 pelas células TDN mostrou-se significativamente maior nos indivíduos não infectados comparando-se a pacientes chagásicos agudos (Tabela 5).

Proporção das populações celulares na produção de citocinas				
Grupos	%TCD4 ⁺	%TCD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁻	
IFN- γ	NI (n=5)	45,18 \pm 16,98	12,78 \pm 6,54	42,04 \pm 22,41
	Chg (n=27)	27,75 \pm 19,46	9,18 \pm 8,74	**63,06 \pm 22,32
IL-10	NI (n=5)	**65,87 \pm 10,32	22,83 \pm 8,46	11,30 \pm 8,13
	Chg (n=27)	41,54 \pm 21,78	19,68 \pm 12,60	**37,78 \pm 24,73
IL-17	NI (n=5)	32,55 \pm 15,86	16,19 \pm 7,70	51,26 \pm 17,34
	Chg (n=27)	22,61 \pm 12,89	13,25 \pm 12,39	64,14 \pm 17,42
TNF- α	NI (n=5)	39,26 \pm 7,99	25,60 \pm 3,83	35,14 \pm 9,82
	Chg (n=20)	30,73 \pm 13,10	43,97 \pm 13,36	25,31 \pm 20,56
IL1- β	NI (n=5)	29,28 \pm 28,15	14,10 \pm 8,20	56,52 \pm 34,79
	Chg (n=20)	28,61 \pm 22,83	9,02 \pm 6,13	62,37 \pm 25,40
IL-6	NI (n=5)	30,34 \pm 38,17	16,14 \pm 0,54	**53,31 \pm 37,63
	Chg (n=20)	56,50 \pm 14,23	22,42 \pm 9,12	21,09 \pm 8,41

Tabela 5: Análise da proporção das populações celulares na expressão de citocinas presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=27) e indivíduos não infectados (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.

5.3.2. Balanço de citocinas inflamatórias e modulatórias em pacientes chagásicos agudos, comparando os dados aos obtidos de indivíduos não infectados

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 (Cunha-Neto et al., 1994; Dutra et al., 2000; Dutra et al., 1997; Gomes et al., 2003; Souza et al., 2003, 2007). Considerando a diversidade de importantes citocinas inflamatórias analisadas em nosso estudo (IFN- γ , IL-17, IL-1 β , TNF- α e IL-6), foi de grande interesse avaliar a razão dessas pela citocina modulatória IL-10 como forma de caracterizar um possível desequilíbrio que poderia estar associado ao dano tecidual grave nos pacientes chagásicos. Ao compararmos os dois grupos de estudo, não observamos alteração

estatisticamente significativa no equilíbrio das citocinas inflamatórias em relação à citocina modulatória IL-10 (Figura 3).

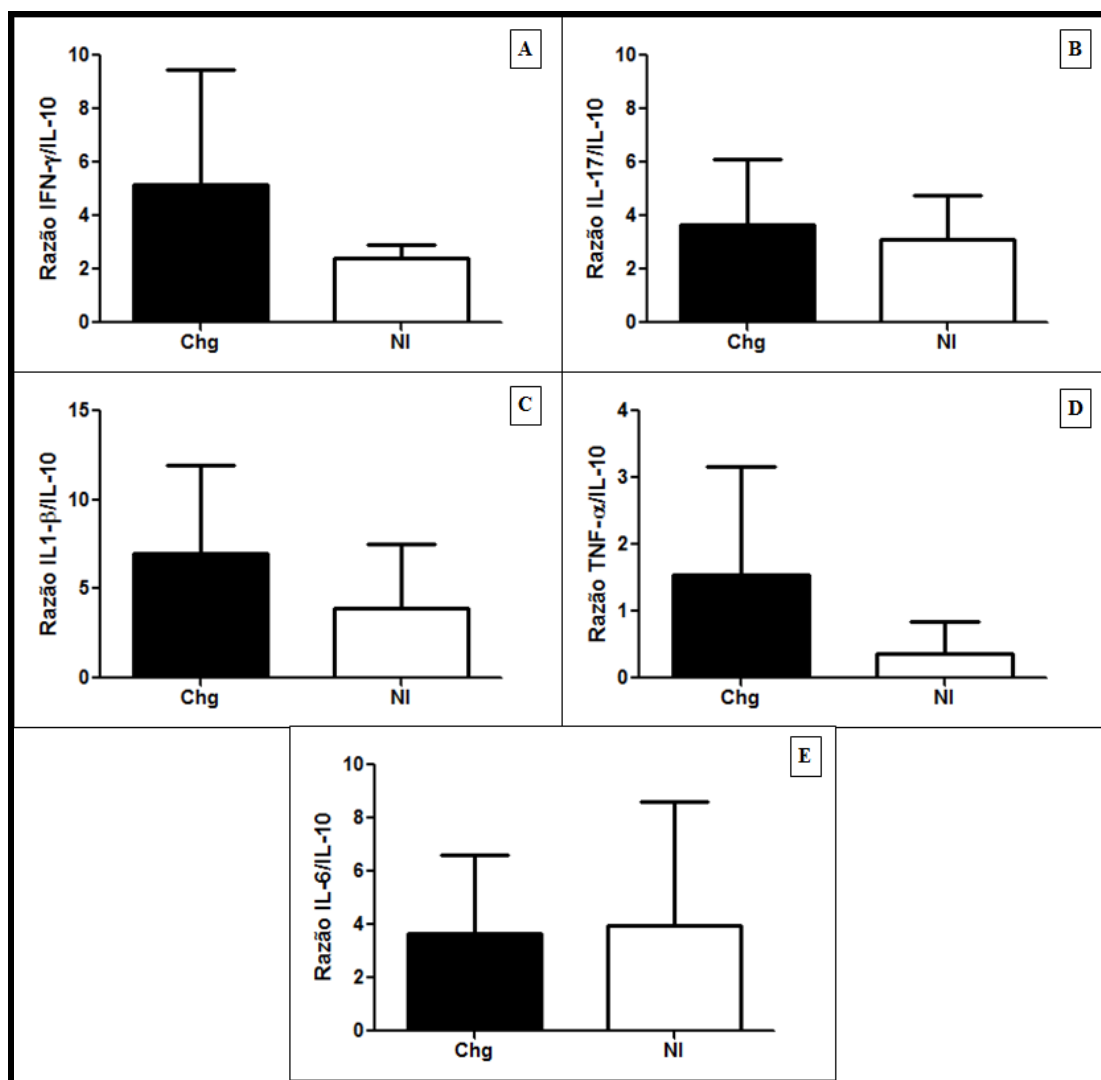


Figura 3: Análise de razão das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela citocina modulatória IL-10 em linfócitos totais do sangue periférico de pacientes chagásicos agudos -Chg (barras escuras, n=27) e indivíduos não-infectados - NI (barras claras, n=5). As barras representam as médias \pm desvio-padrão. * representa diferença significativa com $p < 0.05$.

5.3.3. Análise da correlação da expressão de citocinas em pacientes chagásicos em fase aguda

Muitos estudos descrevem os papéis críticos e antagônicos das citocinas IL-10 e IFN- γ na resposta imune elicitada pela infecção aguda com o *T. cruzi*. Como mencionado anteriormente, a maioria destes achados são derivados de modelos experimentais. Nestes modelos, foi demonstrado que o IFN- γ mostra-se atuante na redução da parasitemia e da

mortalidade nos animais infectados, ativando os macrófagos e consequente produção de derivados de oxigênio, os quais são tóxicos ao parasito (Silva et al.,1992), ao passo que a IL-10 inibe a ativação de macrófagos pelo IFN- γ , sendo associada à susceptibilidade à infecção com o *T. cruzi*. A IL-17, cujos estudos sugerem ter efeito protetor na infecção com *T. cruzi* (Guedes et al., 2010, 2012, Magalhães, 2011), foi demonstrada como positivamente correlacionada com a IL-10 na esclerose múltipla (Edwards et al., 2011), e negativamente correlacionada na doença de Crohn (Wilke et al., 2011). Além de IFN- γ e IL-17, outras citocinas inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e IL-1 β , quando correlacionadas com a IL-10, estão envolvidas na progressão diferencial de diversas condições patológicas (Visentainer et al., 2008, Corso et al., 2007, van Deuren et al.,1995). Na fase aguda da doença de Chagas humana, por sua vez, essa correlação ainda não foi investigada. Neste contexto, parece fundamental abordar a relação entre as diversas citocinas inflamatórias e a citocina modulatória IL-10 em pacientes chagásicos agudos. Realizamos, dessa forma, a análise de correlação da frequência total de cada uma das citocinas inflamatórias pela frequência total da citocina IL-10. Os dados obtidos mostraram que, nesses pacientes, as citocinas IFN- γ e IL-10 estão positivamente correlacionadas (Figura 4A), constatação essa não significativa para as demais citocinas inflamatórias IL-17, IL-1 β , TNF- α e IL-6. (Figuras 4B, 4C, 4D e 4E).

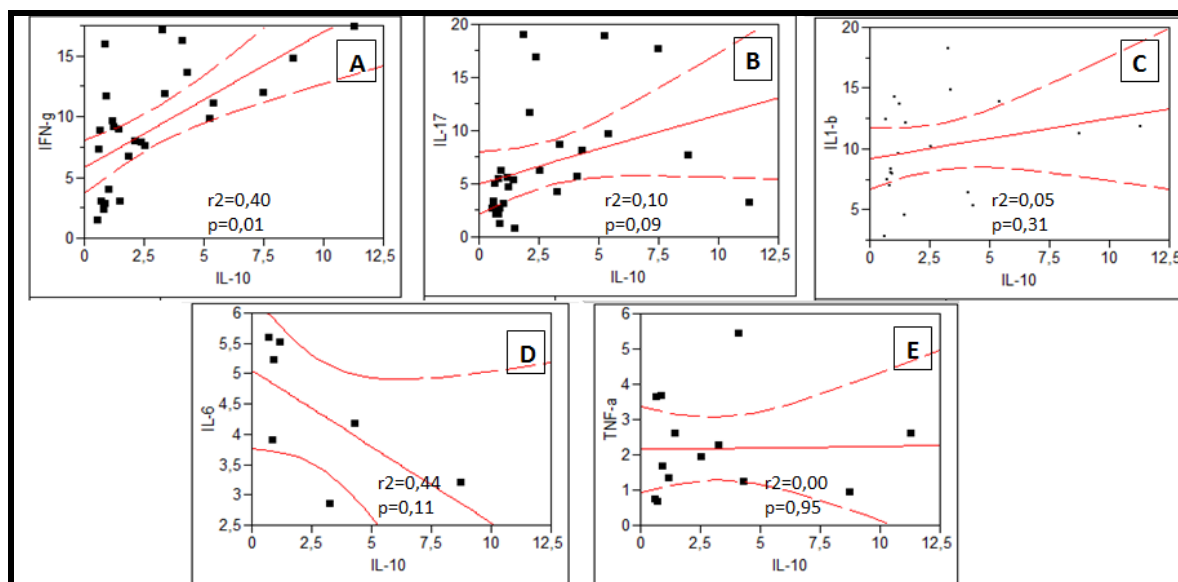


Figura 4: Análise de correlação das citocinas inflamatórias IFN- γ (A), IL-17 (B), IL1- β (C), IL-6 (D) e TNF- α (E) com a citocina IL-10 em pacientes chagásicos em fase aguda (n=27).

5.4. Expressão de Granzima A em células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ de pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados

A resposta imune mediada por células TCD8⁺ ocorre tanto pela inibição da replicação parasitária, etapa essa essencial uma vez que é o único estágio replicativo do *T. cruzi* em mamíferos, quanto pela eliminação da célula hospedeira infectada (Martin e Tarleton, 2004). Os mecanismos efetores constituem, além da secreção de citocinas, em mecanismos líticos pela via da Granzima A. Em modelos experimentais foi demonstrado que camundongos *knock out* para Granzima A sucumbem à infecção em taxas maiores e em menor intervalo de tempo comparado a camundongos selvagens (Muller et al., 2003). Ainda no contexto da citotoxicidade, as células TCD4⁺ do tipo Th1 também tem forte atuação. Embora o principal mecanismo ocorra por via Fas-FasL (Hahn et al., 1995), o estudo da citotoxicidade nessa população celular pode nos fornecer importantes achados no contexto da doença de Chagas aguda humana, ainda pouco investigada. Assim como as células TCD4⁺ e TCD8⁺, as células TDN também são capazes de realizar citototoxicidade (Grossman et al., 2004). Assim sendo, avaliamos a expressão de Granzima A na população linfocitária total, assim como a proporção das células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻ na expressão dessa molécula citotóxica. Ao compararmos a frequência de expressão de Granzima A dentro da população linfocitária total, observamos que tanto pacientes chagásicos agudos quanto indivíduos não infectados apresentam valores semelhantes (43,08% e 41,63%, respectivamente). Avaliando-se as células TCD4⁺ expressando Granzima A, por sua vez, a frequência dessas é significativamente maior comparando-se aos valores obtidos de indivíduos não infectados. No contexto das células TCD8⁺ expressando Granzima A, observamos que os dois grupos estudados, Chg e NI, possuem valores muito semelhantes (19,74% e 19,75%, respectivamente), observação essa também verdadeira ao comparar os valores da frequência de células TDN expressando Granzima A nos grupos Chg e NI (15,60% e 18,84%, respectivamente) (Tabela 6).

Grupo	Granzima A total	%TCD4 ⁺ Gran ⁺	%TCD8 ⁺ Gran ⁺	%CD4 ⁻ CD8 ⁻ Gran ⁺
NI (n=5)	41,63 ± 16,19	3,05 ± 0,98	19,75 ± 13,31	18,84 ± 8,21
Chg (n=20)	43,08 ± 15,07	**8,24 ± 4,81	19,74 ± 12,78	15,60 ± 6,64

Tabela 6: Porcentagem de expressão de Granzima A dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ positivas para Granzima A presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (n=20) e não infectados- NI (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.

5.4.1. Contribuição das populações celulares para a produção de Granzima A em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de indivíduos não infectados

A partir dos dados obtidos na Tabela 6, calculamos a proporção das populações celulares produtoras da Granzima A mostrada na Tabela 7. Em relação à expressão de Granzima A, observa-se que nos indivíduos não infectados tanto as células TCD8⁺ quanto as TDN são as principais fontes desta molécula, seguidas de células TCD4⁺ que contribuem com menos de 10% do total (7,52%). Nos pacientes chagásicos, por sua vez, observamos também essa mesma ordem de contribuição das populações celulares na produção de Granzima A. Foi interessante notar que, quando comparamos os dados de indivíduos não infectados aos de pacientes chagásicos agudos, observamos que esses apresentam significativamente maior proporção de células TCD4⁺Granzima A⁺.

Proporção de populações celulares na produção de Granzima A			
Grupo	%TCD4 ⁺	%TCD8 ⁺	%CD4 ⁻ CD8 ⁻
NI (n=5)	7,52 ± 0,99	45,68 ± 18,87	46,80 ± 18,36
Chg (n=20)	**20,04 ± 10,91	41,01 ± 15,18	38,95 ± 17,56

Tabela 7: Análise da proporção das populações celulares expressando Granzima A no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=20) e indivíduos não infectados (n=5). Para determinar se há diferença entre os diferentes grupos foi utilizado o Teste T não pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Chg e NI estão indicadas por **.

5.5. Correlação de células $TCD8^+HLA-DR^+$ e Granzima A em pacientes chagásicos em fase aguda

Investigamos se a expressão de granzima A estaria correlacionada à expressão do marcador de ativação celular nas subpopulações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$. A estratégia de análise baseou-se em correlacionar a frequência de células $TCD8^+HLA-DR^+$ ou $TCD4^+HLA-DR^+$ e a frequência de Granzima A, umas das principais moléculas da via citotóxica. Nossos resultados mostraram que, embora não tenha sido observada correlação positiva entre as células $TCD4^+HLA-DR^+$ e $TCD4^+GranzimaA^+$ (dados não mostrados), a correlação da frequência de células $TCD8^+HLA-DR^+$ e a expressão de Granzima A é significativa (Figura 5).

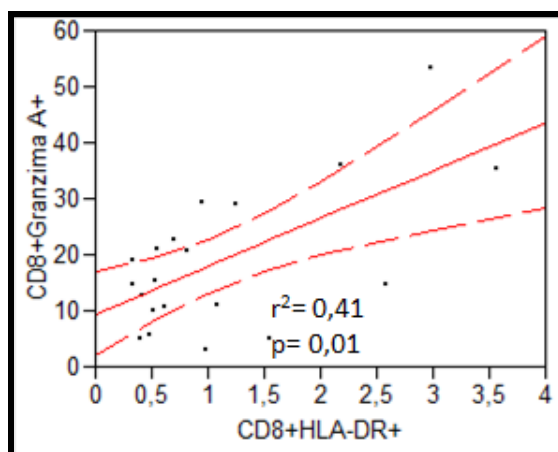


Figura 5: Análise da correlação da frequência de células $TCD8^+Granzima A^+$ e células $TCD8^+HLA-DR^+$ no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda (n=20).

5.6. Comparação da frequência de células $TCD8^+Granzima^+$ produtoras de IL-6, IL-1 β e TNF- α em pacientes chagásicos agudos e indivíduos não infectados

Uma vez que a atividade efetora das células $TCD8^+Granzima^+$ estaria comprometida a atuar em nos sítios inflamatórios da infecção chagásica, avaliamos três citocinas com propriedades inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6, que estão diretamente envolvidas no recrutamento de linfócitos para área de lesão. Comparando-se pacientes chagásicos agudos (Chg) e indivíduos não infectados (NI), observamos um aumento significativo da expressão

de TNF- α e IL1- β em células TCD8⁺Granzima A⁺ em pacientes chagásicos agudos em relação a indivíduos não infectados (NI) (Tabela 8).

	%TCD8 ⁺ Granzima A ⁺ IL-1 β ⁺	%TCD8 ⁺ Granzima A ⁺ TNF- α ⁺	%TCD8 ⁺ Granzima A ⁺ IL-6 ⁺
Grupo			
NI (n=5)	2,40 \pm 0,65	3,27 \pm 2,56	2,65 \pm 0,98
Chg (n=20)	** 4,84 \pm 2,28	** 8,01 \pm 3,58	6,46 \pm 3,11

Tabela 8: Análise da frequência de citocinas inflamatórias IL1- β , TNF- α e IL-6 em células TCD8⁺Granzima⁺ no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Chg (n=20) e indivíduos não infectados-NI (n=5). ** representa diferença significativa com p<0.05.

6. Resultados- parte II

6.1. Estudo das populações de células T em pacientes chagásicos agudos, comparando os dados aos obtidos de pacientes chagásicos em fase crônica recente

Em contraste com a fase aguda na qual são detectados altos níveis de parasitemia e parasitismo, a evolução para a fase crônica é acompanhada por uma diminuição desses níveis, sendo que o estímulo de linfócitos acontece em resposta a uma variedade de antígenos de natureza persistente na fase crônica da infecção. Considerando-se esse contexto, é de grande relevância verificar se a evolução para a fase crônica recente dos pacientes em nosso estudo se traduz em diferenças quantitativas nas subpopulações celulares TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻. Não observamos alteração na frequência das populações celulares TCD4⁺, TCD8⁺ e TDN ao compararmos os dados de pacientes chagásicos em fase aguda aos dados dos mesmos em fase crônica recente (Figura 6).

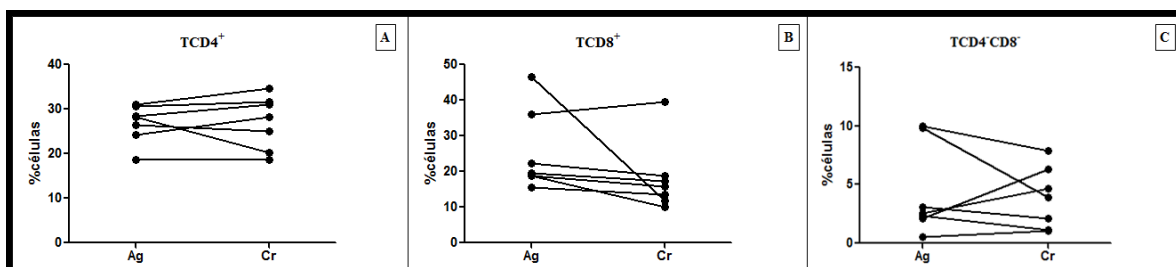


Figura 6: Análise da frequência de células TCD4⁺ (A), TCD8⁺ (B) e TCD4⁻CD8⁻ (C) presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda-Ag e crônica recente-Cr.

6.2. Perfil de citocinas em pacientes chagásicos agudos, comparando-se os dados dos mesmos em fase crônica

Além de avaliarmos a frequência de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁻CD8⁻, comparamos a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 nas populações de linfócitos T no sangue periférico de pacientes em fase aguda que progrediram para a fase crônica da doença de Chagas, uma vez que em modelos experimentais foi demonstrado que essas citocinas podem ter atuações distintas de acordo com o estágio da infecção com o *T. cruzi* (Bryan et al., 2010), fenômeno esse também observado para infecção com *Leishmania amazonensis* (Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007). Observamos que, de forma interessante, não há alteração

na frequência das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 dentro da população linfocitária total assim como da frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TDN expressando as mesmas ao compararmos os dados de pacientes chagásicos em fase aguda aos dados de fase crônica recente (Tabela 9).

	Grupos	Citocina total	%TCD4 ⁺ Citocina ⁺	%TCD8 ⁺ Citocina ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁺ Citocina ⁺
IFN- γ	Ag (n=7)	6,82 \pm 3,81	1,81 \pm 1,78	0,40 \pm 0,41	4,62 \pm 2,48
	Cr (n=7)	9,70 \pm 7,02	1,07 \pm 1,10	0,05 \pm 0,05	8,58 \pm 6,20
IL-10	Ag (n=7)	2,92 \pm 2,53	1,45 \pm 1,91	0,44 \pm 0,51	1,03 \pm 0,93
	Cr (n=7)	1,75 \pm 2,47	0,61 \pm 1,36	0,15 \pm 0,24	0,15 \pm 0,24
IL-17	Ag (n=7)	13,10 \pm 6,73	2,66 \pm 2,32	1,33 \pm 1,31	9,12 \pm 5,54
	Cr (n=7)	17,43 \pm 10,92	2,84 \pm 3,67	0,58 \pm 0,88	14 \pm 6,70

Tabela 9: Porcentagem de expressão de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 dentro da população linfocitária total e frequência de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁺CD8⁺ positivas para essas citocinas presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos agudos-Ag (n=7) e crônicos-Cr (n=7). Para determinar se há diferença entre os grupos foi utilizado o Teste T pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ag e Cr estão indicadas por **.

6.2.1. Contribuição das populações celulares na produção de citocinas em pacientes chagásicos, comparando-se aos dados de pacientes em fase crônica

Com base nos dados da Tabela 9, analisamos a proporção das populações de células TCD4⁺, TCD8⁺ e TCD4⁺CD8⁺ expressando as citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10, resultados apresentados na Tabela 10. Em relação à citocina IFN- γ , tanto na fase aguda quanto na crônica recente, observa-se que as principais fontes produtoras dessa citocina inflamatória são as células TDN, sendo que a proporção dessas é significativamente maior na fase crônica recente. Seguindo-se às células DN, as células TCD4⁺ são importantes fontes produtoras nas duas fases da doença de Chagas. Por fim, a frequência de células TCD8⁺ expressando IFN- γ é maior na fase aguda em relação à crônica. Quanto à citocina modulatória IL-10, observamos contribuições similares das células TCD4⁺ e TDN, seguidas das células TCD8⁺ em pacientes chagásicos em fase aguda. Na fase crônica recente, por sua vez, a principal fonte produtora de IL-10 são as células TDN, seguidas por baixas frequências de células TCD4⁺ (22,47%) e TCD8⁺ (9,72%). As células TDN são principais produtoras de IL-17 tanto nos pacientes

chagásicos em fase aguda quanto crônica recente, seguidas pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺, respectivamente (Tabela 10).

Citocina	Proporção das populações celulares na produção de citocinas			
	Grupos	%TCD4 ⁺	%TCD8 ⁺	%CD4 ⁺ CD8 ⁻
IFN- γ	Ag (n=7)	23,98 \pm 11,87	** 5,36 \pm 3,30	70,66 \pm 14,18
	Cr (n=7)	9,84 \pm 6,49	0,47 \pm 0,32	** 89,69 \pm 6,74
IL-10	Ag (n=7)	44,48 \pm 27,41	14,46 \pm 8,97	41,06 \pm 32,37
	Cr (n=7)	22,47 \pm 19,53	9,72 \pm 10,83	67,81 \pm 23,90
IL-17	Ag (n=7)	21,14 \pm 11,85	9,15 \pm 6,65	69,71 \pm 17,67
	Cr (n=7)	14,80 \pm 13,47	2,97 \pm 3,24	82,22 \pm 16,65

Tabela 10: Análise da proporção das populações celulares para a produção de cada uma das citocinas no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase aguda-Ag (n=7) e crônica recente -Cr (n=7). Para determinar se há diferença entre os grupos foi utilizado o Teste T pareado. Em cada parâmetro avaliado, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ag e Cr estão indicadas por **.

7. Discussão

Já está bem estabelecido que o sistema imune é um dos fatores determinantes na cronificação diferencial da doença de Chagas. Dentre os componentes do sistema imune que tem participação destacada nesse processo estão os linfócitos, os quais são diretamente envolvidos tanto na resposta efetora quanto no aspecto de imunorregulação. Além disso, diante da complexidade de interações que ocorrem no sistema imune, os linfócitos são críticos na geração de outras respostas imunes tão importantes quanto no controle da replicação parasitária.

Um dos primeiros aspectos considerados em nosso estudo foi a investigação da frequência das populações de células T em pacientes infectados com o *T. cruzi*, uma vez que em modelos experimentais a expansão policlonal de linfócitos T e B é uma das características críticas da infecção (Minoprio et al., 1986). Na fase aguda da doença de Chagas humana, por sua vez, Sathler-Avelar e colaboradores (2003) caracterizaram uma expansão de células B e ativação de monócitos, mas não de linfócitos T. Embora no presente estudo não tenhamos utilizado marcadores de superfície para identificação de células B, a ausência de expansão de células TCD4⁺ (Figura 1A), TCD8⁺ (Figura 1B) e células TDN (Figura 1C) observada em nossos resultados é mais uma evidência de que na fase aguda há pouca resposta proliferativa de linfócitos, a qual poderia estar relacionada à baixa expressão do receptor para IL-2, como demonstrado por Mosca e Briceno, 1993. Embora não tenhamos observado proliferação de linfócitos T no sangue periférico, é importante ressaltar que tal fenômeno poderia estar ocorrendo em órgãos linfóides periféricos, como demonstrado por de Meis e colaboradores (2009) em modelos experimentais.

Apesar de não observarmos modificações quantitativas nas populações celulares avaliadas em nosso trabalho, o perfil de ativação pode ter um significado funcional extremamente relevante nos demais fenômenos imunes desencadeados pela infecção com o *T. cruzi*. Considerando que na doença de Chagas há uma constante estimulação com antígenos autólogos e/ou heterólogos (Cunha-Neto, 1994), a expressão de um marcador de ativação tardio foi pertinente para nosso estudo, de forma que analisamos a expressão de HLA-DR em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Observamos que há significativo aumento de células TCD4⁺ positivas para HLA-DR (Figura 2A), dados esses que também foram observados em pacientes na fase crônica (Dutra et al., 1994, Sathler-Avelar et al., 2003), de forma que podemos inferir

que logo nos estágios iniciais da infecção os antígenos parasitários seriam capazes de elicitar ativação de células TCD4⁺. Albareda e colaboradores (2010) mostraram que, em pacientes chagásicos com infecção crônica recente, há aumento de células TCD8⁺ com perfil de diferenciação tardia (CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻) e, assim como nos nossos dados em pacientes chagásicos em fase aguda, não verificou alteração na frequência de células TCD8⁺ expressando o marcador HLA-DR, sugerindo-se que, logo nos estágios iniciais da infecção a estimulação antigênica constante que leva à ativação intensa de células T acaba por gerar exaustão das mesmas. No contexto em que o *T. cruzi* apresenta mecanismos de escape da resposta imune, Lopes e colaboradores, 1995, mostraram que na infecção experimental aguda, as células TCD4⁺, após ativação, morrem por apoptose.

A existência de clones celulares secretando intensamente determinadas citocinas durante a infecção foi considerada como extremamente pertinente para o nosso estudo, uma vez que a cinética de produção dessas citocinas assim como a ampla comunicação celular derivada desse processo pode ser explorada para intervenção terapêutica. Ao compararmos os dados obtidos de pacientes chagásicos em fase aguda aos de indivíduos não infectados, observamos que no primeiro grupo há menor frequência de células TCD4⁺ expressando IL-10, dado esse que se contrapõe ao de Samudio e colaboradores, 1998, o qual mostrou que as células TCD4⁺ são a principal fonte de IL-10 em pacientes chagásicos agudos. Pode-se sugerir que as divergências de resultados podem ser devido a diferenças de metodologias assim como pelo fato dos pacientes analisados serem provenientes de áreas endêmicas distintas. Em relação à citocina IL-17, observa-se menor frequência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando a mesma em pacientes chagásicos em fase aguda (Tabela 4). A maioria dos dados da literatura focam nas células TCD4⁺ como importante produtoras de IL-17 e associando as mesmas com fenômenos de autoimunidade (Harrington et al., 2005), porém na doença de Chagas humana essas estão associadas à regulação da cardiomiopatia (Guedes et al., 2012; De Araújo et al, 2012, Magalhães et al., , no prelo). Uma vez que observamos uma menor frequência de células TCD4⁺ expressando IL-10 e IL-17, pode-se sugerir que mecanismos imunorregulatórios encontram-se suprimidos na fase aguda da doença, o que poderia gerar descontrole do processo inflamatório intenso elicitado pela presença do parasito na fase aguda. Alternativamente, esta diminuição de citocinas modulatórias poderia ter um importante papel em permitir a ativação de células fagocíticas, essenciais para a eliminação do parasito. De fato, sabe-se que a parasitemia é controlada na fase aguda, uma vez que pacientes crônicos possuem níveis de parasitemia extremamente baixos.

De forma interessante, ao analisamos a contribuição das populações celulares na expressão das citocinas em estudo, observamos que a proporção de células TCD4⁺CD8⁻ produtoras tanto da citocina inflamatória IFN- γ quanto da citocina modulatória IL-10 é maior nos pacientes chagásicos em fase aguda comparando-se aos dados de indivíduos não infectados (Tabela 5). Corroborando nosso estudo, dados anteriores da literatura mostraram também o comprometimento das células duplo negativas com a produção de IFN- γ . No modelo de Leishmaniose cutânea, por exemplo, Bottrel e colaboradores, 2001, mostraram que as células TDN são a segunda fonte celular, após TCD4⁺, comprometida com a produção da citocina inflamatória IFN- γ . Villani e colaboradores (2010), por sua vez, revelaram a importante contribuição das células T duplo negativas no desenvolvimento das formas polares da doença de Chagas, isso porque os dados mostraram que as células TDN com TCR $\alpha\beta$ ⁺ estão comprometidas com a produção de citocinas próinflamatórias, em contraposição com as células TDN com TCR $\gamma\delta$ ⁺ que estão comprometidas com a produção da citocina modulatória IL-10. Este foi um dado interessante considerando-se que estas células são preferencialmente ativadas por antígenos não peptídicos (Zajong e Krinemberg, 2007), apontando para uma nova e até então inexplorada possível forma de intervenção na doença.

A citocina inflamatória TNF- α é expressa em células do infiltrado inflamatório do coração de pacientes chagásicos crônicos, avaliado através de biópsias do tecido (Reis et al., 1993), sendo que em pacientes chagásicos cardiopatas observa-se maior frequência de células TCD8⁺ expressando essa citocina além do receptor de quimiocina CCR5 comparando-se a pacientes com a forma clínica indeterminada (Savino et al., 2007; Gomes et al., 2005), sugerindo-se dessa forma que o TNF- α esteja envolvido na manutenção da miocardia chagásica. Em nossos dados, observamos uma alta proporção de células TCD8⁺ expressando essa citocina ($43,97 \pm 13,36$), o que poderia indicar a existência de um componente inflamatório logo no estágio inicial da infecção. No contexto em que a citocina IL-6 induz a expressão de moléculas de adesão, essenciais ao processo de migração de linfócitos para órgãos não-linfóides (Gao e Pereira, 2002), observamos uma alta proporção de células TCD4⁺ expressando essa citocina ($56,60 \pm 14,23$) nos pacientes em fase aguda da doença de Chagas. Além da função inflamatória, essa subpopulação também poderia estar envolvida na ativação e diferenciação de células T antígeno específicas, como demonstrado em modelos experimentais (Samoilova et al., 1998, Boe et al., 1999).

Diante desses dados, constatamos a importância da reatividade celular efetuada por meio de citocinas produzidas por células imunocompetentes. Deve-se enfatizar, no entanto,

que, dependendo do balanço entre citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias, a célula ativada pode desempenhar um papel protetor ou citotóxico, levando, muitas vezes, à injúria tecidual. No nosso trabalho, escolhemos avaliar as citocinas IL-10, IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-1 β e IL-6 devido ao seu papel já demonstrado como importante na doença de Chagas (Dutra et al., 2000, Gomes et al., 2003, Cunha-Neto et al., 2005) e também em modelos experimentais (Roffê et al., 2012, Chessler et al., 2011, Miyazaki et al., 2010). Em nosso estudo, não observamos alteração na razão de cada uma das citocinas inflamatórias pela citocina modulatória IL-10 (Figura 3). A presença simultânea de respostas a estímulos antigênicos assim como aquelas mediadas por anticorpos durante a fase crônica da doença de Chagas poderiam explicar a existência de reatividade inflamatória e antiinflamatória detectada na maioria dos pacientes, como demonstrado por Dutra e colaboradores (1997).

Além do balanço de citocinas, outro aspecto muito valioso para nosso estudo consistiu em analisar a correlação de cada uma das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-17, IL-1 β , IL-6 e TNF- α com a citocina modulatória IL-10. Nossos dados apontaram para uma correlação positiva entre IFN- γ e IL-10 (Figura 4), o que é particularmente importante uma vez que, nessa fase da infecção, mecanismos inflamatórios de eliminação ao parasito seriam acompanhados por atividade regulatória. Essa dualidade de perfil de expressão de citocinas antagônicas foi observada *in vitro* e *in vivo* após estímulo com antígenos derivados de âncoras de GPI do *T. cruzi*. Demonstrou-se uma indução da co-expressão das citocinas IFN- γ e IL-10 em células TCD4⁺ (Flores-García et al., 2011), as quais são ativadas em um ambiente de forte estímulo antigênico. Dada a contraposição da IL-10 ao efeito inflamatório do IFN- γ , sugere-se que essa subpopulação celular tem atividade imunorregulatória (Liu et al., 2009), uma vez que mecanismos efetores seriam seguidos por atividade modulatória. A correlação positiva das citocinas IL-10 e IL-17, demonstrada como benéfica na esclerose múltipla (Edwards et al., 2011) e em pacientes que se submeteram ao transplante de órgãos (Mohammadnia et al., 2011), não foi observada em nossos dados. As demais correlações de IL-1 β , TNF- α e IL-6 com a citocina IL-10 também não foram significativas, devendo-se enfatizar, no entanto, que essa análise foi realizada considerando-se a população linfocitária total. No contexto em que o sistema imune é composto de vias muito conectadas, é possível que citocinas inflamatórias e antiinflamatórias derivadas de populações celulares distintas estejam atuando em conjunto e, desta forma, contribuindo para o balanço de citocinas.

Outro aspecto crítico para o desempenho da resposta imune adaptativa é a presença de células nos sítios de lesão inflamatória. Sabe-se que na composição do infiltrado inflamatório

no tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica foi encontrada uma predominância de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima A (Reis et al. 1993), a qual tem importância na regulação imune (Chowdhury e Lieberman, 2008). A presença de elevadas concentrações de granzima A circulante em vários processos inflamatórios e a clivagem mediada por granzima de substratos extracelulares sugerem que essas proteases possam ter um papel extracelular relevante na rejeição de vírus e tumores, mas também na patogênese de doenças inflamatórias crônicas (revisto por Romero e Andrade, 2008). Villani e colaboradores (2010) mostraram aumento dessa molécula citotóxica em pacientes com cardiopatia dilatada. No nosso trabalho observamos uma maior frequência de células TCD4⁺Granzima A⁺ nos pacientes chagásicos agudos em relação aos não infectados (Tabela 7). Na infecção com o HIV, a expansão de células TCD4⁺ produtoras de Granzima A durante os estágios iniciais da infecção atua no controle da replicação viral (Soghoian et al., 2012), fenômeno esse que também poderia ocorrer nos estágios iniciais da infecção com o *T. cruzi*. Na fase crônica da doença de Chagas, de Araújo e colaboradores, 2012, observaram que pacientes com a forma indeterminada apresentam uma frequência de células TCD4⁺ expressando granzima B e que essa população teria papel não apenas citotóxico como também regulatório.

Objetivando adquirir informações quanto ao perfil de ativação das células TCD8⁺ expressando Granzima A, realizamos a análise de correlação da frequência de células TCD8⁺HLA-DR⁺ e células TCD8⁺ produtoras de Granzima A, a qual mostrou-se positivamente significativa (Figura 5). Ao estudar pacientes alérgicos, Geraldes e colaboradores, 2010, mostraram que células T reguladoras expressando HLA-DR apresentam maior expressão de genes relacionados à citotoxicidade celular comparando-se a células T reguladoras sem expressão de HLA-DR. No contexto da infecção chagásica, a presença de células TCD8⁺ ativadas secretando Granzima A é importante para o controle da replicação parasitária, porém na fase crônica, a persistência de estímulos antigênicos causaria uma cronificação desse fenômeno, causando extenso dano tecidual.

Avaliamos ainda a expressão das citocinas próinflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas células TCD8⁺ produtoras de Granzima A, uma vez que as duas primeiras estão associadas a um grande número de alterações nas funções da célula endotelial, que por sua vez poderiam estar implicadas nas alterações microvasculares observadas na miocardia chagásica. Além disso, essas citocinas, assim como o TNF- α , modulam a expressão das moléculas de adesão que recrutam linfócitos para os sítios de inflamação. Observamos que pacientes chagásicos apresentam aumento significativo de células TCD8⁺ granzima A⁺ produtoras de IL-1 β e TNF- α

(Tabela 8), corroborando com nossa hipótese. Esse fenômeno observado na fase aguda nos faz questionar, no entanto, se seria um mecanismo de controle parasitário para o hospedeiro nessa fase ou se já seria um potencial causador de danos teciduais que seriam intensificados ao longo da infecção.

A segunda parte de nosso trabalho é de extrema contribuição para nortear a identificação de biomarcadores de prognóstico para a doença de Chagas, uma vez que traçamos um perfil imunológico dos pacientes da primeira etapa do estudo, que agora estão em fase crônica recente.

Diferentes delineamentos experimentais tem demonstrado a relevância dos linfócitos TCD4⁺ na imunidade anti *T. cruzi*, assim como dos linfócitos T CD8⁺. Uma questão que permanece ainda mal compreendida é o entendimento da funcionalidade das células T duplo negativas no contexto da infecção chagásica. Embora representem uma minoria das células T de indivíduos saudáveis, as células TDN apresentam-se em frequência aumentada em algumas doenças autoimunes e imunodeficiências (Shivakumar et al., 1989; Ilum et al., 1991; Sieling et al., 2000; Ohga et al., 2002). No nosso estudo, não observamos alteração quantitativa das subpopulações celulares nos pacientes chagásicos agudos e crônicos (Figura 6), porém em modelo de infecção experimental, foram descritos níveis elevados de células T duplo negativas no linfonodo, e alguns desses linfócitos possuem um TCR potencialmente autorreativo, que poderia contribuir para o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica através da resposta autoimune (Mendes-da-Cruz et al., 2003). Dado que existem evidências de que a doença de Chagas possui um componente de autorreatividade (Cunha-Neto et al., 1994), estudos que visam determinar se há expansão e ativação preferencial de subpopulações celulares expressando determinadas cadeias de TCR na infecção com o *T. cruzi* seria de grande contribuição.

A análise funcional de populações celulares ao longo da evolução da doença mostra-se muito informativa, considerando-se dados anteriores da literatura que mostraram papel funcional distinto das populações celulares ao longo da infecção chagásica. Um exemplo bem caracterizado é a citocina IFN- γ , cujos níveis encontram-se maiores em pacientes chagásicos tratados curados, sugerindo-se um papel protetor para essa citocina no processo de cura associado ao tratamento quimioterápico (Bahia-Oliveira et al., 2000). Gomes e colaboradores (2003), por sua vez, mostraram uma clara associação entre a produção de IFN- γ e a morbidade da doença de Chagas crônica. Ao compararmos os dados de pacientes em fase aguda aos de fase crônica recente, observamos que a frequência das populações celulares não

se altera (Tabela 9), o que poderia indicar que, em um estágio recente da fase crônica, a dinâmica de expressão de citocinas ainda não tenha sido alterada.

No contexto em que a dinâmica das populações celulares e o perfil das mesmas são determinantes para a evolução da infecção, a análise dessas quanto à expressão de diversas citocinas pode indicar a existência de um ambiente inflamatório ou imunorregulatório. Comparando-se a proporção de células TCD8⁺IFN- γ ⁺, observamos que essas são maiores nos pacientes chagásicos em fase aguda em relação aos mesmos em fase crônica recente (Tabela 10). Com base em modelos experimentais, uma menor frequência de células TCD8⁺ expressando IFN- γ na fase crônica poderia indicar uma exaustão clonal devido à uma estimulação antigênica persistente (Martin e Tarleton, 2004). A exemplo da demonstração feita por Leavey e Tarleton (2003), a maioria dos linfócitos T CD8⁺ infiltrantes no coração, com fenótipo de células ativadas e/ou de memória, apresentava funcionalidade imunológica atenuada representada pela menor produção de IFN- γ , o que poderia contribuir para o descontrole do parasito e resposta inflamatória danosa. Deve-se considerar também que, à medida que a replicação parasitária é controlada, células TCD8⁺ parasito-específicas formam uma população de memória (Padilla et al., 2008).

As células TCD4⁻CD8⁻ são as principais fontes produtoras de IL-17 tanto na fase aguda (69,71 \pm 17,67) quanto na crônica recente (82,22 \pm 16,65), sendo que essa mesma população celular também expressa altos níveis de IL-10 na fase crônica recente (67,81 \pm 23,90) (Tabela 10). Guedes e colaboradores, 2012, mostraram que na doença de Chagas humana, baixos níveis de IL-17 e IL-10, contraposto a altos níveis de IFN- γ e TNF- α , estão correlacionados à gravidade das lesões do miocárdio em pacientes chagásicos, observação essa que poderia estar relacionada à uma deficiência nas atividades supressoras das células duplo negativas.

Os resultados aqui apresentados trouxeram informações inéditas e extremamente relevantes referentes às características dos linfócitos na resposta imune contra a infecção aguda humana com o *T. cruzi*. Deve-se ressaltar, no entanto, que alguns pontos importantes ainda não foram avaliados no presente estudo, tal como a sorologia dos pacientes e análises que mostrem se aqueles pacientes que se encontravam em fase crônica recente já apresentavam algum grau de acometimento cardíaco. Esses dados são críticos ao trabalho e serão obtidos em breve. Uma outra questão a ser enfatizada é que a análise de citocinas foi toda realizada no contexto *ex vivo*, ao contrário da maioria dos dados da literatura que

utilizam-se de estímulos antigênicos, o que é muito interessante uma vez que indica intensa ativação celular nos pacientes analisados em nosso estudo.

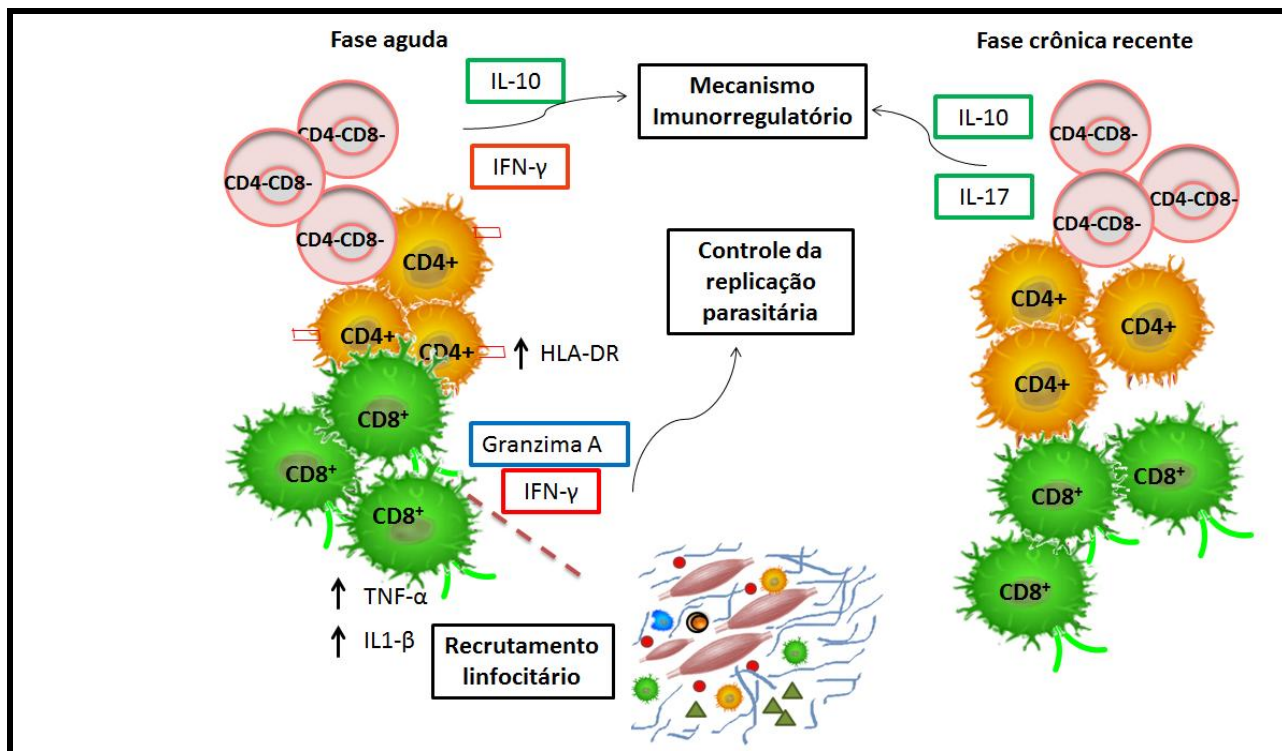
Como perspectivas, algumas importantes questões devem ainda ser elucidadas, tais como: (1) há existência de expansão preferencial de alguma sub-população celular expressando região variável conservada dentro das cadeias α , β , γ ou δ dos receptores de célula T (TCR)?; (2) qual a função dos linfócitos B na fase aguda da infecção?; (3) qual a participação das células T com TCR $\gamma\delta$; (4) como ocorre o processo de apresentação de antígenos para as diferentes populações de linfócitos T? (5) como os dados observados na fase aguda podem impactar a evolução na fase crônica?

O entendimento da biologia dos linfócitos, englobando suas características funcionais e fenotípicas e expressão de citocinas é crucial para nortear o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que possam interromper ou evitar a progressão da doença de Chagas em suas formas clínicas mais graves.

8. Conclusão

Tendo em vista os resultados apresentados, concluímos que na fase aguda da doença de Chagas, os pacientes apresentam reatividade celular intensa caracterizada por aumento da frequência de células TCD4⁺ expressando HLA-DR e aumento da frequência da expressão de citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α em células TCD8⁺ expressando a molécula citotóxica Granzima A. De forma interessante, observamos uma correlação entre as frequências totais das citocinas IL-10 e IFN- γ na fase aguda, podendo-se sugerir a elicitação de mecanismos imunorregulatórios protetores ao hospedeiro. Ao longo da infecção, na qual a fase crônica recente é estabelecida, observamos um perfil de células TCD8⁺ com menor expressão de IFN- γ . As células T duplo negativas assumem um papel de destaque, uma vez que são as maiores fontes produtoras de IL-10 e IL-17. Os resultados obtidos no trabalho estão resumidos no esquema 6.

Nossos estudos abrem importantes perspectivas para a identificação de biomarcadores de progressão da doença, representando um grande avanço no tratamento dessa doença tão negligenciada.



Esquema 6: Resumo dos dados encontrados em nosso trabalho. Na fase aguda da doença, observamos um perfil de ativação dada a maior frequência de células TCD4⁺ expressando o marcador de ativação HLA-DR. Essa mesma população celular tem contribuição significativa na expressão da molécula citotóxica Granzima A, a qual é importante mecanismo de controle da replicação parasitária. As células TCD8⁺ expressando Granzima A tem alta expressão das citocinas TNF- α e IL-1 β , as quais tem participação fundamental no recrutamento linfocitário para os focos inflamatórios. As células duplo negativas tem grande destaque uma vez que são importantes fontes produtoras tanto da citocina modulatória IL-10 quanto da citocina inflamatória IFN- γ , indicando um mecanismo imunorregulatório na fase aguda da doença. Na fase crônica recente, por sua vez, essas células também são elementos essenciais nos mecanismos imunorregulatórios uma vez que são importantes fontes produtoras das citocinas IL-10 e IL-17. A frequência de células TCD8⁺ IFN- γ ⁺ é menor na fase crônica recente em relação à fase aguda, o que poderia contribuir para o descontrole do parasito e resposta inflamatória danosa.

9. Referências

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.24, p.783-801, 2006.

Albareda, M.C., Olivera, G.C., De Rissio, A.M., Postan, A.M. Short Report: Assessment of CD8+ T cell differentiation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.861-864, 2010.

Al-Daccak, R., Mooney, N., Charron, D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. **Current Opinions Immunology**, v.16, p.108–113, 2004.

Andrade, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.71-80, 1999.

Angheben, A., Anselmi, M., Gobbi, F., Marocco, S., Monteiro, G., Buonfrate, D., Tais, S., Talamo, M., Zavarise, G., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Mantella, A., Di Tommaso, M., Aiello, Kh., Veneruso, G., Graziani, G., Ferrari, M., Spreafico, I., Bonifacio, E., Gaiera, G., Lanzafame, M., Mascarello, M., Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Eurosurveillance**, v.16, p.1-8, 2011.

Araújo-Jorge, T., El-Bouhdini, A., Rivera, M.T., Daeron, .M., Carlier, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice enhances the membrane expression of low-affinity Fc receptors for IgG the release of their soluble forms. **Parasite Immunology**, v.15, p.539-546, 1993.

Argibay, P.F., Di Noia, J.M., Hidalgo, M., Mocetti, E., Barbich, M.M., Lorenti, A.S., Bustos, D., Tambutti, M., Hyon, S.H., Frasch, A.C., Sanchez, D.O. *Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. **Glycobiology**, v.12, p.25-32, 2002.

Azuma, M., Phillips, J.H., Lanier, L.L. CD28 co-stimulation of T cell mediated cytotoxicity. **International Journal of Cancer**, v.7, p.33-39, 1993.

Bahia-Oliveira, L.M., Gomes, J.A., Cancado, J.R., Ferrari, .T.C., Lemos, E.M., Luz, Z.M., Moreira, M.C., Gazzinelli, R.T., Correa-Oliveira, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **Journal of Infectious Diseases**, v.182, p.634-638, 2000.

Barbosa, P.R.B. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v.112, p.132-133, 2006.

Bastos, C.J.C., Aras, R.,Mota, G.,Reis, F.,Dias, J.P.,Jesus, R.S.Freire, M.S.,Araújo, E.G., Prazeres, J.,Grassi,M.F.R. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeast Brazil. **Plos Neglected Diseases**, v.4, e711, 2010.

Bern, C, Martin, D.L, Gilman RH, 2011. Acute and congenital Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 19-47, 2011.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V.K. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature Reviews**, v.453, p.1051-1057, 2008.

Boe, A., Baiocchi, M., Carbonatto, M., Papoian, R., Serlupi-Crescenzi, O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. **Cytokines** , v.11, p.1057-1064, 1999.

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. Seroprevalence of Chagas disease in school children from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil; six years following the onset of epidemiological surveillance. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.81-86, 2006.

Born, W. K, O'Brien R.L. Antigen-restricted gamma delta T-cell receptors? **Archivus Immunologiae Therapiae Experimentalis**, v.57, p.129-135, 2009.

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. Gollob. 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. **Infection and Immunity**, v.69, p.3232–3239, 2001.

Brodskyn, C., Silva, A.M.M., Takehara, H.A., Mota, I. IgG subclasses responsible immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology and Cell Biology**, v.67, p.343, 1989.

Bryan., M.A., Siobhan, E.G., Norris, K.A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.e733, 2010.

Campos, M.A., Closel, M., Valente, E.P., Cardoso, J.E., Akira S, Alvarez- Leite, J.I. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **Journal of Immunology**, v.172, p.1711-1718, 2004.

Cardillo, F., Voltarelli, J.C., Reed, S.G., Silva, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK Cells. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-134, 1996.

Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.11-80, 1909.

Champagne, E. $\gamma\delta$ T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. **Archivus Immunologiae Therapiae Experimentalis**, v.59, p.117-137, 2011.

Chessler, A.D., Caradonna, K.L., Da'dara, A. Burleigh, B.A. Type I interferons increase host susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infections. **Infection and Immunity**, v.79, p.2112-2119, 2011.

Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Immunology**, v.4, p.336-347, 2011.

Chowdhury, D., Lieberman, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **Annual Review of Immunology**, v.26, p.389-420, 2008.

Coffmanm, R. L. Origins of the T (H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nature Immunology**, v.7, p.539-41, 2006.

Corso, A.L., Pitrez, P.M.C., Machado, .D.C., Stein, R.T., Jones, M.H. TNF- α and IL-10 levels in tracheobronchial lavage of ventilated preterm infants and subsequent lung function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.569-576, 2007.

Costa, R.P., Gollob, K.J., Fonseca, L.L., Rocha, M.O., Chaves, A.C., Medrano-Mercado, N., Araújo-Jorge, T.C., Antas, P.R., Colley, D.G., Correa-Oliveira, R., Gazzinelli, R.T., Carvalho-Parra, J., Dutra, W.O. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.51, p.511-519, 2000.

Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed- A background article. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.113-122, 2007.

Covarrubias, C., Cortedaz, M., Ferreira, D., Yoshida, N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal Parasitology**, v.37, p.1609-1616, 2007.

Cowley, S.C., Meierovics, A.I., Frelinger, J.A., Iwakura, Y., Elkins, K.L. Lung CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN-gamma during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain. **Journal of Immunology**, v.184, p.5791–5801, 2010.

Cuna, W.R., Cuna, C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.503-506, 1995.

Cunha-Neto, E., Dzau, V.J., Allen, P.D., Stamatiou, D., Benvenuti, L., Higuchi, M.L., Koyama, N.S., Silva, J.S., Kalil, J., Liew, C. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **American Journal of Pathology**, v.167, p.305-313, 2005.

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

Dácquisto, F., Cromptoh, T. CD3 (+) CD4 (-) CD8 (-) T cells: saviours or villains of the immune response? **Biochemical Pharmacology**, v.15, p.330-340, 2011.

De Araújo, F.F., Corrêa-Oliveira, R., Rocha, M.O.C., Chaves, A.T., Fiuza, JA., Fares, R.C.G., Ferreira, K.S., Nunes, M.C.P., Keesen, T.S., Damasio, M.P.S., Teixeira-Carvalho, A.Gomes, J.A.S. Foxp3+CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v.8, p.768-777, 2012.

de Meis, Marrot, A., Farias-de-Oliveira, D.A., Villa-Verde, D.M., Savino, W. Differential regional immune responses in Chagas disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, p.e417, 2009.

de Oliveira, R. B., Troncon, L. E., Dantas, R. O. And Menghelli, U. G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **American Journal of Gastroenterology** , v.93, p.884–889, 1998.

Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.296–300, 2008.

Dias, J.C.P., Silveira, A.C., Schofield, C.J. The impact of Chagas' Disease control in Latin America- a review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.603-612, 2002.

Dias JCP 1982. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo Clínico-epidemiológico a Partir da Fase Aguda, entre 1940 e 1982, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Dias, J.C.P. The indeterminate form of human chronic disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, p.147- 156, 1989.

Dias JCP, Coura JR 1997. Epidemiologia, p. 33-65. In JCP Dias & JR Coura (eds), Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma Abordagem Prática para o Clínico Geral, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Di Girolamo, C., Bodini, C., Marta, B.L., Ciannameo, A., Cacciatore, F. Chagas disease at the crossroad of international migration and public health policies: why a national screening might not be enough. **Eurosurveillance**, v.15, p.1-5, 2011.

Dominguez, M. R.; Ersching, J., Lemos, R.; Machado, A., Rodrigues, O.; De Vasconcelos, M.M., Ronnie, J. Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite **Vaccine**, v. 30, p. 2882-2891, 2012.

Dutra WO, Martins-Filho O, Cançado JR, Dias JCP, Brener Z, Freeman Jr GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC 1994. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas disease. **International Immunology**, v.6, p. 499-506, 1994.

Dutra, W.O., Martins-Filho, O.A., Cançado, J.R., Pinto-Dias, J.C., Brener, Z., Gazzinelli, G., Carvalho, J.F., Colley, D.G. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.43, p.88-93, 1996.

Dutra, W.O., Gollob, K.J., Pinto-Dias, J.C., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R., Coffman, R.L., Carvalho-Parra, J.F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.45, p.74-80, 1997.

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. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5⁺ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.51, p.91-97, 2000.

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. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-produces schistosomiasis patients. **BMC Immunology**, v.6, p. 3-8, 2002.

Dutra, W.O., Gollob, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, p.287-92, 2008.

Edwards, L.J., Sharrack, B., Ismail, A., Tumani, H., Constantinescu, C.S. Central inflammation versus peripheral regulation in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 258, p. 1518-1527, 2011.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S,

Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v.15, p.409-15, 2005.

Fearon, D.T., Locksley, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v.272, p.50-54, 1996.

Ferraz, M.L., Gazzinelli, R.T., Alves, R.O., Urbina, J.A., Romanha, A.J. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1359-64, 2007.

Flores-Garcia, Y., Rosales-Encina, J.L., Stoskar, A.R., Talamas-Rohana. IL-10-IFN- γ double producers CD4+ T cells are induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Biological Sciences**, v.7, p.1093-1100, 2011.

Frauwirth, K.A., Thompson, C.B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. **Journal of Clinical Investigation**, v.109, p.295-299, 2002.

Gao, W., Pereira, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology**, v.32, p.167-170, 2002.

Geraldes, L, Morgado, J. Almeida, A, Todo-Bom, A, Santos, P., A Paiva, Cheira, C., Pais, M.L. Expression Patterns of HLA-DR+ or HLA-DR- on CD4+/CD25++/CD127low Regulatory T cells in Patients With Allergy. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.20, p.201-209, 2010.

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

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

Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Busek, S.C., Teixeira, M.M., Silva, J.S., Correa-Oliveira, R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infection and Immunity**, v.73, p.7969-7966, 2005.

Goronzy, J., Weyand, C. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. **Arthritis Research and Therapy**, v. 5, p.1-10 , 2008.

Greenwald, R.J, Freeman, G.J, Sharpe, A.H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.515-548, 2005.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., Ley, T.J. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic subsets and T regulatory cells. **Blood**, v.104, p.2840-2848, 2004.

Guedes, P.M.M., Gutoerrez, R.M.S., Silva ,G.K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G.J., Bendhack, L.M., Rassi, A.,Schmidt, A.Maciél, B.C., Neto, J.A.M., Silva, J.S. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, e4, 2012.

Guedes, P.M.M., Gutierrez, F.R.S., Maia, F.L., Milanezi, C.M., Silva, G.K., Pavanelli, W.R., Silva, J.S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.e604, 2010.

Guermontprez, P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Reviews of Immunology**, v.20, p.621–67, 2002.

Guidotti, L.G., Chisari, F.V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Annual Review of Pathology**, v.1, p.23–61, 2006.

Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. **Immunology Review**, v.146, p.57-59, 1995.

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

Higushi, M.D., Reis M.M., Aiello, V. D., Benvenuti, L. A, Gutierrez P.S., Bellotti, G., Pileggi, F. Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human, chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.56, p.485-489, 1997

Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G., Brombacher, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v.66, p.1208-1215, 1998.

Illum, N., Ralfkiaer, E., Pallesen, G., Geisler, C. Phenotypical and functional characterization of double-negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ T-cell receptor positive cells from immunodeficient patient. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.34, p.635-645, 1991.

Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D., Melo, M.B., Ropert, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.R.T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.12, e29, 2010.

Krettli, A.U., Brener, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, v.128, p.2009-2012, 1982.

Kronenberg, M., Engel, I. On the road: progress in finding the unique pathway of invariant NKT cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.186-193, 2007.

Krummel, M.F., Allison, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **Journal of Experimental Medicine**, v.1, p.459-465, 1995.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**, v.30, p.16-34, 2011.

Leavey, J.K, Tarleton, R.L. Cutting edge: dysfunctional CD8⁺ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.170, p.2264-2268, 2003.

Lopes, M.F., de Veiga, V.F., Santos, A.R., Fonseca, M.E., DosReis, G.A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by experimental Chagas' disease. **Journal of Immunology**, v.15, p.744-752, 1995.

Liu, X. S, Leerberg, J, MacDonald, K. IFN-(γ) promotes generation of IL-10-secreting CD4⁺ T cells that suppress generation of CD8 responses in an antigen-experienced host. **Journal of Immunology**, v.183, p.51-58, 2009

López, L., Arai, K., Giménez, E., Jiménez, M., Pascuzo, C., Rodríguez,-Bonfante, C., Bonfante-Carbacas. C-reactive protein and Interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. **Revista Española de Cardiología**, v.59, p.50-56, 2006.

Ma, X., Trinchieri, G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. **Advances Immunology**, v79, p.55–92, 2001.

Mariano, F.S., Gutierrez, F.R., Pavanelli, W.R., Milanezi, C.M., Cavassani, K.A., Moreira, A.P., Ferreira, B.R., Cunha, F.Q., Cardoso, C.R., Silva, J.S. The involvement of CD4⁺CD25⁺

T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v.10, p.825-833, 2008.

Martin, D., Tarleton, R. Generation, specificity and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological reviews**, v. 201, p. 304-317, 2004.

McDevitt, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annual Reviews Immunology**, v.18, p.1–17, 2000.

Mendes-da-Cruz, D.A., de Meis, J., Cotta-de-Almeida, V., Savino, W. *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral repertoire. **Microbes and Infection**, v.5, p.824-831, 2003.

Menezes, C.A., Rocha, M.O., Souza, P.E., Chaves, A.C. , Gollob, K.J., Dutra,W.O. Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clinical Experimental Immunology**, v.137, p.129-138, 2004.

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

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 6 edição, Brasília, 2005.

Minoprio, P.M., Eisen, H., Forni, L., D'Império Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. Quantitation of both T and B-cell responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.24, p.661-668, 1986.

Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.185, p.1150-1157, 2010.

Mohammadnia, M, Solgi, G, Ranjbar, M, Shahrestani, T, Edalat, R, Razavi, A, Nikbin B, Pourmand, G, Amirzargar, M, Sarafnejad, A, Amirzargar, A.A. Serum levels of interleukin (IL)-10, IL-17, transforming growth factor (TGF)- β 1, and interferon- γ cytokines and expression levels of IL-10 and TGF- β 1 genes in renal allograft recipients after donor bone marrow cell infusion. **Transplantation Proceedings**, v.43, p.495-499, 2011.

Mosca, W., Briceno, L. Cell mediated immune response in patients with Chagas. Correlation with the presence of Chagasic cardiomyopathy. **Biological Research**, v.26, p.225-231, 1993.

Muller U, Sobek, V., Balkow, S., Holscher, C., Mullbacher, A., Musetuanu, C., Mossman, H., Simon .M.M. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. **European Journal of Immunology**, v.33, p.70–78, 2003.

Nagib, P. R.A., Dutra, W.O., Chiari, E., Machado, C.R.S. *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. **Experimental Pathology**, v.116, p.366-374, 2007.

Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4 (+) CD8 (+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. **Blood**, v.104, p.478–486, 2004.

Nomizo, A., Cardillo, F., Postól, E., Carvalho, L.P., Mengel, J. V γ 1 γ d T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v.8, p.880-888, 2006.

O'Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A., Hawrylowicz, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, p.114-131, 2008.

Ohga, S., Nomura, A., Takahata, Y., Ihara, K., Takada, H., Wakiguchi, H., Kudo, Y., Hara, T. Dominant expression of interleukin 10 but not interferon γ in CD4⁺CD8⁻ $\alpha\beta$ T cells of autoimmune lymphoproliferative syndrome. **British Journal of Haematology**, v.119, p.535-538, 2002.

Padilla, A.M., Bustamante, J.M., Tarleton, R.L. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current Opinion in Immunology**, v.21, p.385-390, 2008.

Parel, Y., Aurrand-Lions, M., Scheja, A., Dayer, J.M., Roosnek, E. Presence of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatism**, v.56, p.3459–346, 2007.

Pennington, D. J., Vermijlen D, Wise, E. L. The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell mediated responses. **Advances in Immunology**, v.87, p.27–59, 2005.

Pestka, S, Krause, C.D, Walter, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v.202, p.8-32, 2004.

Pinheiro, R.O., Rossi-Bergmann, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.79-82, 2007.

Pinto, A.Y., Valente, S. A., Valente, V. C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **Brazilian Journal of Infectology**, v.8, p.454-460, 2004.

Pluddemann, A., Mukhopadhyay, S., Gordon, S. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunological Reviews**, v.240, p.11-24, 2011.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.192, 2001.

Priatel, J.J, Utting, O, The, HS. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. **Journal of Immunology**, v.167, p. 6188–6194, 2001.

Prince, H. E, Jensen, E. R. HIV-related alterations in CD8 cell subsets defined by *in vitro* survival characteristics. **Cell Immunology**, v.134, p.276-86, 1991.

Reis, D.D., Jones, E.M., Tostes, S., Gazzinelli, G., Colley, D.G., McCurley, T. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α^+ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, p.637-644, 1993.

Reis,M.M., Higuchi,M.d., Benvenuti,L.A., Aiello,V.D., Gutierrez,P.S., Bellotti,G., and Pileggi,F.. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL- 2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens.**Clinical Immunology and Immunopathology**, v.83, p.165-172, 1997.

Risueno, R. M., Schamel, W. W. & Alarcon, B. T cell receptor engagement triggers its CD3 ϵ and CD3 ζ subunits to adopt a compact, locked conformation. **Plos One**, v. 3, p.e1747, 2008.

Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Frontiers in Bioscience**, v.8, p.44-54, 2003.

Rocha, M.O., Teixeira, M.M., Ribeiro, A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, p.727-43, 2007.

Roffê, E., Rothfuchs, A. G. , Santiago, H. C. , Marino, A. P. , Ribeiro-Gomes, F. L, Eckhaus, M. , Antonelli, L. R, Murphy, P. M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal

myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v.188, p. 649-660, 2012.

Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D. H., Gubler, U. Sinigaglia, F.. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p.825–831, 1997.

Romanha, A.J., Alves, R.O., Murta, S.M.F., Silva, J.S., Ropert, C., Gazzinelli, R.T. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-g in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.823-828, 2002.

Romero, V., Andrade, F. Non-apoptotic functions of granzymes. **Tissue Antigens**, v. 71, p.409-416, 2008.

Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., Chen, Y. IL-6- deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. **Journal of Immunology**, v.161, p.6480–6486, 1998.

Samudio, M., Montenegro-James, S., Cabral, M., Martinez, J., Arias, A.R., James, M.A. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.119-121, 1998.

Sardinha, L.R., Elias, R.M., Mosca, T., Bastos, K.R.B., Marinho, C.R.F., Dímpério-Lima, M.R., Alvarez, J.M. 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**, v.74, p.2031-2042, 2006.

Sathler-Avelar, R., Lemos, E.M., Reis, D.D., Medrano-Mercado, N., Araújo-Jorge, T.C., Antas, P.R., Corrêa-Oliveira, R., Teixeira-Carvalho, A., Elói-Santos, S.M., Favato, D., Martins-Filho, O.A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.58, p.655-663, 2003.

Savino, W., Villa-Verde, D.M.S., Mendes-da-Cruz, D.A., Silva-Monteiro, E., Perez, A.R., Aoki, M.D.P., Bottasso, O., Guinazu, N., Silva-Barbosa, S.D., Gea, S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokines and Growth Factors Reviews**, v.18, p.107-124, 2007.

Shivakumar, S., Tsokos, G.C., Datta, S.K. T cell receptor alpha/beta expressing doublenegative (CD4⁻CD8⁻) and CD4⁺ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti- DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. **Journal of Immunology**, v. 143, p.103-112, 1989.

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

Silva, J.S., Twardzik, D. R., Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF- β). **Journal of Experimental Medicine**, v.174, p.539-545, 1991.

Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mohler, K.M., Anderson, D, Reed, S.G . Interleukin 10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v.175, p. 169-174, 1992.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ Tumour necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected γ -interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, p. 4862-4867, 1995.

Silvério, J.C.,Pereira, I.S., Cipitelli, M.C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Lannes-Vieira, J. CD8⁺ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *T. cruzi*- elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathogens**, v.8, e1002645, 2012.

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

Soghoian ,D. Z, Jessen, H, Flanders, M, Sierra-Davidson, K, Cutler, S, Pertel, T, Ranasinghe S, Lindqvist, M, Davis, I, Lane, K, Rychert, J, Rosenberg, E.S, Piechocka-Trocha, A, Brass A.L, Brenchley, J.M, Walker, B.D, Streeck H. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. **Science Translational Medicine**, v.29, 2012.

Sosa-Estani, S., Segura, E.L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.19, p.583-587, 2006.

Souza, P.E., Rocha, M.O., Rocha-Vieira, E., Menezes, C.A., Chaves, A.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunology**, v.72, p. 5283-5291, 2004.

Souza, P.E., Rocha, M.O., Menezes, C.A., Coelho, J.S., Chaves, A.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O. *Trypanoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v.75, p.1886-1894, 2007.

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. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells : implications for innate immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, p.937-948, 2000.

Steindel, M., Pacheco, K.L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M.H.,, Eger, I., Kossman, C., Sincero, T.C., Stoco, P.H., Murta, S.M., de Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C.Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans , vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.60, p.25-32, 2008.

Stelzer I, Zelzer S, Raggam RB, Prüller F, Truschnig-Wilders M, Meinitzer A, Schnedl WJ, Horejsi R, Möller R, Weghuber D, Reeves G, Postolache TT, Mangge H. Link between leptin and interleukin-6 levels in the initial phase of obesity related inflammation. **Translational Research**, v.159, p.118-24, 2012.

Takeuchi, O., Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v.140, p.805-820, 2010.

Trinchieri, G. Cytokines and cytokines receptors. **Immunological Reviews**, v.202, p.5-7, 2004.

Vallejo, A.N. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. **Immunology Reviews**, v. 205, p.158-169, 2005.

Van Deuren, M., van der Ven-Jongekrijg,J., Bartelink,A.K.M., van Dalen, R., Sauerwein,R.W., van der Meer, J.W.M. Correlation between proinflammatory cytokines and the severity of disease in meningococcal encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.433-439, 1995.

Vespa, G. N.; Cunha, F. Q.; Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection Immunity**, v.62, p. 5177-5182, 1994.

Viera, P.M.A., Francisco, A.M., Souza, S.M., Malaquias, L.C.C., Reis, A.B., Giunchetti, R.C., Veloso, V.M., Lana, M., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M. *Trypanosoma cruzi*: Serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxides in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v.121, p.76-82, 2009.

Villani, F.N.A. Imunorregulação na doença de Chagas humana: estudo das células TCD4-CD8- e mecanismos de controle de expressão de citocinas. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

Villani, F.N.A., Rocha, M.O., Nunes, M.C.P., Antonelli, L.R.V., Magalhães, L.M.D., Santos, J.S.C., Gollob, K.J., Dutra, W.O. *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct and CD4⁻ CD8⁻ T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. **Infection and Immunity**, v. 78, p.4421- 4430, 2010.

Vinhaes, M.C., Dias, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v.16, p. 7-12, 2000.

Visentainer, J.E.L., Sell, A.M., Franceschi, D.A., Lieber, S.R., de Souza, C.A. Importance of regulatory cytokine gene polymorphisms in hematopoietic stem cell transplantation. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, p.739-748, 2008.

Yoshida, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 101-107, 2009.

Yssel, H., Spits, H. Generation and maintenance of cloned human T cell lines. In **Current Protocols in Immunology**, John Wiley e Sons, New York, 2002.

Zajong, D.M., Kronenberg, M. CD1 mediated T cell recognition of glycolipids. **Current Opinion in Structural Biology**, v.17, p.521-529, 2007.

Zhang, X., Angkasekwinai, P., Dong, C., Tanh, H. Structure and function of interleukin-17 family cytokines. **Protein Cell**, v. 2, p. 26-40, 2011.

Wang R, Wang-Zhu Y, Grey H. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, p.2181–2186, 2002.

Wilke CM, Wang L, Wei S, Kryczek I, Huang E, Kao J, Lin Y, Fang J, Zou W. Endogenous interleukin-10 constrains Th17 cells in patients with inflammatory bowel disease. **Journal of Translational Medicine**, v.16, p.9-17, 2011.

World Health Organization. Sixty-Second World Health Assembly A62/17, 2002.

World Health Organization. Tropical Disease Research. Programme for research and training tropical disease (TDR). http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/. Fact sheet N°340, 2010.