

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Karine Silvestre Ferreira

***AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS  
POLIMÓRFICOS EM GENES CODIFICADORES PARA  
FOXP3 E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS DIFERENTES  
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS***

Belo Horizonte

2012

*Karine Silvestre Ferreira*

***AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS POLIMÓRFICOS  
EM GENES CODIFICADORES PARA FOXP3 E SUA ASSOCIAÇÃO  
COM AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE  
CHAGAS***

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

***Orientadora:*** Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau

***Co-orientador:*** Dr. Rodrigo Correa Oliveira

*Belo Horizonte*

2012

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

## **COLABORADORES**

### **Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais**

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

Giovane Rodrigo Sousa

### **Departamento de Morfologia – Universidade Federal de Minas Gerais**

Dra. Walderez Ornelas Dutra

Dra. Jeane Correa

Marcos Paulo Damásio

Natália Satchiko Hojo de Souza

Vanessa Alves Azevedo Valente

### **Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas Gerais**

Dra. Ana Thereza Chaves

Ms. Rafaelle Christine Gomes Fares Gusmão

Nayara Ingrid de Medeiros

### **FDA/NIH**

Dra. Fernanda Fortes Araújo

### **Departamento de Bioquímica-Universidade Federal do Rio Grande do Norte**

Dra. Tatjana Keesen de Souza

Karine Silvestre Ferreira

***AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS POLIMÓRFICOS EM GENES  
CODIFICADORES PARA FOXP3 E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS DIFERENTES  
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS***

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

---

*Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau (orientadora)*

---

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

---

*Membro da Banca*

---

*Membro da Banca*

*Belo Horizonte, julho de 2012.*

## *AGRADECIMENTOS*

A *Deus*, pela vida, pelas infinitas bênçãos, especialmente de ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

À minha mãe Marília e meu pai Joel pelo grande amor, pela companhia constante em todos os momentos da minha vida, pelas palavras de incentivo, pelas palavras que me permitiram melhorar, por sempre me indicar o caminho e me levar a refletir.

A toda minha família e ao meu namorado Márcio, pelo carinho e amor em todos os momentos.

A minha orientadora professora Juliana Assis Silva Gomes Estanislau, por tornar possível eu estar aqui hoje, pelo exemplo de dedicação e incentivo tão necessários durante essa jornada. Obrigada por contribuir com minha formação profissional e pessoal. Aprendi muito com você, minha gratidão sempre!

Ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Correa Oliveira pelo apoio e incentivo em diversos momentos.

Ao Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha pela disponibilidade em ensinar, pelo carinho pelos bons momentos vivenciados no CTR-DIP-Orestes Diniz e pelas reuniões em sua casa. Muito obrigada por tudo professor, serei sempre grata.

A Dr. Tatjana Kessen, pela amizade, compreensão e ajuda durante este percurso.

Ao meu amigo Marcos pela parceria e cumplicidade constante durante todo o mestrado.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia das Interações Celulares, pela boa convivência e amizade. Agradeço a todos nunca me esquecerei de vocês!

A Dra. Jeane Correia e a Natalia Satchiko pela amizade, paciência em ensinar e pelo auxílio durante a realização do projeto.

Ao colaborador Giovane, pela amizade e ajuda durante a coleta de sangue dos pacientes estudados.

A todos os amigos do Centro de Pesquisas Rene Rachou, em especial a Clari, Lú, Rafa e a iniciação científica Nayara, pela constante ajuda e amizade. Também serei sempre grata a todos vocês.

A aluna de iniciação científica Amanda pela chance de ensinar e aprender.

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

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

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”*

*(Francisco Cândido Xavier)*

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> <i>Indivíduos estudados e distribuição por sexo.....</i>	40
<b>TABELA 2.</b> <i>Iniciadores utilizados para a identificação de polimorfismos no gene FOXP3.....</i>	44
<b>TABELA 3.</b> <i>Condições da PCR utilizada para a identificação de polimorfismos no gene FOXP3.....</i>	46
<b>TABELA 4.</b> <i>Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....</i>	51
<b>TABELA 5.</b> <i>Indivíduos estudados para o polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547).....</i>	53
<b>TABELA 6.</b> <i>Dados relacionados ao perfil genotípico e alélico referente ao polimorfismo C/T na posição -3279 do gene FOXP3 no gênero feminino.....</i>	54
<b>TABELA 7.</b> <i>Dados relacionados à presença ou ausência do alelo polimórfico referente ao polimorfismo C/T na posição -3279 do gene FOXP3 no gênero masculino.....</i>	55
<b>TABELA 8.</b> <i>Indivíduos estudados para o polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548).....</i>	56
<b>TABELA 9.</b> <i>Dados relacionados ao perfil genotípico e alélico referente ao polimorfismo G/T na posição -3499 do gene FOXP3 no gênero feminino.....</i>	57
<b>TABELA 10.</b> <i>Dados relacionados à presença ou ausência do alelo polimórfico referente ao polimorfismo G/T na posição -3499 do gene FOXP3 no gênero masculino.....</i>	58
<b>TABELA 11.</b> <i>Valores atribuídos as variáveis de acordo com a gravidade da doença, fatores preditores de prognóstico, expressão de FOXP3 e relação do genótipo com o fenótipo.....</i>	72
<b>TABELA 12.</b> <i>Análise de regressão logística em pacientes não infectados (NI) e portadores da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero feminino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo e expressão de FOXP3 como independentes.....</i>	74
<b>TABELA 13.</b> <i>Análise de regressão logística em pacientes não infectados (NI) e portadores da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero masculino</i>	

*utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo e expressão de FOXP3 como independentes.....* 74

**TABELA 14.** *Análise de regressão logística em pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero feminino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo, expressão de FOXP3 e parâmetros clínicos como independentes.....* 74

**TABELA 15.** *Análise de regressão logística em pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero masculino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo, expressão de FOXP3 e parâmetros clínicos como independentes.....* 75

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura representativa do gene repressor de transcrição FOXP3.	28
<b>FIGURA 2.</b> Interação de FOXP3 com o NFAT e com o fator NF-KB.....	29
<b>FIGURA 3.</b> Regulação do NFAT mediada pela transcrição de genes em células T reguladoras.....	29
<b>FIGURA 4.</b> Esquema da estratégia de trabalho.....	42
<b>FIGURA 5.</b> Discriminação alélica através do sistema de sondas TaqMan, polimorfismo -3279 C/T.....	45
<b>FIGURA 6.</b> Análise do percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo através de gráficos de distribuição de pontos coloridos artificialmente pelo software Flow Jo.....	48
<b>FIGURA 7.</b> Estrutura representativa do desequilíbrio de ligação nos SNPS rs 3761547 e rs3761548 presentes no gene FOXP3.....	52
<b>FIGURA 8.</b> Expressão de FOXP3 em células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI) e pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas.....	60
<b>FIGURA 9.</b> Correlação entre a frequência de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico.....	62
<b>FIGURA 10.</b> Correlação entre a frequência de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico em pacientes do gênero feminino.....	63
<b>FIGURA 11.</b> Correlação entre a frequência de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico em pacientes do gênero masculino.....	64
<b>FIGURA 12.</b> Análise entre a expressão de FOXP3 em células TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> e as frequências genotípicas de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino.....	67
<b>FIGURA 13.</b> Análise entre a expressão de FOXP3 em células TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> e a presença ou ausência do alelo polimórfico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino.....	70

**FIGURA 14.** *Análise entre a expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e a presença ou ausência do alelo polimórfico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero masculino.....* 71

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

**APC**- Alofocianina

**B7**-molécula co-estimulatória

**C**- Citosina

**CARD**- pacientes portadores da forma clínica cardíaca da doença de Chagas

**CD25**- Cadeia  $\alpha$  do receptor da IL2

**CD28**- Marcador de superfície celular para molécula co-estimulatória

**CD3**- Marcador de superfície celular de células T

**CD40L**- Ligante de CD40

**CD45RO**- Marcador de superfície de linfócitos de memória

**CD4**- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

**CD62L**- Molécula L-selectina considerada molécula de ativação e adesão de leucócitos

**CD8**- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

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

**CpQRR**- Centro de Pesquisas Rene Rachou

**CTLA-4**- Molécula de superfície inibidora da ativação celular presente em linfócitos T

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

**D'**- Coeficiente de correlação entre pares de loci

**DIG**- pacientes portadores da forma clínica digestiva da doença de Chagas

**DNA**- Ácido desoxirribonucleico

**ECG**- Ecocardiograma

**EDTA**- Etilenodiaminotetracético

**FEVE**- Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

**FL**- Fluorescência

**FOXP1**- Forkhead box P1

**FOXP2**- Forkhead box P2

**FOXP3**- Repressor de transcrição forkhead box P3

**FOXP4**- Forkhead box P4

**FSC**- Tamanho

**G**-Guanina

**GITR**- Receptor induzido por glicorticóide

**IL10**- Interleucina 10

**IL12-β**- Interleucina 12 beta

**IL17**- Interleucina 17

**IL1-β**- Interleucina 1 beta

**IL2**- Interleucina 2

**IL4**- Interleucina 4

**IL**-Interleucina

**IND**- pacientes portadores da forma clínica indeterminada da doença de Chagas

**INF-γ**-Interferon gamma

**LOD**- Log of the likelihood odds ratio

**LVDD**- Diâmetro ventricular diastólico esquerdo

**MFF**- Solução fixadora

**mL**-Mililitro

**NFAT**- fator nuclear de células T ativadas

**NFKB**- fator nuclear Kb

**NYHA**- Classificação funcional da New York Heart Association

**PBS**- Tampão fosfato salínico

**PBS-P**- PBS W a 0,5% de saponina

**PBS-W**- PBS a 0,5% de albumina sérica

**PE**- Ficoeritrina

**PERCP**- Cloreto de Peridina Clorofila

**RNA**- Ácido ribonucleico

**SNP**- Polimorfismo de nucleotídeo único

**SSC**- Granulosidade

**T**- Ausência do alelo polimórfico T

**T+**- Presença do alelo polimórfico T

**TCR**- Receptor de linfócitos T

**TE**-Tampão de extração

**TGF-β**- Fator de crescimento tumoral beta

**Th2**- Células TCD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas

**Th3**- Célula T helper 3

**TNF- $\alpha$** -Fator de necrose tumoral alfa

**Tr1**- Célula T reguladora 1

**TREG**- Células Treguladoras

**T**-Timina

**$\mu$ L**-Microlitro

**UFMG**- Universidade Federal de Minas Gerais.

## **RESUMO**

A identificação da subpopulação de células T CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3+ e do seu papel como células T reguladoras (TREG) têm sido objeto de diversos estudos, devido ao papel crítico dessas células na manutenção da auto-tolerância, bem como na defesa contra infecções. Os mecanismos de supressão mediados por células T reguladoras CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3+ são ainda pouco compreendidos. De fato, estudos *in vitro* sobre a caracterização das células TREG em animais e humanos favorecem a hipótese de que o mecanismo de ação destas células pode depender do contato célula-célula e/ou de citocinas. A expressão de FOXP3 tem sido descrita como um importante fator para o desenvolvimento e atividade funcional dessas células. Embora a função dessa população celular ainda não esteja clara na doença de Chagas, estudos anteriores já demonstraram que a frequência de células TCD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3+ é maior em pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND). Assim, o objetivo principal deste estudo é investigar a associação entre polimorfismos do gene FOXP3 e o desenvolvimento de formas clínicas graves da doença de Chagas. Neste trabalho, o DNA extraído a partir do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca (CARD) da doença de Chagas foi utilizado para analisar a presença de polimorfismos funcionais do gene FOXP3. Ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos, utilizando iniciadores dirigidos para o SNPS -3279 C/T e -3499 G/T, localizados no intron-1 do gene FOXP3. Em indivíduos do sexo feminino as frequências genotípicas e alélicas foram associadas com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. O estudo do polimorfismo -3499 G / T mostrou que o genótipo heterozigoto (GT) está associado com a forma clínica IND (p= 0,04). Outras análises mostraram a associação da ocorrência do alelo polimórfico (T + -3499 G / T) com a forma clínica indeterminada (p = 0,016, OR =0,295), sugerindo um papel protetor para o polimorfismo avaliado. Este perfil é associado com a elevada expressão do FOXP3 em células TREG. Os nossos resultados sugerem que polimorfismos funcionais no gene FOXP3 em células TREG podem ter um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, provavelmente através do controle da resposta imune e conseqüentemente controlando a morbidade.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, polimorfismo e gene FOXP3.

## ***ABSTRACT***

The identification of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> subset and of its role as regulatory T cells (TREG) has been the object of intense studies due to the putative critical role of these cells in maintaining self-tolerance, as well as in defense against infections. The suppressive mechanisms mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>T regulatory cells are not yet understood. In fact, *in vitro* studies on the characterization of TREG cells in mice and humans favor the hypothesis that the mechanisms of action these cells depends on cell-cell contact and/or on cytokines. FOXP3 expression by these cells has been described as an important factor for their development and functional activities. Although there are no evidences for a clear function of this cell population in Chagas disease, we have previously demonstrated that the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells is augmented in patients with the indeterminate clinical form (IND). Thus, the objective of this study is to investigate the association between FOXP3 gene polymorphisms and the development of severe clinical forms of Chagas disease. In this study, DNA extracted from peripheral blood of patients with the IND and cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease were used to analyze the presence of functional polymorphisms of the FOXP3 gene. Real-time PCR using primers directed to the SNPS -3279 C/T and -3499 G/T, located in the intron-1 of the FOXP3 gene were conducted. In female individuals genotypic and allelic frequencies were associated with different clinical forms of Chagas disease. The study of -3499 G/T polymorphisms showed that heterozygosity of this genotype (GT) was associated with IND patients (p=0,04). Other analyses showed an association between the occurrence of polymorphic allele (T+ -3499 G/T) and the IND clinical form (p=0,016 , OR=0,295), suggesting a protective role for the evaluated polymorphism. This profile is associated with high expression of FOXP3 in TREG. Our results suggest that functional polymorphisms in the FOXP3 gene in TREG cells may have an important role in *T. cruzi* infection, probably by controlling the exacerbated immune response and consequently controlling morbidity.

**Keywords:** Chagas Disease, polymorphisms and FOXP3 gene.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
<b>1.0-INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<i>1.1-Considerações sobre a doença de Chagas.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2 - A resposta imune e as células T reguladoras.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3 - O gene repressor de transcrição FOXP3, mutações e polimorfismos genéticos.....</i>	<i>27</i>
<i>1.4-FOXP3 e sua localização no cromossomo X.....</i>	<i>31</i>
<i>1.5- Polimorfismos genéticos na doença de Chagas.....</i>	<i>32</i>
<b>2.0-JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.0-OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<i>3.1-Objetivo Geral.....</i>	<i>37</i>
<i>3.2-Objetivos específicos.....</i>	<i>37</i>
<b>4.0-MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<i>4.1-Characterização da população de estudo.....</i>	<i>39</i>
<i>4.2 Amostras de sangue.....</i>	<i>41</i>
<i>4.3- Extração de DNA em sangue total.....</i>	<i>42</i>
<i>4.4-Identificação dos SNPS em genes codificadores para o FOXP3.....</i>	<i>43</i>
<i>4.5- Expressão de FOXP3 em linfócitos TCD4+CD25<sup>high</sup>.....</i>	<i>46</i>
<i>4.6-Aquisição dos dados no citômetro de fluxo.....</i>	<i>47</i>

4.7-Análise estatística.....	49
<b>5.0-RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1-Estudos de polimorfismo do gene <i>FOXP3</i> .....	51
5.1.1-Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	51
5.1.2- Desequilíbrio de ligação.....	52
5.1.3-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) no gene <i>FOXP3</i> .....	53
5.1.3.1-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) do gene <i>FOXP3</i> no gênero feminino.....	53
5.1.3.2-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) do gene <i>FOXP3</i> no gênero masculino.....	54
5.1.4-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) no gene <i>FOXP3</i> .....	55
5.1.4.1-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) do gene <i>FOXP3</i> no gênero feminino.....	56
5.1.4.2-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) do gene <i>FOXP3</i> no gênero masculino.....	58
5.2-Estudos fenotípicos.....	59
5.2.1- Análise da expressão de <i>FOXP3</i> em células $TCD4^+CD25^{high}$ do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes portadores da doença de Chagas.....	59
5.3-Correlação entre a frequência de células <i>T</i> reguladoras $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ com os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico.....	61
5.4-Análise entre a frequência fenotípica de <i>FOXP3</i> em células $TCD4^+CD25^{high}$ e a distribuição dos genótipos e alelos do gene <i>FOXP3</i> .....	65
5.4.1-Análise da expressão de <i>FOXP3</i> em células $TCD4^+CD25^{high}$ do sangue periférico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino de acordo com as frequências genotípicas referentes aos polimorfismos -3499 G/T e -3279 C/T.....	65
5.4.2- Análise da expressão de <i>FOXP3</i> em células $TCD4^+CD25^{high}$ do sangue	

<i>periférico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas e a presença ou ausência do alelo polimórfico T referente aos polimorfismos -3499 G/T e -3279 C/T.....</i>	68
<i>5.5-Análise multivariada por regressão logística.....</i>	72
<b>6.0-DISSCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>7.0- CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>8.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>9.0- ANEXO I: PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>103</b>

## ***1.0-INTRODUÇÃO***

---

### ***1.1-Considerações sobre a doença de Chagas***

A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Chagas, que reportou seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insetos da ordem Hemiptera (ROMANA, 1956). Após um século de sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um sério problema de saúde e econômico em muitos países da América Latina. Além disso, devido ao crescimento da migração populacional, um maior número de casos de doença de Chagas, importados da América Latina, tem sido detectado em áreas não endêmicas, tais como América do Norte e muitas partes da Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS, 2007; STEINDEL, *et al.*, 2008; SCHMUNIS & YADON, 2010; TANOWITZ, *et al.*, 2009). Atualmente, a doença afeta cerca de 14 milhões de pessoas e 60 milhões de indivíduos está em risco de infecção na América Latina (DE ALMEIDA, *et al.*, 2011). Cerca de 21.000 pacientes morrem anualmente de causas relacionadas à doença de Chagas (ROCHA, *et al.*, 2009).

A doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias, sendo as faixas etárias mais atingidas acima de 45 anos (DIAS, 2007). Apesar dos grandes avanços obtidos no controle da transmissão natural, cerca de 50.000 novos casos ocorrem a cada ano (DIAS *et al.*, 2008).

A principal forma de transmissão da doença ao homem é a transmissão vetorial, considerada, ainda hoje, responsável por mais de 70% dos casos em países em que não existe controle vetorial sistemático (COURA & DIAS, 2009). É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos à Argentina. São mais de cem espécies de vetores responsáveis pela transmissão natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, intervindo diretamente na sua veiculação ao ambiente domiciliar (VINHAES & DIAS, 2000). A transmissão vetorial se dá pelo contato do hospedeiro vertebrado com as fezes e/ou urina do hospedeiro invertebrado, contaminadas com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (BARRETO, 1979). A infecção dos insetos ocorre durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, quando os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos e, uma vez no intestino do inseto, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em formas epimastigotas e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são expelidos com as fezes e/ou urina do inseto vetor no

local da picada, durante o repasto sanguíneo, e penetram no hospedeiro através da pele lesada ou da mucosa. As formas tripomastigotas são altamente infectantes e podem invadir diversos tipos celulares, que incluem macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais. Após ocorrer uma adesão firme entre as formas tripomastigotas e a célula hospedeira, os parasitos entram para o citoplasma, onde se transformam em formas amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias, evoluindo, posteriormente, para as formas tripomastigotas. Ocorre, então, a lise celular e a liberação de novas formas infectantes. Estas formas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção, atingir também a corrente circulatória e os diversos tecidos do hospedeiro (STEINDEL, *et al.*, 2008).

Outras formas de transmissão também já foram descritas, como transfusional, congênita, por transplante de órgãos ou acidentes laboratoriais (DIAS, 2000). Recentemente, ocorreram surtos da doença de Chagas após a ingestão de bebidas, como suco de cana e açaí, contaminados com as formas tripomastigotas. Essa contaminação ocorreu, provavelmente, no momento do preparo dos sucos quando os insetos vetores silvestres infectados foram triturados e/ou suas fezes contaminaram o alimento. Este evento pode indicar a presença de insetos que albergam o parasito em áreas onde se acreditava já estar controlada a transmissão vetorial. Devido a essas formas de transmissão já detectadas, seja a forma oral ou transfusional, fica claro que deve existir um controle melhor dessa doença, seja em países onde ela é endêmica, como também nos países onde não existe endemia (STEINDEL, *et al.*, 2008).

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em fases aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada inicialmente por um período pré-patente assintomático de 7 a 9 dias, após o qual, pode ocorrer um processo inflamatório inespecífico, devido a entrada do parasito. Nesta fase, que dura cerca de um a dois meses, há uma elevada parasitemia, provavelmente devido à intensa multiplicação do parasito, facilmente detectável por exames de sangue a fresco. Nesta fase, ocorre infecção ativa por parte do parasito gerando inflamação, o que pode levar a diferentes manifestações clínicas como febre, mal estar, linfadenopatia e hepatosplenomegalia (ROCHA, *et al.*, 2003). A fase aguda da doença entra em remissão, onde ocorre à queda da parasitemia e da intensidade do processo inflamatório, devido à resposta imune do hospedeiro (TEIXEIRA, *et al.*, 2006).

A doença, então, evolui para a fase crônica caracterizada por escasso parasitismo tecidual e baixa parasitemia (ROCHA, *et al.*, 2009). Nessa fase, os pacientes infectados podem manifestar quatro formas clínicas distintas: a indeterminada, a cardíaca, a digestiva e a cárdio-digestiva (WHO, 2000).

A forma clínica indeterminada (IND) é observada na maioria dos pacientes (50-60%) que podem permanecer assintomáticos por períodos longos e variáveis. Esses pacientes apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi* e exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos (silhueta cardíaca, esôfago e cólon) normais (DIAS, *et al.*, 1989). No entanto, exames adicionais e mais sofisticados podem demonstrar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto evolução da morbidade associada à doença como apenas resquícios de processo agudo ou crônico inicial já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica (DIAS, 2000; ROCHA, *et al.*, 2003). Alguns eventos, como a miocardite focal, ocorre mesmo na forma indeterminada e torna-se mais intensa à medida que a doença progride para os estágios clínicos mais graves (ROCHA, *et al.*, 2009). Os focos inflamatórios que aparecem no coração durante a forma IND da doença de Chagas apresentam um ciclo evolutivo, com atração de células inflamatórias que aparecem como que inibidas no seu potencial agressivo, mas se acumulam no tecido intersticial acompanhadas por certo grau de fibrose (ANDRADE, 2005). Após algum tempo, as células inflamatórias são removidas por apoptose, enquanto o ligeiro excesso de matriz sofre degradação e reabsorção. Com base nestes dados ultra-estruturais, as lesões da miocardite focal da forma clínica IND foram interpretadas como sujeitas a um ciclo evolutivo, autolimitado, equilibrado pelo aparecimento de algumas lesões e desaparecimento de outras, o que permite a longa sobrevivência e ausência de sintomas do hospedeiro (ANDRADE, 2005).

Acredita-se que cerca de 20 a 30% dos pacientes portadores da doença de Chagas podem desenvolver a forma clínica cardíaca (CARD), sendo que a mesma pode provocar insuficiência cardíaca, arritmias, tromboembolismo, derrame e em alguns casos, morte súbita (ROCHA, *et al.*, 2009). A forma clínica CARD pode ser caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios multifocal de células mononucleares no miocárdio e no sistema de condução do coração e pela fibrose tecidual (FERREIRA, *et al.*, 2003). A perda de cardiomiócitos por apoptose e sua substituição por tecido fibrótico parecem induzir ruptura das fibras musculares e

fascículos do músculo estriado cardíaco (TOSTES, *et al.*, 2005). Estas mudanças podem levar ao mau funcionamento do sincício eletrofisiológico, causando insuficiência cardíaca e arritmias ventriculares. Danos ao sistema nervoso autônomo, especialmente o ramo parassimpático, podem também contribuir para um pior prognóstico entre esses pacientes. Estudos anteriores demonstraram um pior prognóstico para pacientes com miocardiopatia chagásica que para aqueles com outras causas de insuficiência cardíaca (ROCHA, *et al.*, 2009).

A infecção chagásica pode levar ainda a dilatações do cólon e/ou esôfago (megacólon e/ou megaesôfago), principais manifestações da forma clínica digestiva (DIG). A denominação de forma clínica DIG foi inicialmente proposta por DE REZENDE (1969) para os casos de pacientes que apresentavam a doença de Chagas, sem a presença de alterações cardíacas, mas com megaesôfago e megacólon bem caracterizados. No Brasil, a prevalência da forma digestiva tem sido estimada com base no diagnóstico da esofagopatia em inquéritos radiológicos feitos em populações chagásicas das áreas endêmicas. A esofagopatia chagásica foi considerada um bom indicador da forma digestiva, tendo em vista que muitas das alterações encontradas em outros setores do sistema digestivo ocorrem em associação com o megaesôfago. Estudos quantitativos de neurônios do plexo miontérico sugerem que a denervação do trato digestivo, mais evidente no esôfago e no cólon, levaria a perda da coordenação motora, acalásia esfínteriana, hipertrofia muscular e dilatação, com consequente perda do peristaltismo esofágico e falta de relaxamento do esfíncter inferior às deglutições. Este fato acarreta dificuldade de ingestão dos alimentos, que ficam em grande parte retidos no esôfago, resultando na formação do megaesôfago e/ou do megacólon (ANDREOLLO & MALAFAIA., 2009).

A análise de particularidades na patologia das diferentes formas clínicas da doença de Chagas sugere que fatores múltiplos possam estar envolvidos no seu estabelecimento. Acredita-se que estas manifestações podem ser consequência de fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo e tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, genética, aspectos nutricionais e perfil da resposta imune) (DIAS, 2000).

## ***1.2 - A resposta imune e as células T reguladoras***

O sistema imune é fundamental para o controle da parasitemia, mas, por outro lado, pode estar envolvido na progressão da cardiopatia chagásica, provavelmente devido à perda da regulação contra uma resposta induzida pelo parasito (DOS REIS, 2011). Durante a fase crônica da doença de Chagas, os pacientes que desenvolvem a forma clínica cardíaca da doença, observa-se alta frequência de células TCD4<sup>+</sup> e de TCD8<sup>+</sup> efetoras, secretoras de altos níveis das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e uma diminuição de células com perfil regulador e baixa produção de IL10 (CUNHA-NETO, *et al.*, 2009, GOMES, *et al.*, 2003, 2005, DE ARAUJO, *et al.*, 2007). Por outro lado, os pacientes portadores da forma clínica indeterminada, além de apresentarem células ativadas produzindo citocinas inflamatórias, possuem também uma elevação no número de células com atividade reguladora e uma alta produção de citocinas tais como TGF- $\beta$  e IL10 (CUNHA-NETO *et al.*, 2009, GOMES, *et al.*, 2003, 2005, DE ARAUJO, *et al.*, 2007).

Os mecanismos utilizados na regulação da resposta imune em diferentes infecções ainda não estão elucidados, porém recentemente tem se observado a participação de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> no controle da resposta imune induzida por doenças infecciosas e parasitárias. A presença de células T co-expressando CD4 e altos níveis da molécula CD25(CD25<sup>high</sup>) foi descrita como sendo células caracterizadas como anérgicas em respostas a estímulos policlonais, com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular (BAECHER-ALLAN, *et al.*, 2001). Essas células denominadas T reguladoras (TREG) apresentam função protetora em várias situações infecciosas e patológicas. Existem duas populações de células T reguladoras: as induzidas (ou adaptativas) e as naturais (ou constitutivas) (MILLS, 2004). A população de células T reguladoras naturais expressa o marcador de superfície CD25 e o repressor de transcrição FOXP3. Essas células são naturalmente geradas no timo e constituem de 5 a 10% das células T CD4<sup>+</sup> periféricas em animais e humanos. (BAECHER-ALLAN, *et al.*, 2001). O papel destas células mostra importância crucial na regulação de desordens auto-imunes, uma vez que está associada à manutenção da tolerância periférica. (BAECHER-ALLAN, *et al.*, 2002). As células TREG induzidas se originam na periferia através de uma variedade de estímulos e inclui diferentes subtipos de células T: células T reguladoras 1 (Tr1),

que secretam altos níveis de IL-10, nenhuma secreção de IL-4 e nenhum ou baixos níveis de IFN- $\gamma$  e as células T helper 3 (Th3), que secretam altos níveis de TGF- $\beta$  (MILLS, 2004). Acredita-se que as células Th3 e Tr1 seja a mesma célula secretando diferentes citocinas dependendo do estado de ativação, sítio de ativação e localização tecidual (BATTAGLIA, *et al.*, 2002).

Relacionado à doença de Chagas a participação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> tem demonstrado que pacientes portadores da forma clínica IND apresentam percentuais elevados dessas células quando comparado aos pacientes portadores da forma clínica CARD e indivíduos não infectados (DE ARAUJO, *et al.*, 2007; 2011; VITTELLI-AVELAR, *et al.*, 2005), sugerindo que essas células poderiam controlar as funções efetoras dos linfócitos T induzida pelo *T. cruzi*. A expansão de células T reguladoras pode ser benéfica durante a fase crônica da doença provavelmente por limitar o dano aos tecidos do hospedeiro, conduzindo a persistência da forma clínica indeterminada ao longo da vida.

A participação de moléculas co-estimuladoras inibidoras, como o CTLA-4, pode ser um importante mecanismo de supressão utilizado pelas células T reguladoras. A expressão da molécula CTLA-4 leva a inibição da ativação de células T por indução de um sinal negativo que coincide com a estimulação do TCR ou por co-estimulação inibitória competitiva devido à alta afinidade em ligar-se B7-1 e B7-2 quando comparado com CD28. Isto sugere que a força de sinalização do TCR, bem como, o grau de co-estimulação pode ter papel diferenciado na manutenção da função efetora das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (BAECHER-ALLAN, *et al.*, 2001). Além da molécula CTLA-4, outras moléculas também foram descritas por estarem associadas com a função das células TREG ao induzir apoptose de células alvo, tais como CD95L, granzima e perforina (STRAUSS, *et al.*, 2009; CZYSTOWSKA, *et al.*, 2010). Outro mecanismo descrito é a participação das citocinas IL-10 ou TGF- $\beta$ , bem conhecidos por suas atividades supressoras, podendo ser produzidas por células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ou indiretamente por células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> em situações de tolerância à infecções (LIU, *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que células T reguladoras também são capazes de secretar IL-17 (BERIOU, *et al.*, 2009; VOO, *et al.*, 2009). Esta citocina foi identificada primeiramente em células T de memória e atua através da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores estimuladores de colônia,  $\beta$ -defensinas e metaloproteínases (STRZEPA &

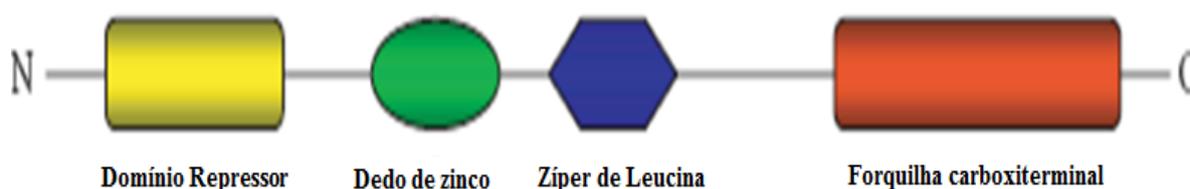
SZCZEPANIK, 2011). Além disso, IL-17 regula os mecanismos de defesa do hospedeiro contra organismos infecciosos promovendo a granulopoiese e a migração de neutrófilos (VOO, *et al.*, 2009). Estudos realizados envolvendo a infecção experimental pelo *T. cruzi* mostraram que a produção de IL-17 na fase aguda da infecção é responsável por controlar a inflamação cardíaca e direcionar a resposta para o perfil do Tipo Th2 (GUTIERREZ, *et al.*, 2009; GUEDES, *et al.*, 2010). Nosso grupo observou que as células TREG de pacientes com a forma clínica IND produzem níveis elevados de IL-10 e IL-17 sugerindo um possível mecanismo de supressão envolvido por essas células (DE ARAUJO *et al.*, 2012). É provável que as células TREG empreguem mecanismos distintos para regular a resposta imune em indivíduos portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca. Portanto, o mecanismo pelo qual essas células participam da complexa interação entre parasito-hospedeiro ainda precisa ser completamente elucidado (SHATLER-AVELAR, *et al.*, 2009).

### ***1.3 - O gene repressor de transcrição FOXP3, mutações e polimorfismos genéticos***

Para o estudo das células TREG, várias moléculas são utilizadas para sua caracterização. Dentre essas moléculas destacam-se CTLA-4, CD103, CD62L, CD45RO (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001). Além disso, o receptor induzido por glicocorticóide (GITR) (SHIMIZU *et al.*, 2002) e FOXP3 (FONTENOT *et al.*, 2003) são marcadores adicionais importantes na caracterização destas células. Estudos recentes mostram que em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> há alta expressão do gene FOXP3 contrastando com células T virgens e em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> recém ativadas onde há baixa expressão deste gene, sugerindo que a expressão de FOXP3 é fator determinante no desenvolvimento das células T reguladoras (FONTENOT *et al.*, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003; HORI & SAKAGUCHI, 2004). Esta função foi mostrada claramente em animais “knock-out” para FOXP3 onde ocorre a perda da regulação e desenvolvimento de doença autoimune. O FOXP3 é um gene importante para a diferenciação e maturação dessas células. Através da interação com fatores de transcrição, o FOXP3 suprime uma variedade de genes relacionados a doenças inflamatórias e promove a expressão de genes associados às funções das células TREG (XIAO, *et al.*, 2010). O repressor de transcrição FOXP3 está localizado no cromossomo X e possui três domínios funcionais distintos: domínio “dedo de zinco”

(aminoácidos 200-223); domínio “Zíper de leucina” (aminoácidos 240-261) e domínio “forquilha carboxi- terminal” (aminoácidos 338-421) (FIGURA 1) (XIAO, *et al.*, 2010).

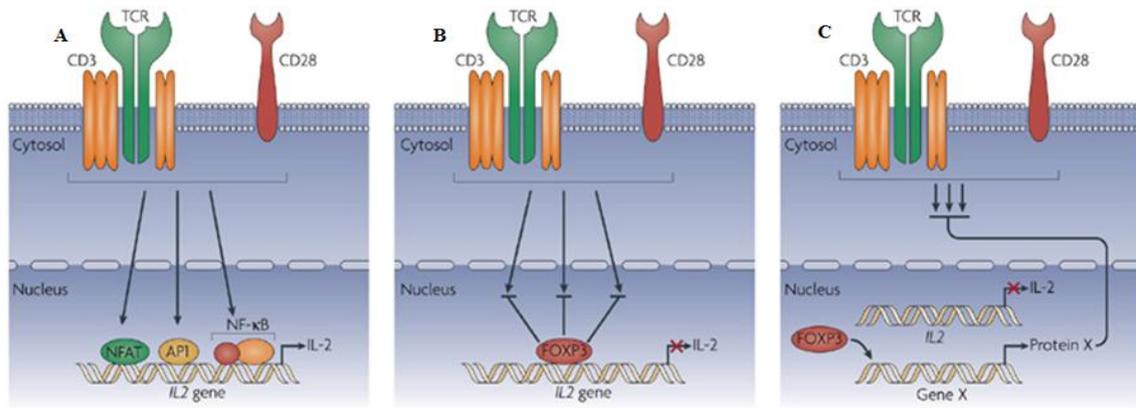
FOXP3 é um membro da subfamília de quatro fatores de transcrição (FOXP1, FOXP2, FOXP3 e FOXP4). Todas as quatro proteínas contêm uma estrutura parecida, no entanto FOXP3 difere dos outros membros da família por possuir um domínio terminal rico em prolina, enquanto os outros membros possuem glutamina em seus domínios terminais. Esta diferença parece contribuir para o papel de FOXP3 na regulação e desenvolvimento das células TREG, uma vez que esta região estrutural é necessária para o recrutamento de outros co-reguladores (XIAO, *et al.*, 2010)



**FIGURA 1: Estrutura representativa do gene repressor de transcrição FOXP3.**

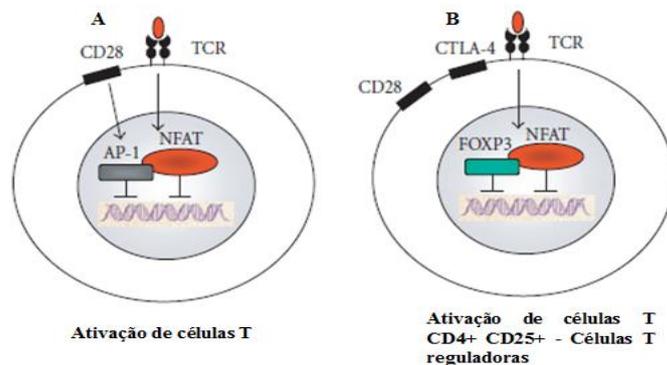
*Em amarelo está demonstrado o domínio repressor; em verde está demonstrado o domínio “dedo de zinco” (aminoácidos 200-223); em azul o domínio “zíper de leucina” (aminoácidos 240-261) e em vermelho o domínio “forquilha carboxiterminal” (aminoácidos 338-421). Modificado de VLIET, *et al.*, 2007.*

Segundo CHEN (2010), a citocina TGF- $\beta$  pode induzir a expressão de FOXP3 em células T virgens, mas os mecanismos pelos quais essa indução e regulação acontecem ainda não foram estabelecidos. Uma importante função de FOXP3 é regular a produção de uma variedade de citocinas através da interação com uma gama de proteínas e fatores de transcrição. Dentre estes, a interação de FOXP3 com o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e com o fator nuclear kB (NF-kB) estão bem documentadas (LOIZOU, *et al.*, 2011). A associação de FOXP3 ao NFAT reprime a ativação dos promotores para as citocinas IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  (FIGURAS 2 e 3). Além disso, a interação entre estes dois fatores pode induzir alguns marcadores típicos das células T reguladoras dentre eles o CD25 e o CTLA-4 (XIAO, *et al.*, 2010).



**FIGURA 2: Interação de FOXP3 com o NFAT e com o fator NF-kB.**

A figura 2A, representa a transcrição do gene da interleucina 2 (IL2) através da interação entre NFAT e NF-kB em células T CD4 efetoras, após ativação via receptor de células T (TCR), CD3 e CD28. A figura 2B representa a interação direta do FOXP3 aos promotores da citocina IL2 após ativação via TCR, CD3 e CD28. A figura 2C representa a inibição indireta da síntese de IL2, uma vez que FOXP3 pode ativar a transcrição de fatores que inibem a sinalização via complexo TCR e CD28. Modificado de CAMPBELL, et al., 2007.



**FIGURA 3: Regulação do NFAT mediada pela transcrição de genes em células T reguladoras.**

Na figura 3A está demonstrada a ativação de células T convencionais aonde o NFAT se liga a AP1. Na figura 3B está demonstrada a ativação de células TREG aonde o NFAT interage com o repressor de transcrição FOXP3. Devido a essa diferença no perfil de ativação celular um conjunto diferente de genes será transcrito em ambos os tipos de células. Sendo que na figura B serão transcritos genes associados ao FOXP3. Modificado de VLIET, et al., 2007.

O FOXP3 pode interagir também com os outros membros da família FOXP através da formação de um complexo que é capaz de associar-se a alvos presentes nos promotores, reprimindo a expressão de alguns genes. Alterações discretas na estrutura de FOXP3 são determinantes para sua função. Por exemplo, a exclusão de apenas um aminoácido dentro da região “leucine-zipper” pode alterar a oligomerização de FOXP3 e sua hetero-associação com FOXP1. Como consequência a associação entre o FOXP3 mutante e o promotor da citocina IL-2 não é eficiente e a repressão sobre a transcrição exacerbada dessa citocina não acontece (TORGERSON, *et al.*, 2009). A propriedade de ligação ao DNA que é prejudicada em formas mutantes do FOXP3 pode ser considerada responsável pelo fenótipo de pacientes com algumas síndromes auto-imunes (XIAO, *et al.*, 2010).

Diversos autores já demonstraram que a produção/expressão das diversas moléculas relacionadas com a imunorregulação, como as citocinas e as moléculas co-estimulatórias, está diferencialmente influenciada por polimorfismos genéticos presentes na população (KROEGER, *et al.*, 2007; MAURER, *et al.*, 2002). Polimorfismo genético é a denominação dada à coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado locus, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população (De NARDIN, 2009). Os tipos mais comuns de polimorfismos são: segmentos repetidos *in tandem* (nucleotídeos de mini e microsátélites), deleções/ inserções/ duplicações de segmentos pequenos ou grandes e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os SNPs são sítios no genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base (De NARDIN, 2009).

A presença do polimorfismo em um determinado gene pode ou não acarretar em alterações funcionais. A maioria dos polimorfismos é encontrada nas regiões não codificadoras dos genes (introns), mas que podem influenciar no padrão de expressão da molécula por constituir regiões de interação com fatores de transcrição. Já os polimorfismos presentes nos exons e na região promotora afetam diretamente esses padrões. Há cerca de 10 milhões de polimorfismos de base única no genoma humano sendo que cada um poderia representar a chave para entender riscos envolvendo doenças (BRADBURY, *et al.*, 2004).

Já foram identificados polimorfismos de base única no gene FOXP3 e sua possível associação com a suscetibilidade a doenças auto-imunes, provavelmente por

alterar a expressão e/ou a função de FOXP3 (SANCHEZ, *et al.*, 2005; BJORNVOLD, *et al.*, 2006). Entretanto com relação à doença de Chagas ainda não foram demonstradas associações entre polimorfismos presentes no gene FOXP3 e as diferentes formas clínicas. Portanto observa-se a importância de estudos adicionais para o melhor esclarecimento quanto aos aspectos genéticos individuais em portadores da doença de Chagas.

Alterações em domínios funcionais presentes na região terminal do gene FOXP3 foram identificadas e parecem estar envolvidas em uma mudança na estrutura tridimensional desse gene. Além disso, essas alterações podem levar a uma diminuição na estabilidade do RNA mensageiro do FOXP3 (VLIET, *et al.*, 2007). Outros estudos mostram ainda, a associação entre a Esclerose Múltipla com anormalidades no processamento e no nível de expressão de FOXP3 em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, estabelecendo uma ligação direta entre imunorregulação e um marcador genético (HUAN, *et al.*, 2005).

#### ***1.4-FOXP3 e sua localização no cromossomo X***

O gene repressor de transcrição FOXP3 está presente no cromossomo X e esta localização pode interferir de forma diferencial no padrão de transcrição da molécula entre os diferentes gêneros. Em geral as fêmeas são mais saudáveis e vivem mais do que os machos dentre as várias espécies de mamíferos inclusive os humanos. Os indivíduos do sexo masculino apresentam menores taxas de sobrevivência a doenças infecciosas, uma vez que os mesmos apresentam infecções com maior frequência e gravidade. Essas observações clínicas podem ser confirmadas pelo fato de que ao longo da evolução os homens adquiriram uma resposta imunológica menos efetiva do que as mulheres. O cromossomo X pode ser parcialmente responsável por essa maior resposta do sistema imune feminino (LIBERT, *et al.*, 2010).

Em alguns casos mutações e polimorfismos em um gene associado ao cromossomo X podem ser tão graves que se tornam incompatíveis com a vida. O cromossomo X possui outros genes que estão envolvidos com a resposta imune, como o CD40 ligante (CD40L) e o inibidor do fator nuclear  $\kappa\beta$  (Ik $\beta$ ) e as variações que ocorrem naturalmente em uma das cópias de qualquer um desses genes, pode resultar

em dois alelos diferentes com capacidades regulatórias distintas. Para as mulheres esse evento pode significar uma diversidade fisiológica adicional, pois as fêmeas heterozigotas podem evitar os efeitos deletérios de mutações e polimorfismos genéticos e também se beneficiar da diversidade adicionada através da resposta a novos desafios imunológicos, como a infecção por diferentes agentes etiológicos (LIBERT, *et al.*, 2010).

### ***1.5- Polimorfismos genéticos na doença de Chagas***

Diversos trabalhos já demonstraram que polimorfismos genéticos nos hospedeiros humanos possam estar associados a uma susceptibilidade ao desenvolvimento da forma clínica cardíaca da doença de Chagas (CALZADA, *et al.*, 2001). Dentro desse contexto, já foram relatados que genes de citocinas IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12 $\beta$  e TNF- $\alpha$  podem estar relacionados com as formas clínicas graves da doença. (COSTA, *et al.*, 2009, FLÓREZ, *et al.*, 2006, ZAFRA, *et al.*, 2007, RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2005). Em estudo desenvolvido por CALZADA (2009), a frequência do genótipo alto produtor de TGF- $\beta$ 1 foi maior no grupo de pacientes das populações peruana e colombiana quando comparados ao grupo controle, indicando suscetibilidade diferencial à infecção pelo *T. cruzi*. Além disso em estudo desenvolvido por COSTA (2009), o polimorfismo relacionado a baixa expressão da citocina imunomoduladora IL-10 se mostrou associado com a forma clínica cardíaca em pacientes portadores da doença de Chagas.

Dada a importância dos mecanismos inflamatórios para a patogênese da cardiopatia chagásica, a susceptibilidade genética pode resultar de relevantes polimorfismos funcionais, que levam a variações na intensidade da resposta imune inata ou adquirida envolvidas na patogênese da doença. Portanto, o potencial genético de expressão de determinadas moléculas é importante no curso clínico da doença em sua forma crônica.

A busca de associações entre genes candidatos com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica tem sido focada em genes envolvidos na resposta imune e inflamação. Considerando que a doença de Chagas tem característica multifatorial estima-se que cada gene esteja cerca de 1 a 10% envolvido na evolução da doença. No entanto, a identificação de genes e combinações genéticas em conjunto com fatores

ambientais, pode levar ao reconhecimento de indivíduos infectados pelo *T.cruzi* que poderão potencialmente desenvolver formas clínicas graves da doença (CUNHA-NETO, *et al.*, 2009).

## ***2.0-JUSTIFICATIVA***

---

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. A análise de particularidades na patologia das diferentes formas clínicas sugere que fatores múltiplos possam estar envolvidos no seu estabelecimento. Devido a esses fatores, a busca por marcadores genéticos e imunológicos que possam caracterizar diferenças entre pacientes com a forma IND e CARD faz-se ainda necessária para compreensão da dinâmica desse processo.

Polimorfismos estruturais presentes no gene FOXP3 são investigados em diversas doenças de caráter inflamatório e autoimune. A presença de determinadas variantes gênicas está associada a alterações da expressão dessa proteína (ZHANG, *et al.*, 2009; BASSUNI, *et al.*, 2003; BOTEMMA, *et al.*, 2010). Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que pacientes portadores da forma clínica IND apresentam uma maior frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> co-expressando FOXP3 em relação aos indivíduos com a forma clínica CARD, sugerindo um possível envolvimento dessas células no controle da morbidade da doença (DE ARAUJO, *et al.*, 2007; 2009). Portanto, este estudo foi desenvolvido dentro da hipótese de que a presença de polimorfismos estruturais do gene FOXP3 está associada com uma expressão diferencial dessa molécula nas células TREG dos indivíduos portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Dessa forma nos propomos a investigar, se existem correlações entre o papel de células T reguladoras e polimorfismos do gene FOXP3, com o controle da gravidade da doença em suas diferentes formas clínicas. Portanto esse estudo pretende contribuir com o melhor entendimento dos mecanismos imunogenéticos relacionados ao hospedeiro, envolvidos na patofisiologia da doença de Chagas.

### ***3.0-OBJETIVOS***

---

### ***3.1-Objetivo Geral:***

Avaliar a ocorrência de polimorfismos do tipo base única no gene FOXP3 em pacientes portadores da doença de Chagas e estabelecer as possíveis associações com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas dessa doença.

### ***3.2-Objetivos específicos:***

-Analisar a presença ou ausência de alelos polimórficos, pela identificação de polimorfismos do tipo base única localizados em genes codificadores para o FOXP3, em pacientes do gênero masculino apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e indivíduos não infectados;

-Determinar frequências alélicas e genóticas, pela identificação de polimorfismos do tipo base única, localizados no gene FOXP3, em pacientes do gênero feminino apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e indivíduos não infectados;

-Avaliar a expressão da molécula FOXP3 por células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas;

-Testar a associação entre os genótipos (frequência alélica de FOXP3) e a presença ou ausência de alelos polimórficos com os fenótipos (perfil de expressão de FOXP3) encontrados, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas;

-Correlacionar os genótipos e fenótipos encontrados conjuntamente com dados clínicos preditores de prognóstico (fração de ejeção do ventrículo esquerdo e diâmetro ventricular diastólico esquerdo) dos portadores das formas crônicas da doença de Chagas.

#### ***4.0-MATERIAIS E MÉTODOS***

---

#### ***4.1- Caracterização da população de estudo***

Os pacientes com doença de Chagas foram recrutados durante a consulta clínica de rotina no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Em todos os pacientes incluídos neste trabalho foram realizados exame clínico completo (Escore de Framingham e Classe funcional – NYHA), exames complementares que incluem raio-X de tórax, eletrocardiograma convencional, esofagograma com pesquisa de retenção (técnica de Neuheuser), enema opaco de enchimento sem preparo (sendo os dois últimos solicitados apenas para definição da forma indeterminada ou esclarecimento de constipação intestinal), ECG basal em repouso e a eletrocardiografia dinâmica (Holter), telerradiografia de tórax em pósterio-anterior e perfil e Ecodoplercardiografia transtorácica. Para fins de definição do grau de comprometimento cardíaco, foi adotada a classificação habitual no Ambulatório de Referência CTR-DIP:

**IND:** pacientes assintomáticos com sorologia positiva para o *T. cruzi*, ECG e radiografias de tórax e tubo digestivo normais. Exames mais sensíveis (Holter e teste de esforço) normais.

**CARD V:** pacientes com todas (ou parciais) manifestações cardíacas, porém apresentando aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (VED > 55 mm) e uma silhueta cardíaca aumentada (índice cárdio-torácico – ICT – acima de 0.5 mm).

O projeto proposto tem aprovação do comitê de ética em pesquisa (Parecer - 29/2008- CPESH-CPqRR).

Foram selecionados ao todo 203 pacientes controles e portadores da fase crônica da doença de Chagas, sendo 61 pacientes com a forma clínica IND, 71 pacientes com forma clínica CARD e 71 indivíduos não infectados, com a idade variando entre 18-69 anos (TABELA 1).

**TABELA 1:** Número de indivíduos estudados e distribuição por sexo

<b>Forma clínica</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Total de indivíduos</b>
<b>Não infectada (NI)</b>	35	36	71
<b>Indeterminada (IND)</b>	27	34	61
<b>Cardíaca (CARD)</b>	40	31	71
<b>Total</b>	102	101	203

Após avaliação clínica e laboratorial, os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: diagnóstico sorológico para a doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (ELISA, Hemaglutinação e Reação de imunofluorescência indireta), idade compreendida entre 18 e 70 anos; presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo; níveis de tensão arterial dentro de faixa na normalidade (sistólica < 160 mmHg e diastólica < 90 mmHg), ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas, e ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória; conclusão dos exames propostos e consentimento voluntário de participação na pesquisa.

#### Critérios de exclusão

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

\* Impossibilidade ou ausência de disponibilidade para a realização dos exames propostos;

\* Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade ou; pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a:

- 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou;
- 2) quarta bulha ao exame físico, ou;

- 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou;
- 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax.
- \* Evidências clínicas ou laboratoriais de hipo ou hipertireoidismo;
  - \* Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e se necessário, prova de tolerância oral à glicose;
  - \* Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
  - \* Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
  - \* Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol);
  - \* Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
  - \* Outras cardiopatias;
  - \* Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
  - \* Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que possa interferir nos resultados dos métodos propostos.
  - \* Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menor que 10g/dL;
  - \* Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;

#### 4.2 Amostras de sangue



**FIGURA 4: Esquema da estratégia de trabalho.**

*Representação esquemática da estratégia de trabalho com os experimentos realizados, bem como o número de pacientes envolvidos em cada etapa experimental NI, indivíduos não infectados. IND, pacientes portadores da forma clínica indeterminada. CARD, pacientes portadores da forma clínica cardíaca.*

As amostras de sangue de pacientes portadores da doença de Chagas e de indivíduos não infectados foram coletadas da seguinte maneira:

- 5 mL de sangue periférico em tubos Vacutainer contendo o anti-coagulante EDTA (Becton Dickinson, CA, USA) para a extração de DNA e posterior avaliação da presença de polimorfismos;
- 10 mL de sangue periférico em tubos vacutainer contendo o anticoagulante heparina (Becton Dickinson, CA, USA) para a marcação de FOXP3 em leucócitos.

#### ***4.3- Extração de DNA em sangue total***

O DNA das amostras de sangue periférico foi extraído utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por MILLER, *et al.*, 1988, modificado em nosso laboratório. No processo de extração do DNA, um volume de 200µL de sangue periférico coletado em tubo vacutainer contendo o anticoagulante EDTA foi transferido para tubos tipo eppendorf e adicionados 1mL de solução de Tris NH<sub>4</sub>Cl (1:9) (Tris HCl 0,17 M pH 7,65/NH<sub>4</sub>Cl 0,155M) previamente aquecida a 37°C. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 5 minutos, sendo posteriormente centrifugadas a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado deixando 400µL no tubo (o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito de sódio 5%). O procedimento descrito foi repetido utilizando dessa vez 600µL da mesma solução e descartando-se todo o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 1mL de solução salina 0,9%. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 400g durante 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e descartado em solução de hipoclorito. Em seguida, adicionou-se 150µL de HIGH TE (Tris HCl pH 8,0 100mM/ EDTA pH8,0 40mM), e o precipitado foi ressuspenso por agitação no vórtex. Adicionou-se, então, 200µL de solução de Lise de Madissen (Tris HCl 0,1 M pH8,0/ EDTA 0,5M pH8,0/ SDS 0,2%/ NaCl 1M) pré-aquecida a 50°C, 10µL de solução de proteinase K (20mg/mL) e as amostras incubadas a 37°C overnight (ON). Após esse período, 400µL de solução de fenol saturado com Tris foram adicionados em cada uma das amostras, homogeneizando lentamente por inversão, durante 20 minutos e, em seguida, centrifugadas a 400g por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido e, então, a fase aquosa foi aspirada e transferida para um novo tubo eppendorf, no qual foram adicionados 400µL de solução de clorofórmio –

álcool iso-amílico na proporção 24:1 à temperatura ambiente. As amostras foram novamente homogeneizadas por 20 minutos e então centrifugadas a 400g por 5 minutos. A nova fase aquosa formada foi aspirada e transferida para outro tubo eppendorf, no qual adicionou-se 40µL de acetato de sódio (3M) e 450µL de álcool isopropílico gelado. A amostra foi homogeneizada lentamente até o DNA precipitar e centrifugada a 400g por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram vertidos por 5 minutos em papel absorvente. O DNA foi ressuspenso em 30µL de LOW TE (Tris HCl 10mM pH8,0/EDTA 40mM pH8,0) e incubado em banho Maria a 57°C por 5 minutos. A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada em NanoDrop 100 (Thermo Scientific) utilizando-se 1µL da amostra de DNA. As amostras foram diluídas em água Milli-Q para que uma concentração final de 50/ng em 9 microlitros fosse obtida.

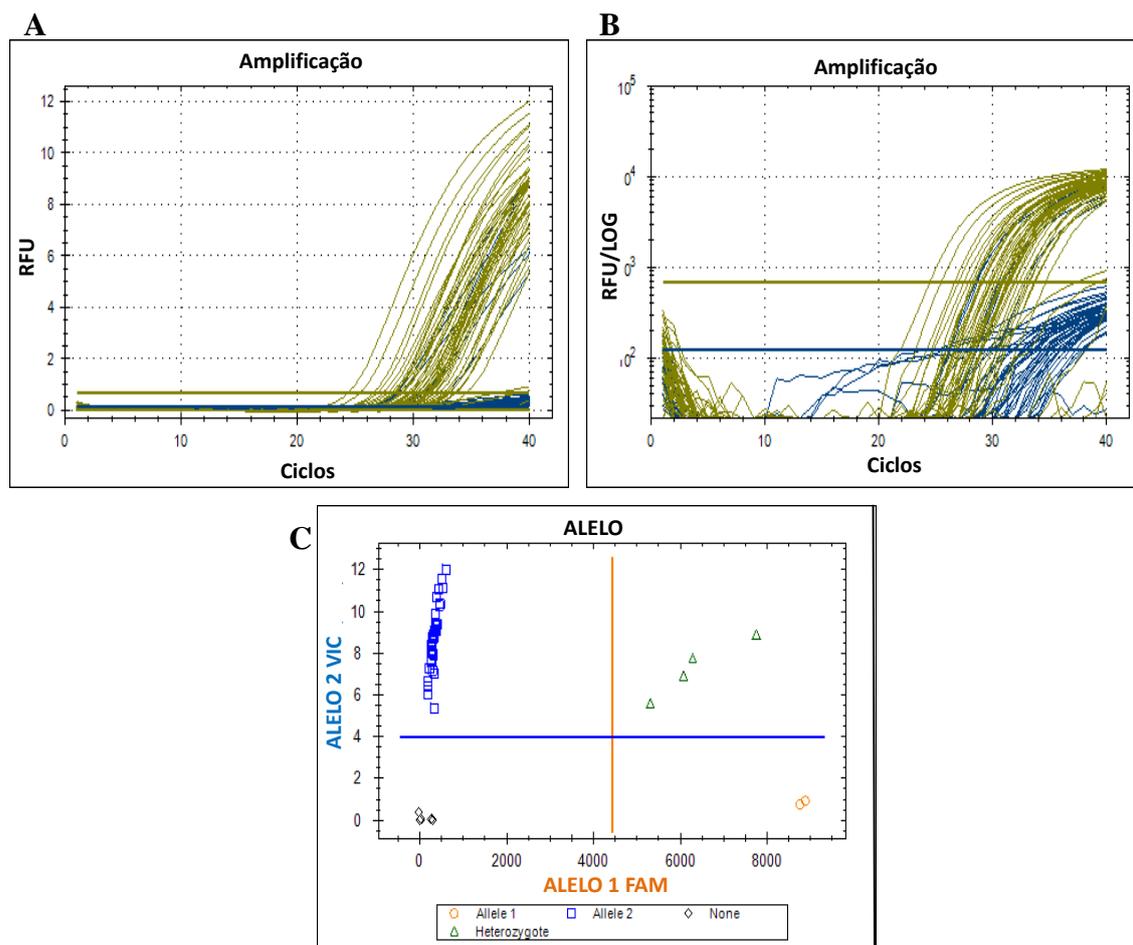
#### ***4.4-Identificação dos SNPS em genes codificadores para o FOXP3***

A partir do DNA isolado do sangue periférico, a genotipagem foi realizada através da amplificação pelo método *Real Time PCR*. Para tanto se realizou, a amplificação dos fragmentos de DNA através do sistema *TaqMan*, onde foram utilizados primers e sondas (Assay) correspondentes a cada SNP confeccionados pela Applied Biosystems. Esse sistema utiliza, além dos primers, uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um corante fluorescente repórter ligado a sua extremidade 5'(VIC e FAM) e um *quencher* não fluorescente ligado a extremidade 3'(MGB). Essa sonda liga-se a uma região do DNA posterior ao *primer*. Quando a polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do *primer*, ela é capaz de clivar a sonda e separar o corante do *quencher* havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente. Cada alelo possui uma sonda fluorescente diferente e dessa forma, é possível determinar o genótipo do polimorfismo a ser estudado de acordo com o sinal produzido. Foram utilizadas 2 sondas contendo os iniciadores para duas trocas de bases localizadas no intron 1 do gene FOXP3. Os iniciadores específicos utilizados para o gene em questão estão explicitados na tabela 2.

**TABELA 2:** *Iniciadores utilizados para a identificação de polimorfismos no gene FOXP3*

<b>Locus</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>RS</b>	<b>Iniciador</b>
<b>_3279 C/T</b>	Xq 11.23	3761547	5'-GGGGTCCAACGTGTGAGAAG-3' 5'-GTGGCCAGATGGACATCACC-3'
<b>_3499 G/T</b>	Xq 11.23	3761548	5'-GCACTCTGGCTCTCCATGCAT-3' 5'-GGGGTCCAACGTGTGAGAAG-3'

As reações foram realizadas no termociclador em tempo real da Bio-Rad (CFX96 Real-Time, Bio-Rad Laboratories, USA). Foi utilizado um volume final de reação de 20µL, contendo 50ng de DNA diluídos em 9µL de água, 10µL de master mix (TaqMan) e 0,5µL de primer. Foram adicionadas amostras com o genótipo já conhecido como controle positivo e poços com elementos da reação e água de injeção como controle negativo. As análises foram realizadas através do programa CFX 96. (FIGURA 5). As condições de realização das reações estão descritas na tabela 3.



**FIGURA 5: Discriminação alélica através do sistema de sondas *TaqMan*, polimorfismo -3279 C/T.**

A figura A representa as curvas de amplificação de VIC-verde (alelo T) e FAM-azul (alelo C). A figura B representa as curvas de amplificação de VIC (alelo T) e FAM (alelo C), com representação em escala logarítmica e demonstração das curvas basais de fluorescência de cada um dos corantes. A figura C representa a distribuição alélica das diferentes amostras. Os quadrados azuis correspondem aos homocigotos VIC (TT), os triângulos verdes correspondem aos heterocigotos VIC e FAM (TC), os círculos alaranjados correspondem aos homocigotos FAM (CC) e os losangos negros correspondem a controles negativos.

**TABELA 3:** Condições da PCR utilizada para a identificação de polimorfismos no gene *FOXP3*

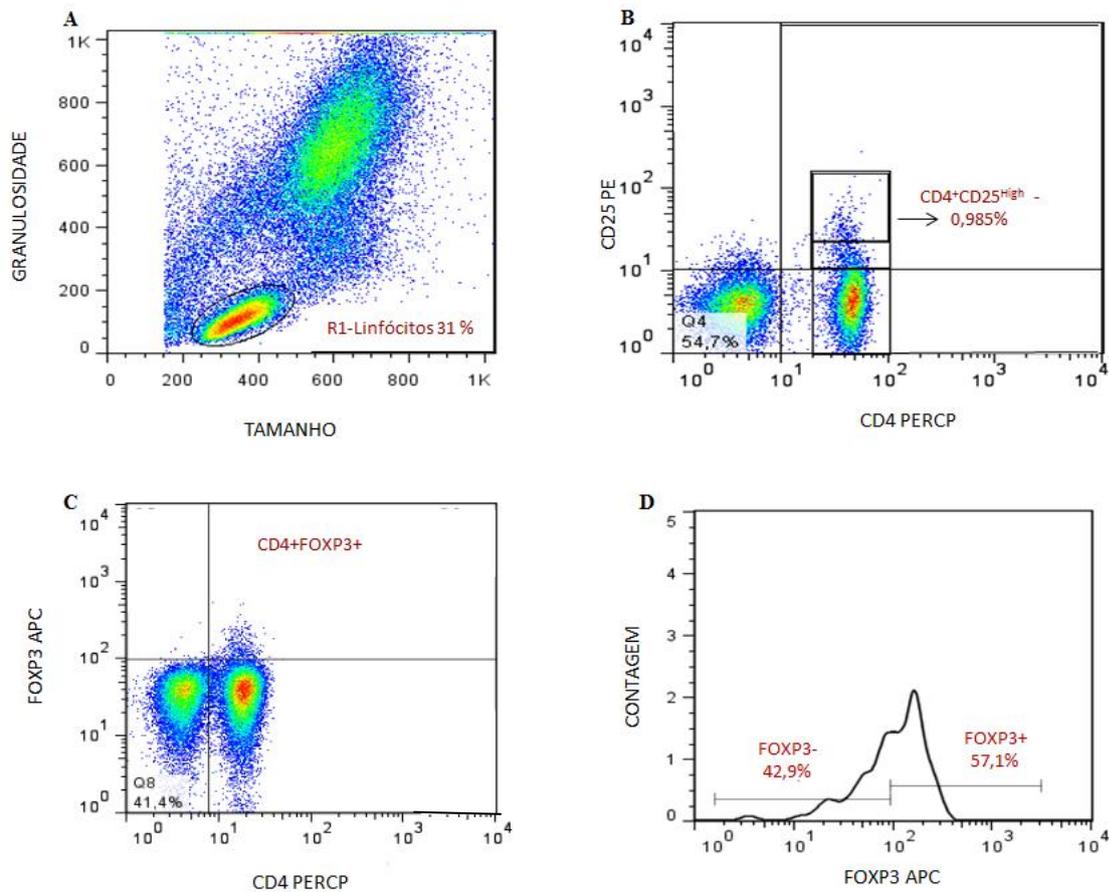
<i>Condições</i>	<i>Temperatura °c</i>	<i>Duração</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Ativação da Polimerase</i>	95	10 minutos	-
<i>Desnaturação</i>	95	15 segundos	40
<i>Anelamento/extensão</i>	60	1 minuto	40

#### **4.5- Expressão de *FOXP3* em linfócitos *TCD4+CD25<sup>high</sup>*.**

Para a avaliação da expressão do gene *FOXP3*, no contexto *ex-vivo*, foram transferidos 200µL de sangue para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, BD – E.U.A.), previamente identificados e contendo os anticorpos correspondentes as moléculas de superfície CD4 (clone SK3, BD, E.U.A.) e CD25 (clone M-A251, BD, E.U.A.), conjugados com os fluorocromos PERCP (Cloreto de Peridina Clorofila) e PE (Ficoeritrina), respectivamente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – FLS – BD, E.U.A.) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de PBS-W (PBS, pH 7,4, contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica ) e centrifugadas a 400g, por 10 minutos, a 18°C. Para a detecção do marcador intracitoplasmático *FOXP3* (clone PSH 101, eBIOSCIENCE, E.U.A.), foram acrescentados aos tubos 2,5mL de PBS-P (PBS, pH 7,4, contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). Os tubos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, seguidos da adição de 20µL de anticorpos anti-*FOXP3* conjugados como fluorocromo APC (Alofococianina), diluídos 1:2 em PBS-P e posteriormente incubados por uma hora à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL de PBS-P e em seguida, com 1mL de PBS-W. Foram adicionados 200µL de solução fixadora – Macs Facs Fix (MFF) (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 - reagentes Sigma, E.U.A.). As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo.

#### ***4.6-Aquisição dos dados no citômetro de fluxo:***

O citômetro de fluxo (FACScalibur- BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 6 parâmetros: tamanho (FSC) e granulidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2) e fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP e APC. Foram coletados 70.000 eventos para todas as amostras através do software acoplado ao citômetro “Cell quest”. A identificação da população das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>, foram feitas utilizando o software “Flow Jo”. A análise de células T reguladoras foi feita através de gráficos de distribuição de densidade de pontos de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC), selecionando a população de linfócitos (R1) (FIGURA 6A). Em seguida, foram construídos gráficos de FL 3 (CD4) versus FL 2 (CD25), permitindo identificar a segregação da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (FIGURA 6B). Em seguida foram confeccionados gráficos de FL 3 (CD4) versus FL1 (FOXP3) para a correta verificação da marcação (FIGURA 6C) e a partir do gráfico anterior foram realizados histogramas para análise da intensidade de expressão e frequência FOXP3 pelas células T reguladoras (FIGURA 6D).



**FIGURA 6:** Análise do percentual de linfócitos T  $CD4^+CD25^{high}$   $FOXP3^+$  do sangue periférico por citometria de fluxo através de gráficos de distribuição de pontos coloridos artificialmente pelo software Flow Jo.

A figura 6A representa o perfil celular obtido no contexto *ex vivo*, característico de gráficos de dispersão frontal/lateral relativa ao tamanho e granulidade das células. A figura 6B representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 3 ( $CD4 - PerCP$ ) versus fluorescência 2 (anti- $CD25 - PE$ ), abordagem utilizada para delimitar a população celular de interesse,  $CD4^+CD25^{High}$ . A figura 6C representa o perfil de marcação da fluorescência 4 (anti- $FOXP3 - APC$ ). A figura 6D demonstra o perfil celular obtido pelo gráfico de histograma de ( $FOXP3 - APC$ ), abordagem utilizada para verificar os níveis de expressão e frequência da molécula  $FOXP3$ .

#### ***4.7-Análise estatística***

Foi realizado o teste do Qui-quadrado ( $X^2$ ) para a comparação univariada entre a distribuição de genótipos e alelos nos grupos de indivíduos pesquisados. A análise de distribuição genotípica foi realizada em tabela de contingência 3x2 enquanto a distribuição alélica e dos genótipos +/- em tabela 2x2. Foram consideradas significativas as comparações em que  $p < 0,05$ . Todos os testes de associação genotípica e alélica univariada foram realizados através do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 12.0. IBM corporation, USA). Os genótipos foram incluídos na análise multivariada por regressão logística. Para a conferência do desequilíbrio de ligação e formação de haplótipos entre os polimorfismos estudados foi utilizado o programa Haploview JRE 4.2.(USA) Para os estudos fenotípicos de expressão do gene FOXP3, os dados foram analisados pelo teste t não pareado, para a correlação entre os genótipos e a expressão de FOXP3 foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todos os testes fenotípicos foram realizados através do programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego,CA). Foram realizados também, testes de correlação entre a frequência de expressão do FOXP3 com os parâmetros clínicos através do programa JUMP 5.0.1 (SAS Institute Inc, Cary, USA).

## ***5.0-RESULTADOS***

---

## 5.1-Estudos de polimorfismo do gene FOXP3

### 5.1.1-Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Inicialmente foi avaliado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, que verifica se a variação genética de uma determinada população está preservada. A verificação do equilíbrio de um loco pode ser realizada pela contagem das frequências genotípicas. Primeiro calculam-se as frequências gênicas e em seguida verificam-se as frequências de homozigotos. Se a frequência de homozigotos observada se igualar ao quadrado de suas frequências gênicas, a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se as frequências não se igualam, a população não está em equilíbrio (RIDLEY, 2006). A fórmula utilizada para o cálculo do equilíbrio foi:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Sendo  $p$  a frequência do alelo 1(o alelo ancestral) e  $q$  a frequência do alelo 2 ( o alelo variante). De acordo com a fórmula demonstrada e considerando-se um nível de significância de 5% e grau de liberdade igual a 1, os valores de  $X^2$  inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio. Os resultados desta análise estão mostrados na tabela 4. Portanto, pode-se observar que a população de estudo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas para o polimorfismo -3499 G/T (rs 3761548).

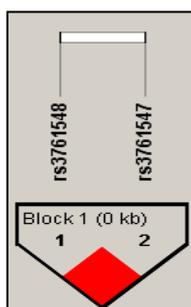
**TABELA 4:** Equilíbrio de Hardy-Weinberg

<b>Polimorfismo</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Valor de P</b>
rs 3761547	4,74	0,0017
<b>rs 3761548</b>	<b>3,17</b>	<b>0,3175</b>

### 5.1.2- Desequilíbrio de ligação

Considerando que os polimorfismos estudados estão localizados no mesmo cromossomo, foi realizada a avaliação da formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação.

O termo “haplótipo” (genótipo haplóide) refere-se à combinação de alelos marcadores num mesmo cromossomo. O grau de associação entre dois polimorfismos pode ser medido por meio de métodos estatísticos e indicar se estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, se estão formando uma estrutura haplótípica (ZHAO, *et al.*, 2003). Valores de  $D' \leq 1$  e valores de  $LOD > 2$  indicam forte tendência a desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados. Nossos resultados demonstraram, a partir da análise realizada no programa *Haploview*, que os dois polimorfismos -3279 C/T (rs 3761547) e -3499 G/C (rs 3761548) podem estar associados e serem transmitidos de uma forma conjunta durante as gerações em um percentual de 4% da população estudada (este percentual é dado pelo valor de  $r^2$ ). Chegamos a essa conclusão através dos valores encontrados, que foram;  $D'=1$ ,  $LOD=4,78$  e  $r^2 =0,048$ . Na figura abaixo está demonstrado, o esquema representativo de desequilíbrio de ligação montado pelo programa *Haploview*. A barra branca indica a localização dos polimorfismos no cromossomo e o triângulo em vermelho indica a estrutura formada pelos dois polimorfismos em desequilíbrio de ligação.



**FIGURA 7:** Estrutura representativa do desequilíbrio de ligação nos SNPS rs 3761547 e rs3761548 presentes no gene FOXP3. A estrutura em desequilíbrio de ligação foi montada através do programa *Haploview* 4.2. Quanto mais forte for o vermelho demonstrado pela figura maior a ligação de desequilíbrio entre os SNPS (figuras brancas ou vermelho claro indicam fraca tendência a desequilíbrio de ligação). A figura em questão indica que os dois SNPS estão em desequilíbrio de ligação.

### 5.1.3-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) no gene FOXP3

O Polimorfismo -3279 refere-se à troca de base C para T no gene FOXP3 e foi avaliado em 65 pacientes do gênero feminino e 67 pacientes do gênero masculino. O número total de pacientes estudados foi de 202 sendo que para a realização das comparações e confecção dos dados estatísticos os mesmos foram agrupados por gênero devido a localização do gene FOXP3 no cromossomo Xp11.23. Dessa forma vale ressaltar que apenas os indivíduos do sexo feminino apresentam genótipos heterozigotos. Os dados correspondentes à distribuição da população estudada se encontram sumarizados na tabela 5.

**TABELA 5:** Indivíduos estudados para o polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547)

Portadores da doença de Chagas	Não infectados (NI)
67 homens (IND=27 CARD=40)	35 homens
65 mulheres (IND=34 CARD=31)	35 mulheres

#### 5.1.3.1-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) do gene FOXP3 no gênero feminino

A genotipagem do polimorfismo no gene FOXP3 (-3279 C/T) nos diferentes grupos de estudo em indivíduos do gênero feminino está representada na tabela 6.

A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos não apresentou resultados estatisticamente significativos, sendo a frequência do genótipo homozigoto selvagem CC de 6%, 0% e 3% para os grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Portanto foi observado que o genótipo homozigoto CC apresenta uma baixa frequência na população amostral e não foi encontrado em pacientes portadores da forma clínica IND. O genótipo CT esteve presente em 17%, 8% e 9% e o genótipo TT em 77%, 92% e 88%, respectivamente, para os grupos NI, IND e CARD.

Em relação à frequência alélica, o alelo C estava frequente em 6%, 0% e 3%, nos grupos NI, IND e CARD, respectivamente. O alelo T, por sua vez, estava frequente em 94% no grupo NI, 100% no grupo IND e 97% no grupo CARD, resultado semelhante

foi observado também na análise de presença ou ausência do alelo polimórfico. A partir dos dados obtidos é possível observar que o alelo polimórfico T é mais frequente em todos os grupos estudados e está presente em todos os indivíduos portadores da forma clínica IND. Dessa forma, não foram encontradas diferenças significativas nos estudos de presença e frequência alélica entre as formas clínicas da doença de Chagas.

**TABELA 6** - *Dados relacionados ao perfil genotípico e alélico referente ao polimorfismo C/T na posição -3279 do gene FOXP3 no gênero feminino.*

	<b>NI</b> n=35(%)	<b>IND</b> n=34(%)	<b>CARD</b> n=31(%)
<b>GENÓTIPOS</b>			
CC	2 (6%)	0 (%)	1 (3%)
CT	6 (17%)	3 (8%)	3 (9%)
TT	27 (77%)	31 (92%)	27 (88%)
<b>ALELOS</b>			
T	60 (94%)	65 (100%)	57 (97%)
C	4 (6%)	0 (0%)	2 (3%)
<b>PRESENÇA/AUSÊNCIA</b>			
T+ (CT/TT)	33 (94%)	34 (100%)	30 (97%)
T- (CC)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)

Esses resultados sugerem que o polimorfismo do gene FOXP3 -3279 C/T não está associado às diferentes formas clínicas da doença de Chagas na população estudada em indivíduos do gênero feminino.

#### **5.1.3.2-Polimorfismo -3279 C/T (rs:3761547) do gene FOXP3 no gênero masculino**

Os estudos alélicos do polimorfismo no gene FOXP3 (-3279 C/T) nos diferentes grupos de estudo em indivíduos do gênero masculino estão sumarizados na tabela 7. É importante salientar que para pacientes do gênero masculino a única análise realizada foi em relação à presença ou ausência do alelo polimórfico T uma vez que o FOXP3 ,como descrito anteriormente, está localizado no cromossomo X.

A comparação entre a presença ou ausência do alelo polimórfico T não apresentou resultados estatisticamente significativos entre os grupos estudados. O alelo polimórfico (T+) esteve presente em 94% , 89% e 86% nos grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Com relação à ausência do alelo polimórfico T (T-), foram encontrados valores de, 6% , 11% e 14% respectivamente, nos indivíduos NI, IND e CARD. De forma semelhante aos indivíduos do gênero feminino, a grande maioria dos pacientes apresentou elevada presença do alelo polimórfico T+ (TABELA 7).

**TABELA 7** - *Dados relacionados à presença ou ausência do alelo polimórfico referente ao polimorfismo C/T na posição -3279 do gene FOXP3 no gênero masculino.*

	<b>NI</b> <b>n=35(%)</b>	<b>IND</b> <b>n=27(%)</b>	<b>CARD</b> <b>n=40(%)</b>
<b>PRESENÇA/AUSÊNCIA</b>			
T+ (CT/TT)	33 (94%)	24(89%)	35 (86%)
T- (CC)	2 (6%)	3 (11%)	5 (14%)

Esses resultados sugerem que apesar do alelo polimórfico ser muito constante nos indivíduos estudados, o mesmo não está associado às diferentes formas clínicas da doença de Chagas em indivíduos do gênero masculino.

#### **5.1.4-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) no gene FOXP3**

Para o polimorfismo G/T (correspondente à troca de bases G para T) foram avaliados 67 pacientes do gênero masculino e 65 pacientes do gênero feminino. Foram estudados também 35 indivíduos controle do gênero feminino e 36 do gênero masculino (TABELA 8).

**TABELA 8:** *Indivíduos estudados para o polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548)*

Portadores da doença de Chagas	Não infectados
67 homens (IND=27 CARD=40)	36 homens
65 mulheres (IND=34 CARD=31)	35 mulheres

#### **5.1.4.1-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) do gene FOXP3 no gênero feminino**

A genotipagem do polimorfismo no gene FOXP3 (-3499 G/T) nos diferentes grupos de estudo, em indivíduos do gênero feminino está demonstrada na tabela 9.

O polimorfismo apresentou frequências genotípicas e alélicas bem distintas entre os pacientes com doença de Chagas, sendo encontradas diferenças estatísticas entre portadores das formas clínicas IND e CARD ( $p=0,045$ ). Os valores das frequências revelaram que o genótipo heterozigoto GT é duas vezes mais predominante no grupo IND quando comparado ao grupo CARD. Com relação ao genótipo heterozigoto os indivíduos estudados apresentaram frequências de 28 %, 50% e 23% para os grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Já os grupos NI e CARD apresentaram percentuais mais elevados do genótipo homozigoto selvagem GG, sendo que foram encontradas frequências de 60%, 38% e 68%, respectivamente, entre os grupos NI, IND e CARD. O genótipo homozigoto polimórfico TT esteve presente em uma baixa frequência na população amostral e se mostrou melhor distribuído entre os diferentes grupos estudados, foram encontradas frequências de 12% para os indivíduos NI, 12% para os pacientes IND e 9% para o grupo CARD.

A análise da frequência alélica mostrou que o alelo polimórfico T estava frequente em 30% no grupo NI, 49% no grupo IND e em 23% no grupo CARD, enquanto que o alelo G apresentou uma frequência de 70%, 51% e 77% nos grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Apesar do alelo polimórfico T estar muito frequente nos indivíduos portadores da forma clínica IND quando comparado à forma clínica CARD, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados (TABELA 9).

A análise do polimorfismo relacionada à presença ou ausência do alelo polimórfico T mostrou uma diferença significativa entre os grupos IND e CARD. A

presença do alelo T foi significativamente maior no grupo IND comparado ao grupo CARD ( $p=0,016$ ). Com relação à presença do alelo polimórfico T (T+), os indivíduos estudados apresentaram valores de 40 %, 62% e 32% para os grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Já para ausência do alelo polimórfico (T-), os grupos NI e CARD apresentaram percentuais mais elevados, sendo que foram encontradas valores de 60%, 38% e 68%, respectivamente, entre os grupos NI, IND e CARD. Os resultados demonstraram ainda, que pacientes que apresentam o alelo T tem 2,95 vezes mais chance de desenvolver a forma indeterminada da doença de Chagas ( $OR=0,295$ ;  $CI=0,106-0,820$ ) (TABELA 9).

**TABELA 9** - Dados relacionados ao perfil genotípico e alélico referente ao polimorfismo G/T na posição -3499 do gene FOXP3 no gênero feminino.

	NI n=35(%)	IND n=34(%)	CARD n=31(%)
<b>GENÓTIPOS</b>			
GG	21 (60%)	<b>13 (38%)*<sup>a</sup></b>	<b>21(68%)*<sup>a</sup></b>
GT	10 (28%)	<b>17 (50%)*<sup>a</sup></b>	<b>7 (23%)*<sup>a</sup></b>
TT	4 (12%)	4 (12%)	3 (9%)
<b>ALELOS</b>			
T	18 (30%)	25 (49%)	13 (23%)
G	42 (70%)	26 (51%)	42 (77%)
<b>PRESENÇA/AUSÊNCIA</b>			
T+ (GT/TT)	14(40%)	<b>21 (62%)*<sup>b</sup></b>	<b>10 (32%)*<sup>b</sup></b>
T- (GG)	21 (60%)	<b>13 (38%)*<sup>b</sup></b>	<b>21 (68%)*<sup>b</sup></b>

\*Os asteriscos na tabela acima indicam às diferenças estatísticas encontradas; \***a** - IND X CARD- ( $p=0,045$  e  $X^2=6,066$ ); \***b** IND X CARD- ( $p=0,016$ ,  $OR=0,295$ ,  $CI=0,106-0,820$  e  $X^2=5,659$ ).

Estes resultados podem sugerir que em indivíduos do gênero feminino, o genótipo heterozigoto está relacionado ao desenvolvimento da forma clínica indeterminada da doença de Chagas. Podemos hipotetizar também, que o alelo

polimórfico T, possui um papel protetor relacionado ao desenvolvimento da forma clínica cardíaca da doença, uma vez que o mesmo foi relacionado a uma maior chance de desenvolvimento da forma clínica indeterminada.

#### **5.1.4.2-Polimorfismo -3499 G/T (rs:3761548) do gene FOXP3 no gênero masculino**

Os estudos alélicos do polimorfismo no gene FOXP3 (-3499 G/T) nos diferentes grupos de estudo em indivíduos do gênero masculino estão sumarizados na tabela 10.

A comparação entre a presença ou ausência do alelo polimórfico T não apresentou resultados estatisticamente significativos entre os grupos estudados. O alelo polimórfico T+ esteve presente em 39%, 26% e 25% nos grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Com relação à ausência do alelo polimórfico T (T-), foram observados valores de, 61%, 74% e 75% respectivamente, nos indivíduos NI, IND e CARD (TABELA 10).

**TABELA 10** - Dados relacionados à presença ou ausência do alelo polimórfico referente ao polimorfismo G/T na posição -3499 do gene FOXP3 no gênero masculino.

	NI n=36(%)	IND n=27(%)	CARD n=40(%)
<b>PRESENÇA/AUSÊNCIA</b>			
T+ (GT/TT)	14 (39%)	7(26%)	10 (25%)
T- (GG)	22 (61%)	20 (74%)	30 (75%)

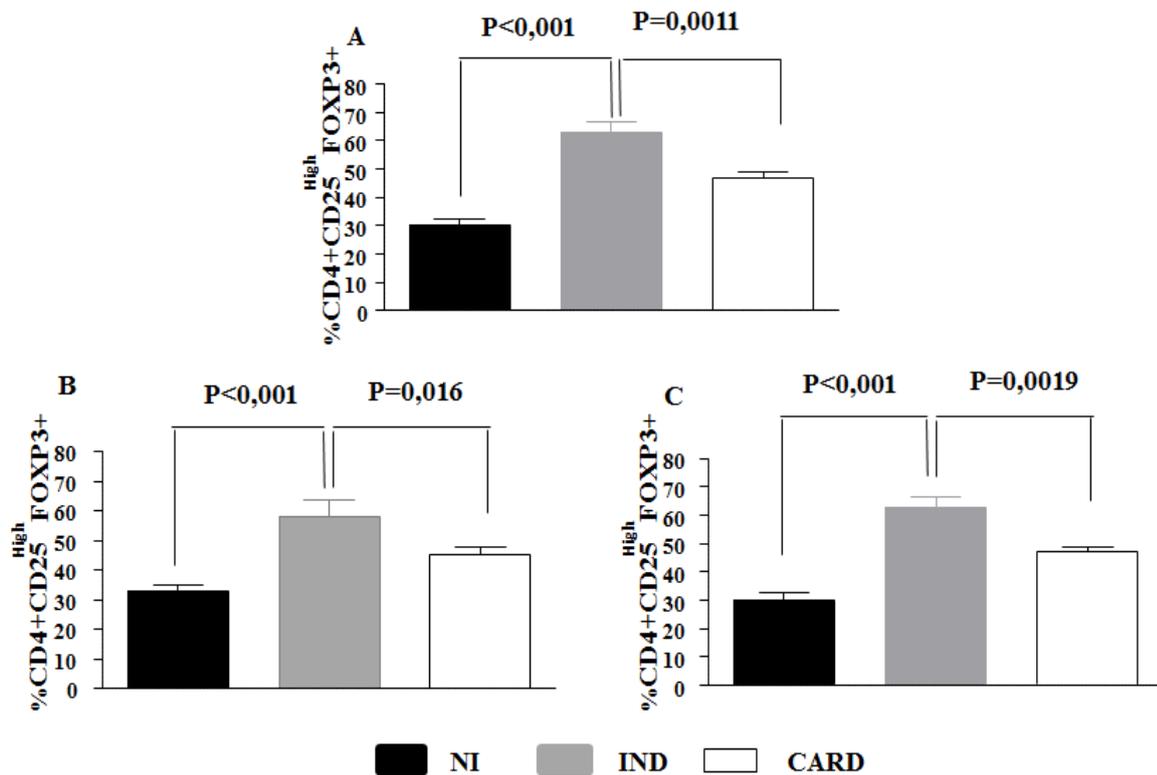
Esses resultados sugerem que o alelo polimórfico se encontra bem distribuído entre os pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Portanto, esse alelo, não interfere na evolução da doença nos indivíduos estudados do gênero masculino.

## **5.2-Estudos fenotípicos**

### **5.2.1- Análise da expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados e pacientes portadores da doença de Chagas.**

O fator de transcrição FOXP3 é um marcador molecular específico para caracterizar as células TREG (FONTENOT, *et al.*, 2003). Portanto, verificamos a expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos do sexo masculino e indivíduos do sexo feminino das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

A análise dos dados demonstrou uma maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ( $p < 0,05$ ) dos pacientes portadores da forma clínica IND em ambos os gêneros quando comparado aos pacientes CARD e aos indivíduos NI (FIGURA 8). Estes dados nos permitem sugerir que a expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> pode estar correlacionada com a evolução diferencial da doença de Chagas, e atuar como importante fator no controle da morbidade da patologia desta infecção.



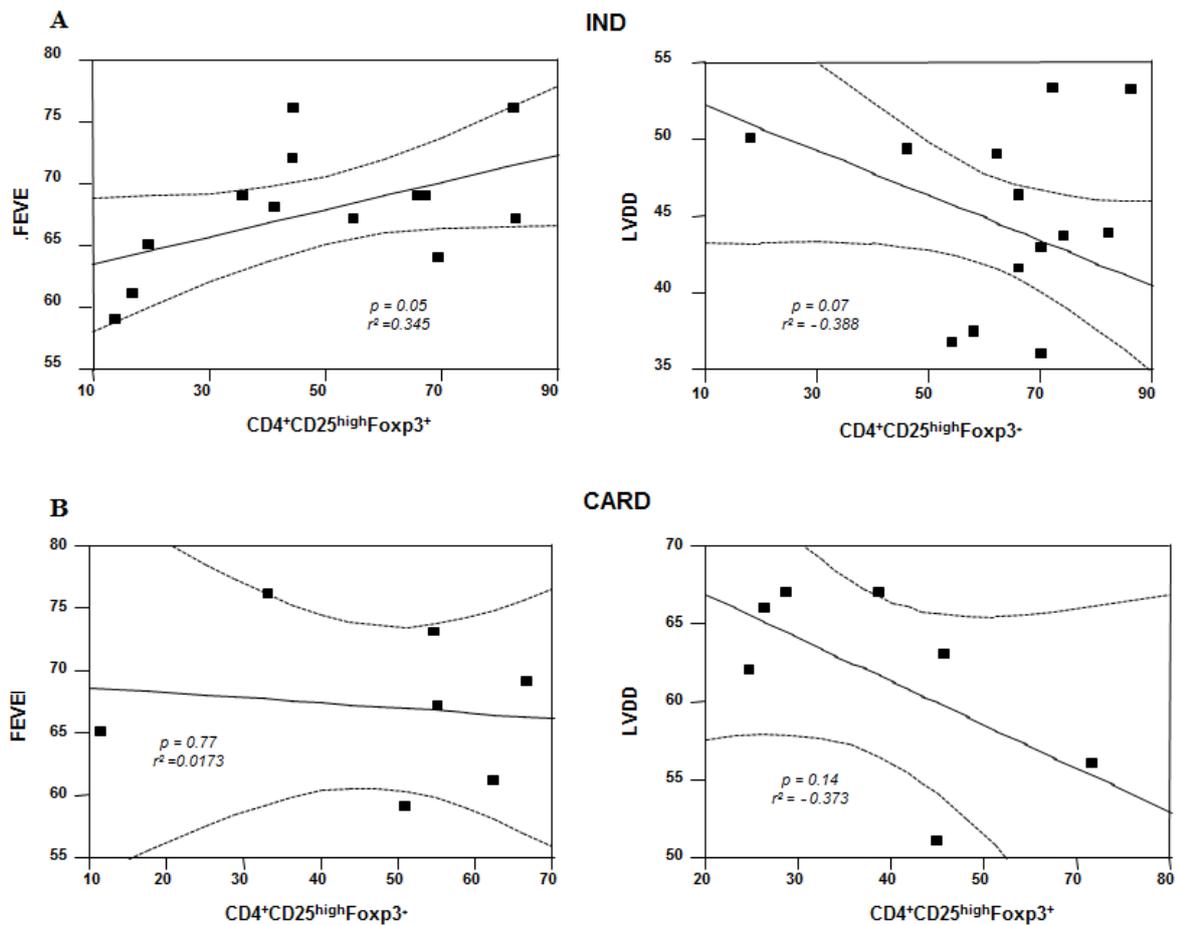
**FIGURA 8:** Expressão de FOXP3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados (NI) e pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas. Gráfico 8A, expressão de FOXP3 independente de gênero (NI= 40), (IND=33) e (CARD=64). Gráfico 8B expressão de FOXP3 no gênero feminino (NI= 25), (IND=18) e (CARD=31) e gráfico 8C expressão de FOXP3 no gênero masculino (NI= 15), (IND=15) e (CARD=33). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão. As diferenças significativas foram estabelecidas através do teste T Student e estão demonstradas pelas barras.

### ***5.3-Correlação entre a frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> com os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico***

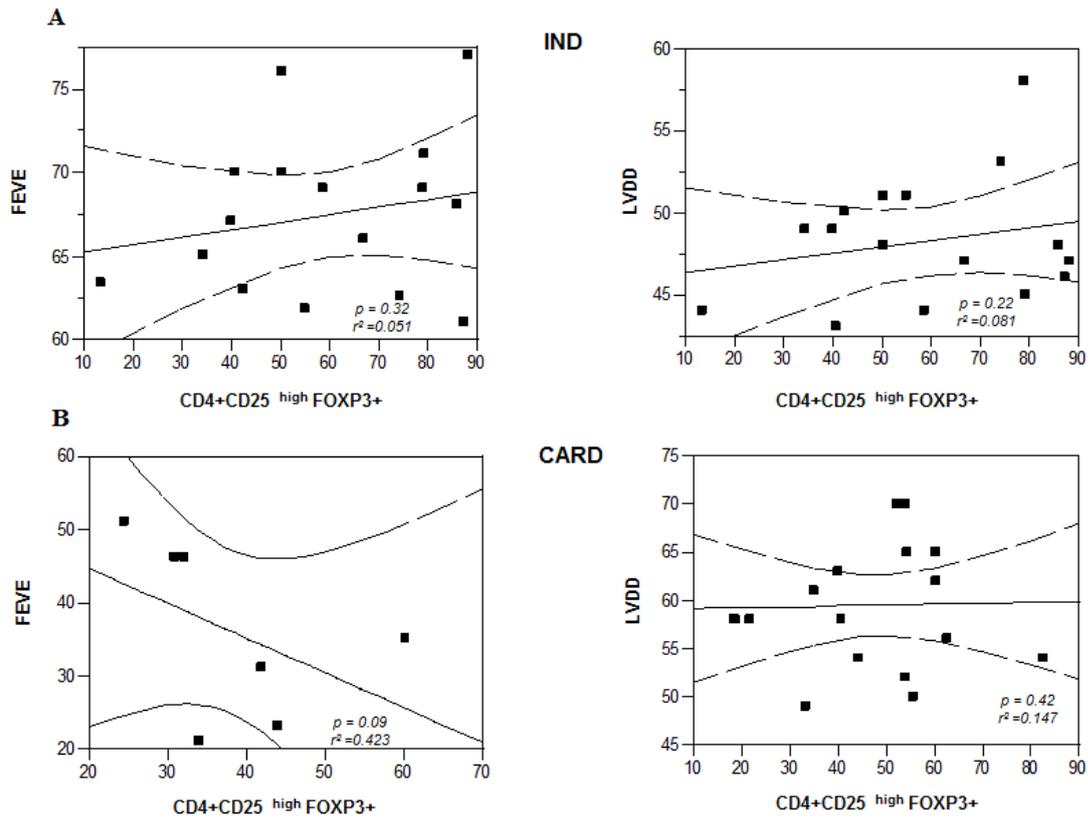
Com o objetivo de verificar se a frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> correlaciona com o controle da miocardiopatia e um possível papel protetor na doença de Chagas, realizamos análises de correlação entre a frequência de células de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e marcadores clínicos associados com bom prognóstico clínico. Os dois parâmetros utilizados foram a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE-valor de referência 40%) e o diâmetro ventricular diastólico esquerdo (LVDD-valor de referência 55 mm), esses parâmetros clínicos são diretamente e inversamente relacionados com melhor função cardíaca, respectivamente. Para isso, foram realizadas análises de correlação com os indivíduos agrupados pela forma clínica independente do gênero (FIGURA 9) e agrupados pelo gênero (FIGURAS 10 e 11).

Os resultados demonstraram que os pacientes portadores da forma clínica IND apresentam uma correlação positiva e significativa entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e o parâmetro FEVE ( $p < 0,05$ ). Observa-se, ainda, uma correlação negativa e significativa entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e o LVDD nos pacientes com a forma IND. Com relação aos pacientes com a forma clínica CARD não foram observadas diferenças estatísticas significativas relacionadas a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3 e os parâmetros clínicos (FIGURA 9). A análise de correlação nos indivíduos agrupados por gênero não demonstrou diferença estatística entre os grupos estudados (FIGURAS 10 e 11).

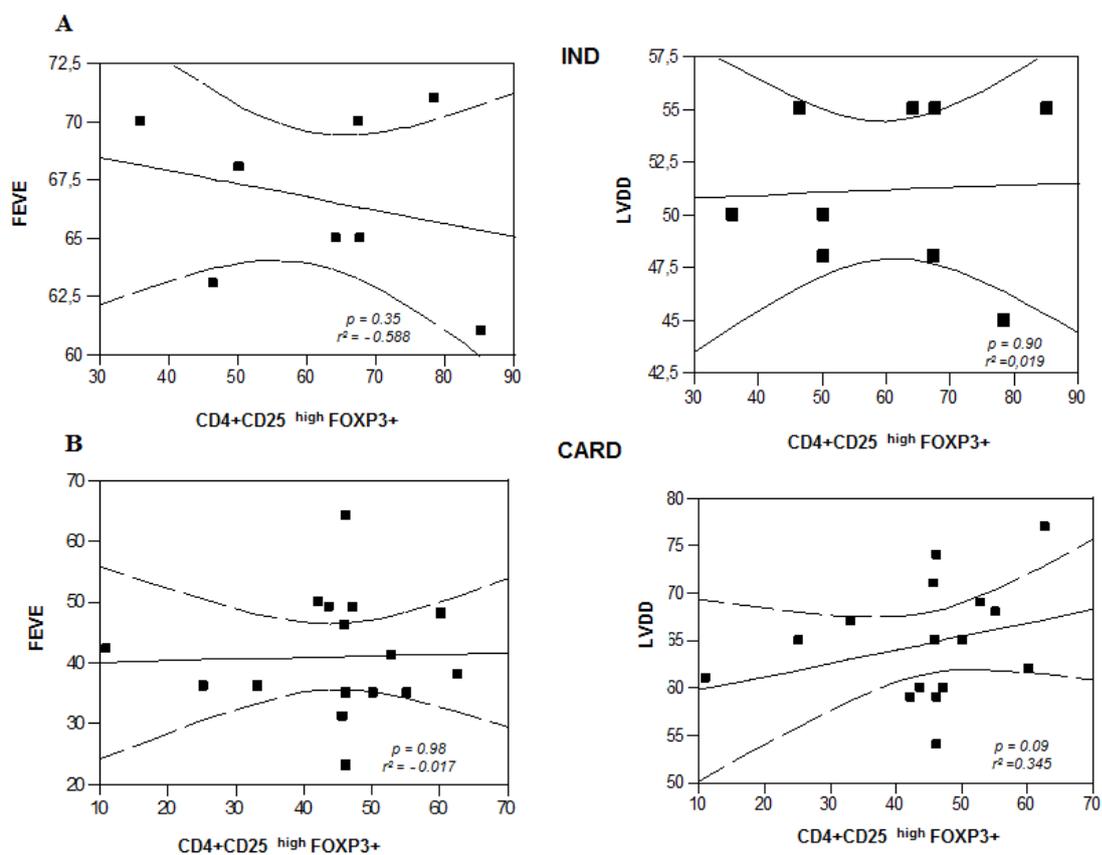
Estes resultados sugerem que as células T reguladoras podem exibir um papel imunorregulatório correlacionado à manutenção de uma melhor função cardíaca em pacientes portadores da forma clínica IND independente do gênero.



**FIGURA 9:** Correlação entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico. Gráfico 9A, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica IND e os parâmetros clínicos fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e diâmetro ventricular diastólico esquerdo (LVDD). Gráfico 9B, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica CARD e os parâmetros clínicos FEVE e LVDD. Os resultados foram confeccionados através do programa JUMP 5.0.1.



**FIGURA 10:** Correlação entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico em pacientes do gênero feminino. Gráfico 10A, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica IND e os parâmetros clínicos fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e diâmetro ventricular diastólico esquerdo (LVDD). Gráfico 10B, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica CARD e os parâmetros clínicos FEVE e LVDD. Os resultados foram confeccionados através do programa JUMP 5.0.1.



**FIGURA 11:** Correlação entre a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> e os parâmetros clínicos preditores de bom prognóstico clínico em pacientes do gênero masculino. Gráfico 11A, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica IND e os parâmetros clínicos fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e diâmetro ventricular diastólico esquerdo (LVDD). Gráfico 11B, correlação entre a expressão de FOXP3 dos indivíduos portadores da forma clínica CARD e os parâmetros clínicos FEVE e LVDD. Os resultados foram confeccionados através do programa JUMP 5.0.1.

#### ***5.4-Análise entre a frequência fenotípica de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e a distribuição dos genótipos e alelos do gene FOXP3.***

Como descrito anteriormente, os polimorfismos estudados estão presentes no intron 1 do gene FOXP3 e estudos demonstraram que essa região pode ser importante por regular a expressão desse gene devido a interação com fatores de transcrição. Para verificar se os dados genotípicos podem influenciar a expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> analisamos a frequência de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> com os genótipos e alelos apresentados pelos indivíduos estudados. Com essa análise, pode-se verificar se a expressão de FOXP3 pode ser influenciada pelos diferentes genótipos e alelos nos indivíduos do gênero feminino e se a presença ou ausência do alelo polimórfico pode influenciar a expressão em indivíduos do gênero masculino.

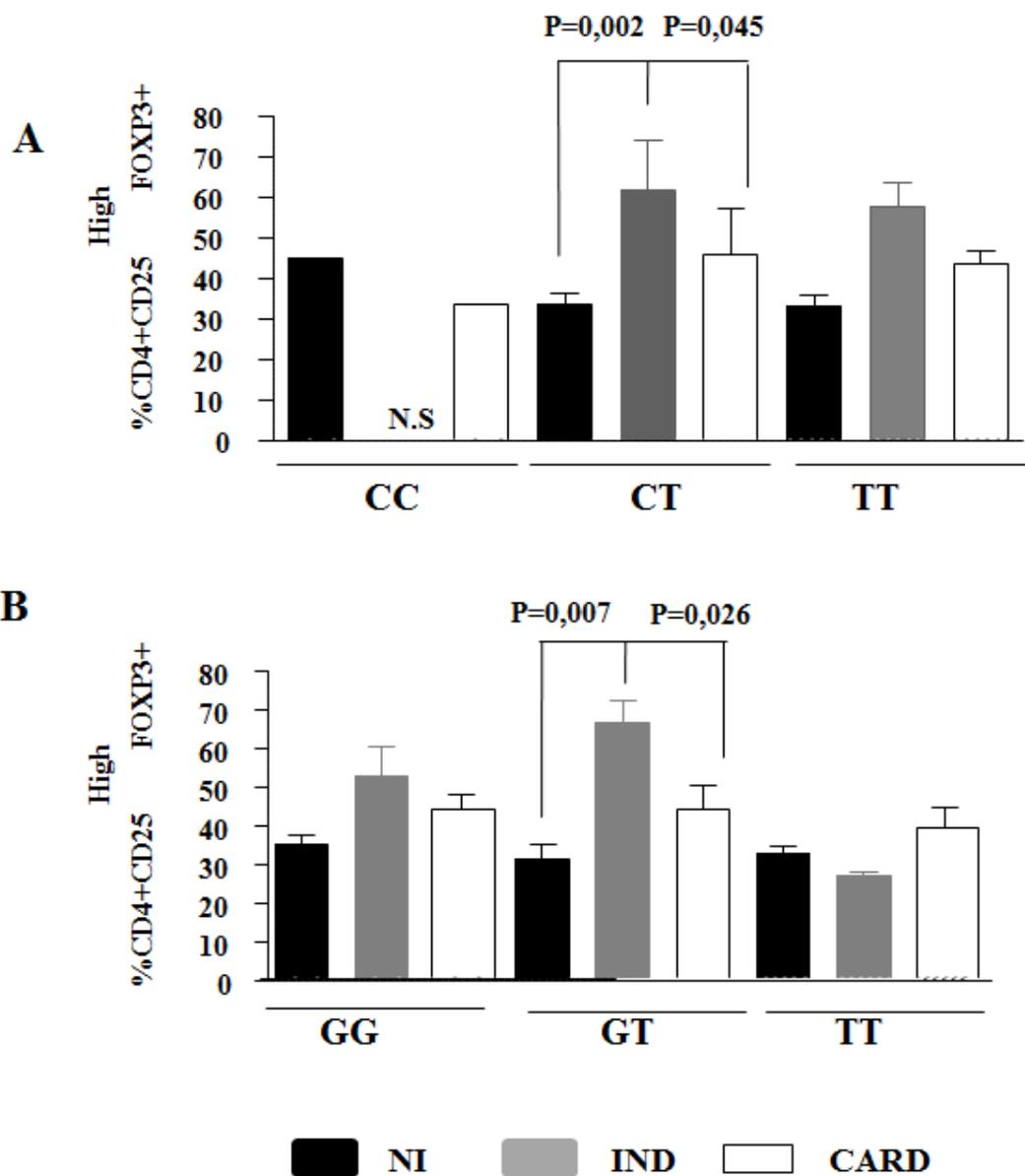
##### ***5.4.1-Análise da expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino de acordo com as frequências genotípicas referentes aos polimorfismos - 3499 G/T e -3279 C/T.***

A análise relacionada ao polimorfismo -3279 C/T mostrou que pacientes da forma clínica IND que possuem o genótipo heterozigoto CT apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado com os outros indivíduos portadores do mesmo genótipo (p<0,05). Observou-se, ainda, que indivíduos portadores do genótipo polimórfico TT da forma clínica IND apresentam maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado aos indivíduos CARD e NI portadores do mesmo genótipo. É importante salientar que a baixa frequência do genótipo homozigoto CC na população estudada dificultou a análise entre a expressão de FOXP3 e o polimorfismo -3279 C/T (FIGURA 12 A).

Com relação ao polimorfismo -3499 G/T, os dados mostraram que pacientes da forma clínica IND que possuem o genótipo heterozigoto GT apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado com os outros indivíduos portadores do mesmo genótipo (p<0,05). Além disso, os pacientes com a forma IND apresentaram a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado aos portadores dos outros genótipos encontrados (GG e TT).

Observamos também que indivíduos portadores do genótipo polimórfico TT apresentam a menor expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado aos portadores dos outros genótipos (FIGURA 12 B).

Esses resultados sugerem que o genótipo heterozigoto GT pode estar associado a um aumento na expressão de FOXP3 em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. Para reforçar ainda mais essa hipótese, podemos correlacionar o dado de expressão com as frequências genóticas demonstradas anteriormente, uma vez que o genótipo heterozigoto GT esteve muito frequente em mulheres portadoras da forma clínica IND, sendo que as mesmas apresentam os maiores níveis de expressão do FOXP3, ou seja, a frequência desse genótipo em mulheres do grupo IND foi mais que o dobro da frequência apresentada por mulheres do grupo CARD.



**FIGURA 12:** Análise entre a expressão de FOXP3 em células  $TC4^+CD25^{high}$  e as frequências genóticas de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino. Gráfico 12A expressão de FOXP3 relacionada ao polimorfismo -3279 C/T. Gráfico 12B expressão do FOXP3 relacionada ao polimorfismo -3499 G/T. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão. As diferenças significativas entre os grupos estudados estão demonstradas pelas barras e foram obtidas através do teste Mann Whitney. A abreviatura N.S significa genótipo não encontrado entre o grupo de indivíduos estudados.

**5.4.2- Análise da expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas e a presença ou ausência do alelo polimórfico T referente aos polimorfismos -3499 G/T e -3279 C/T.**

Para o polimorfismo -3279 C/T, os resultados demonstraram que os indivíduos do gênero feminino da forma clínica IND que possuem o alelo polimórfico T+ apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparados com os outros indivíduos portadores do mesmo alelo (p<0,05). De forma correspondente a análise do genótipo, a baixa frequência do alelo selvagem C (T-) na população estudada dificultou a análise de correlação entre a expressão e o polimorfismo -3279 C/T (FIGURA 13 A).

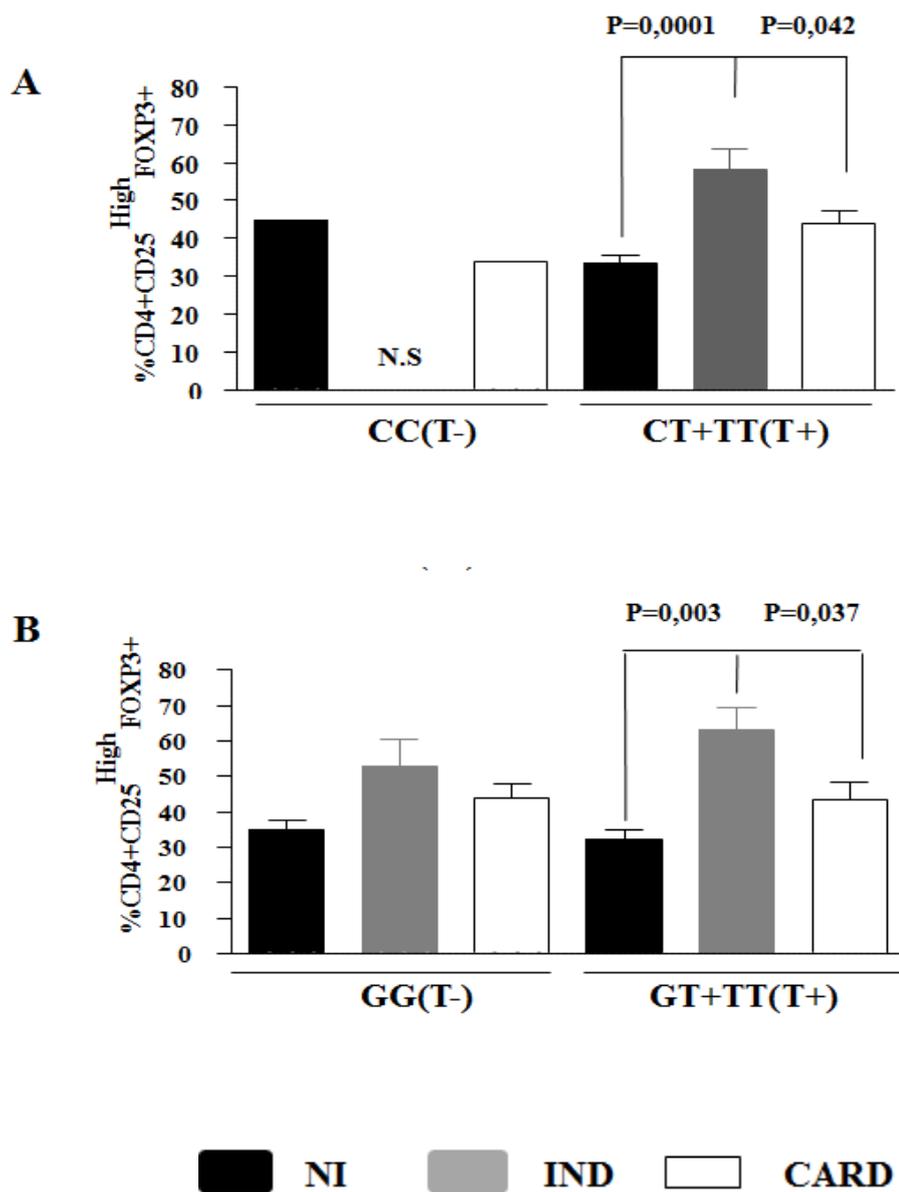
Os resultados relacionados à presença/ausência do alelo polimórfico para o polimorfismo -3499 G/T em pacientes do gênero feminino demonstraram que pacientes da forma clínica IND que apresentam o alelo polimórfico T+ apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado com os outros indivíduos portadores do mesmo alelo (p<0,05). De forma semelhante aos resultados observados nas análises de expressão e frequências genótípicas, demonstramos também, que os indivíduos IND do gênero feminino portadores do alelo polimórfico T (T+) apresentaram a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado aos portadores do alelo selvagem G (T-) (FIGURA 13 B).

Esses resultados podem sugerir que em indivíduos do gênero feminino, o alelo polimórfico T+ está relacionado a uma maior expressão de FOXP3. Além disso, o resultado confirma a relação entre o alelo polimórfico T+ com a forma clínica indeterminada da doença de Chagas, uma vez que, as mulheres dessa forma clínica, apresentam uma maior presença do alelo polimórfico e uma maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>.

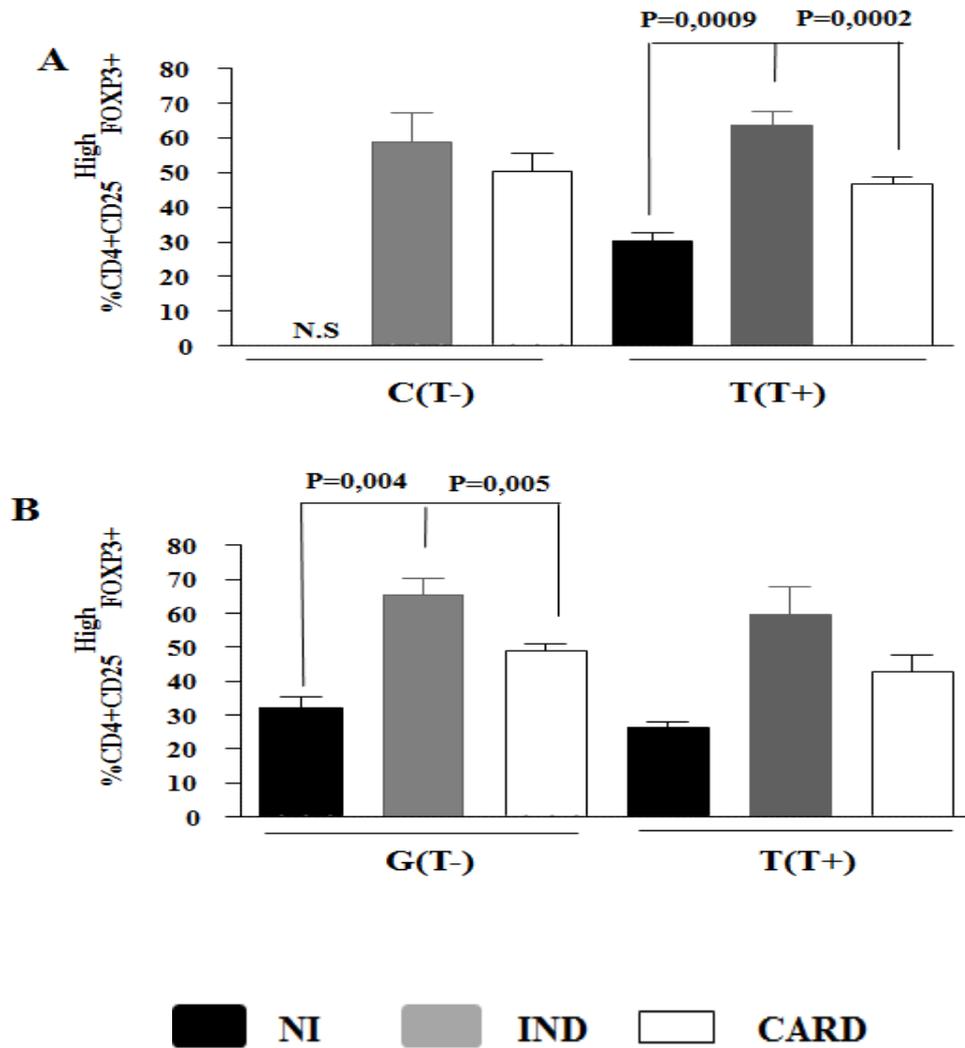
Os resultados relacionados aos indivíduos do gênero masculino demonstraram que para o polimorfismo -3279 C/T, os pacientes da forma clínica IND que possuem o alelo polimórfico T+ apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado com os outros indivíduos portadores do mesmo genótipo (p<0,05). Como descrito para a análise do genótipo a baixa frequência do

alelo selvagem C (T-) na população estudada dificultou a análise de correlação entre a expressão e o polimorfismo -3279 C/T (FIGURA 14 A).

A análise do polimorfismo -3499 G/T para o gênero masculino, mostrou que pacientes da forma clínica IND portadores do alelo selvagem G (T-) apresentam a maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparado com os outros indivíduos portadores do mesmo alelo (p<0,05). De forma interessante, observa-se que os indivíduos do sexo masculino apresentam um perfil de expressão da molécula FOXP3 relacionado ao alelo polimórfico de forma inversa daquele observado em indivíduos do gênero feminino. O alelo polimórfico T+ está associado a maior expressão de FOXP3 em mulheres, enquanto os homens que possuem este alelo possuem a menor expressão desse gene (FIGURA 14 B).



**FIGURA 13:** Análise entre a expressão de FOXP3 em células  $TC4^+CD25^{high}$  e a presença ou ausência do alelo polimórfico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero feminino . Gráfico 13A, expressão do FOXP3 relacionada à presença ou ausência do alelo polimórfico -3279 T. Gráfico 13B expressão do FOXP3 relacionada à presença ou ausência do alelo polimórfico -3499 T. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão. As diferenças significativas entre os grupos estudados estão demonstradas pelas barras e foram obtidas através do teste Mann Whitney. A abreviatura N.S significa alelo não encontrado entre o grupo de indivíduos estudados.



**FIGURA 14:** Análise entre a expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e a presença ou ausência do alelo polimórfico de indivíduos não infectados e portadores da doença de Chagas do gênero masculino . Gráfico 14A, expressão do FOXP3 relacionada à presença ou ausência do alelo polimórfico -3279 T. Gráfico 14B expressão do FOXP3 relacionada á presença ou ausência do alelo polimórfico -3499 T. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão. As diferenças significativas entre os grupos estudados estão demonstradas pelas barras e foram obtidas através do teste Mann Whitney. A abreviatura N.S significa alelo não encontrado entre o grupo de indivíduos estudados.

### 5.5-Análise multivariada por regressão logística

Para a verificação de associações entre os dados de polimorfismo, parâmetros clínicos e os dados fenotípicos foi utilizada a abordagem de análise multivariada por meio da regressão logística. Para esta análise, primeiramente, a variável dependente forma clínica foi codificada com os números 0, 1 e 2 para os indivíduos dos grupos NI, IND e CARD, respectivamente. Após essa etapa, codificamos as outras variáveis da seguinte forma:

-A variável parâmetros clínicos foi codificada através de seus valores de referência (LVDD 50 mm e FEVE 40%)

- A variável polimorfismo foi codificada através de valores numéricos para os genótipos e para os alelos. Foi atribuído o valor igual a 1 aos genótipos relacionados com a baixa expressão do FOXP3 (genótipos TT e CC), valor igual a 2 para os genótipos com potencial intermediário de expressão (GG e TT) e valor igual a 3 para os genótipos relacionados a alta expressão (GT e CT). Para os alelos também foram atribuídos valores relacionados à expressão do FOXP3 sendo que, para os homens os alelos G (polimorfismo -3499 G/T) e T (polimorfismo -3279) estão relacionados com uma maior expressão de FOXP3 e foram codificados com valores igual a 2.

Toda codificação utilizada está demonstrada na tabela 11.

**TABELA 11:** Valores atribuídos as variáveis de acordo com a gravidade da doença, fatores preditores de prognóstico, expressão de FOXP3 e relação do genótipo com o fenótipo (polimorfismos).

<b>Forma clínica</b>	<b>FEVE(%)</b>	<b>VED(mm)</b>	<b>Expressão de FOXP3%</b>	<b>rs 3761548</b>	<b>rs3761547</b>
<b>NI=0</b>	X<40=2	X>55=2	numérico	GT=3 <b>G=2*</b>	CT=3 <b>C=1*</b>
<b>IND=1</b>	X>40=1	X<55=1	numérico	GG=2 <b>T=1*</b>	CC=2 <b>T=2*</b>
<b>CARD=2</b>				TT=1	TT=1

\*os escritos em azul indicam as codificações relacionadas ao gênero masculino.

Os dados relacionados ao perfil genotípico, alélico e fenotípico dos indivíduos estudados foram primeiro agrupados como indivíduos controle (NI) e indivíduos

portadores da doença de Chagas (IND e CARD). Nessa primeira análise foi avaliado se a expressão de FOXP3 e os dados relacionados ao polimorfismo (dados genotípicos para mulheres e dados relacionados a presença ou ausência do alelo polimórfico para os homens) poderiam em conjunto estar associados com a evolução diferencial da doença de Chagas. Estes resultados encontram-se sumarizados nas tabelas 12 e 13. Em um segundo momento os dados foram agrupados como indivíduos portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND e CARD), sendo que os resultados se encontram nas tabelas 14 e 15. É importante salientar que para as análises das tabelas 14 e 15 os indivíduos NI não entraram no modelo analisado, pois os mesmos não possuem os dados preditores de prognóstico (LVDD e FEVE).

Os dados demonstram que quando associadas todas as variáveis não encontramos diferenças significativas entre os grupos estudados. Esses resultados podem sugerir que as variáveis utilizadas neste trabalho possuem uma relação individual com a evolução da doença de Chagas, pois foram encontradas várias diferenças estatísticas no modelo de análise univariado (dados de frequências genotípicas e alélicas, dados de expressão da proteína FOXP3).

**TABELA 12:** Análise de regressão logística em pacientes não infectados (NI) e portadores da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero feminino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo e expressão de FOXP3 como independentes.

<b>rs 3761548</b>	$p=0,070$
<b>rs 3762547</b>	$p=0,876$
<b>FOXP3%</b>	$p=0,096$
<b>MIF FOXP3</b>	$p=0,082$

**TABELA 13:** Análise de regressão logística em pacientes não infectados (NI) e portadores da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero masculino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo e expressão de FOXP3 como independentes.

<b>rs 3761548</b>	$p=0,346$
<b>rs 3762547</b>	$p=0,879$
<b>FOXP3%</b>	$p=0,357$
<b>MIF FOXP3</b>	$p=0,275$

**TABELA 14:** Análise de regressão logística em pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero feminino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo, expressão de FOXP3 e parâmetros clínicos como independentes.

<b>rs 3761548</b>	$p=0,074$
<b>rs 3762547</b>	$p=0,768$
<b>FOXP3%</b>	$p=0,169$
<b>MIF FOXP3</b>	$p=0,279$
<b>LVDD(mm)</b>	$p=0,998$
<b>FEVE%</b>	$p=0,997$

**TABELA 15:** Análise de regressão logística em pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND e CARD), do gênero masculino utilizando a variável forma clínica como dependente e as variáveis, polimorfismo, expressão de FOXP3 e parâmetros clínicos como independentes.

<b>rs 3761548</b>	$p=0,754$
<b>rs 3762547</b>	$p=0,828$
<b>FOXP3%</b>	$p=0,455$
<b>MIF FOXP3</b>	$p=0,982$
<b>LVDD(mm)</b>	$p=0,979$
<b>FEVE%</b>	$p=0,953$

## ***6.0-DISSCUSSÃO***

---

Entre os diversos aspectos intrigantes relacionados à doença de Chagas, sua evolução clínica diferencial em indivíduos cronicamente infectados assume, certamente, um papel de grande destaque. Enquanto a grande maioria dos pacientes na fase crônica não apresenta sintomas ou sinais clínicos da doença, cerca de 30% dos pacientes desenvolve alterações cardíacas, caracterizadas por lesões teciduais de intensidade variável no coração e são associadas à morbidade e mortalidade da doença. A existência de uma exacerbada resposta imunológica do hospedeiro aos antígenos do *T. cruzi* associada à perda de um processo regulatório podem influenciar de maneira decisiva na evolução clínica da doença de Chagas.

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

A resposta imune contra diferentes patógenos pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, porém esses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. Recentemente tem-se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante infecções virais crônicas, bacterianas e fúngicas (MILLS, 2004). A identificação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e seu papel tem sido objeto de intenso estudo devido ao papel crítico dessas células na manutenção da autotolerância, bem como na defesa contra patógenos. Vários marcadores tem sido estudados para melhor caracterizar as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, dentre eles estão CD62L, CTLA-4 e o fator repressor de transcrição FOXP3 (POWRIE, *et al.*, 1996, FONTENOT, *et al.*, 2003., JOSEFOWICZ, *et al.*, 2012).

A regulação da resposta imune por células T reguladoras *in vivo* é um processo complexo envolvendo múltiplos mecanismos de supressão. Alguns autores defendem a

hipótese de que as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suprimem células efetoras através do contato celular pela molécula CTLA-4 (READ, *et al.*, 2000; TAKAHASHI, *et al.*, 2000; MALOY & POWRIE, 2001; BATTAGLIA, *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos demonstram que o mecanismo de supressão das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> parece envolver a indução de apoptose de células efetoras (STRAUSS *et al.*, 2009; CZYSTOWSKA, *et al.*, 2010). Por outro lado, outros autores defendem a hipótese de que IL-10 e TGF-β também podem estar envolvidos no efeito supressor *in vivo* das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (HARA, *et al.*, 2001; LIU, *et al.*, 2003).

Apesar de não existirem evidências a respeito dos mecanismos supressores induzidos por essa população celular na doença de Chagas, nosso grupo demonstrou que pacientes com a forma clínica IND apresentam um aumento significativo no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> quando comparado aos indivíduos com a forma clínica CARD. Esses resultados sugerem que essas células podem estar envolvidas no controle da morbidade da doença de Chagas (DE ARAÚJO, *et al.*, 2007, 2009) bem como podem não ser suficientes para controlar o desenvolvimento do processo inflamatório ou podem estar suprimindo a resposta imune protetora contra o patógeno.

Uma vez que foi observado uma frequência diferencial de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> nos pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas e com o objetivo de compreender melhor os mecanismos imunorreguladores envolvidos no controle da miocardiopatia, nesse estudo avaliamos o perfil genotípico de FOXP3 em pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD. Dessa forma, verificamos se variações no gene FOXP3 poderia estar associada com expressão diferencial dessa molécula em células T reguladoras, com o intuito de que as mesmas possam atuar como elementos diferenciais durante o desenvolvimento das diferentes formas clínicas dessa doença.

Neste estudo não houve distinção entre grupos étnicos de acordo com variações morfológicas como cor da pele por exemplo. De acordo com PARRA e colaboradores (2003), tal divisão não convém à população brasileira dada a grande miscigenação, o que proporciona uma ampla sobreposição de genótipos entre dois grupos étnicos distintos como ‘brancos’ ou ‘negros’. Ainda segundo os mesmos autores, a população de Minas Gerais pode ser usada como boa representação em relação à população brasileira. Os pacientes estudados são provenientes, em sua maioria, do

interior de Minas Gerais sendo que os mesmos representam uma população pouco variável com relação ao fator naturalidade.

Várias são as estratégias utilizadas para se estudar as influências de um gene em uma determinada doença. Essas podem ser familiares ou estudos do tipo caso-controle. Os últimos necessitam de eleger um gene candidato. A escolha do gene candidato baseia-se em sua função biológica e em seu papel na patogênese da doença estudada. Estes dados são obtidos a partir de estudos experimentais em cromossomos homólogos ou pela semelhança com outras doenças (FLINT-GARCIA, *et al.*, 2003). Como FOXP3 é um importante marcador para as células T reguladoras, estudos envolvendo o polimorfismo deste gene podem ajudar a esclarecer o papel dessas células e seu envolvimento nos mecanismos de indução e controle das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Inicialmente, avaliou-se o princípio matemático de Hardy-Weinberg para os dois polimorfismos selecionados, rs 3761547 (-3279 C/T) e rs 3761548 (-3499 G/T). O equilíbrio de Hardy-Weinberg verifica se não existem fatores evolutivos atuando sobre uma população. Se fatores evolutivos não estiverem presentes, as frequências gênicas permaneceriam inalteradas e as proporções genotípicas atingiriam um equilíbrio estável, mostrando uma mesma relação constante entre si ao longo do tempo. Os pressupostos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg são que a população de estudo seja grande, com acasalamento aleatório, sem atuação da seleção, mutação, migração ou deriva genética (RIDLEY 2006, p133). Neste estudo, verificou-se que para os dois polimorfismos estudados apenas o polimorfismo rs 3761548 (-3499 G/T) se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (TABELA 4). O equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser influenciado pela prevalência de um determinado genótipo na população, se essa frequência for baixa, o genótipo menos prevalente pode ser não encontrado nos indivíduos estudados (RIDLEY 2006, p133). Como observado para o polimorfismo rs 3761547 (-3279 C/T) e de acordo com o NCBI ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> ) existe uma baixa frequência do genótipo homocigoto selvagem CC na população, sendo que não identificamos pacientes da forma clínica IND possuidores desse genótipo (TABELA 6). Portanto, se verifica que apesar dos dois polimorfismos estudados apresentarem associação, a baixa frequência do genótipo selvagem CC na população amostral pode ter influenciado no resultado encontrado, uma vez que esse mecanismo acontece em nossa população.

Outro importante fator relacionado à genética de populações e sua interferência na distribuição dos genótipos e alelos é a análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados. Esta análise pôde ser realizada, pois os dois polimorfismos estão presentes no mesmo cromossomo (cromossomo X). O desequilíbrio de ligação é a correlação entre polimorfismos, causada pela sua história compartilhada de mutação e recombinação. Inicialmente, o desequilíbrio de ligação está presente em uma população em uma taxa determinada pela distância genética entre os dois *loci* e o número de gerações desde que ele surgiu (FLINT-GARCIA, *et al.*, 2003).

Uma série de variáveis tem sido usadas para medir o desequilíbrio de ligação, sendo que todas têm como componente básico a diferença entre as frequências alélicas observada e esperada (FLINT GARCIA, *et al.*, 2003). As duas variáveis mais utilizadas para mensurar o desequilíbrio de ligação são  $r^2$  e  $D'$  (FLINT GARCIA, *et al.*, 2003). A estatística  $r^2$ , também descrita na literatura como  $D^2$ , é a correlação ao quadrado entre a presença e ausência de alelos em diferentes *loci* e a estatística  $D'$  corresponde ao coeficiente de correlação entre pares de loci. As variáveis  $r^2$  e  $D'$  refletem diferentes aspectos de desequilíbrio de ligação e apresentam comportamentos diversos em condições distintas. Muitos estudos que descrevem o desequilíbrio de ligação em uma determinada população estimam ambas as medidas ( $r^2$  e  $D'$ ), o que permite um julgamento imediato do desequilíbrio de ligação junto com a diferença das frequências alélicas. Nesse trabalho, utilizou-se a análise de desequilíbrio de ligação para verificar se os polimorfismos estudados possuíam alguma associação de variabilidade. Os resultados demonstraram que os loci -3279 C/T e -3499 G/T podem ser transmitidos em conjunto dentro da população estudada. Esses dados foram demonstrados através dos valores de  $D'=1$  (indica ausência de recombinação) e valores de  $r^2 = 0,04$  (indica que em 4% da população estudada, os polimorfismos foram transmitidos associados). É importante salientar que como descrito para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores  $r^2$  podem ser afetados pela baixa prevalência de um determinado genótipo na população. Sendo que esse fator pode ter influenciado os resultados, relacionado ao percentual da população em que os polimorfismos foram transmitidos de forma associada. O estudo de desequilíbrio de ligação para polimorfismos de base única pode ser uma estratégia utilizada para identificar genes de susceptibilidade a doenças complexas como a doença de Chagas. De acordo com os

resultados encontrados nesse trabalho é provável que os marcadores estudados forneçam em conjunto à mesma informação genética.

A importância do controle genético do hospedeiro na susceptibilidade ou resistência a doenças parasitárias demonstrou que o mesmo se aplica em situações de relação parasito-hospedeiro de grande complexidade (MARQUET, *et al.*, 1996; ALCAÏS, *et al.*, 1997; DESSEIN, *et al.*, 1999; RODRIGUES, *et al.*, 1999). Acreditando-se que a genética do hospedeiro possa ser um fator fundamental e diferencial no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, o estudo de associação das frequências genótípicas e alélicas dos dois loci polimórficos selecionados foi realizado.

Estudos anteriores relataram a presença do locus polimórfico -3279 C/T no gene FOXP3 e sua associação com distúrbios autoimunes (ZHANG, *et al.*, 2009; EASTELL, *et al.*, 2007). ZHANG e colaboradores (2009) demonstraram uma associação entre polimorfismos presentes no gene FOXP3 em população chinesa. A análise dos subgrupos estudados demonstrou uma significativa associação entre o polimorfismo rs 3761547 (-3279 C/T) e pacientes alérgicos. Já em trabalho desenvolvido por EASTELL (2007) com jovens portadores de artrite idiopática juvenil, não foram encontradas associações entre o polimorfismo -3279 C/T e os indivíduos doentes e controles.

O estudo em doença de Chagas realizado neste trabalho, não associou a presença desse polimorfismo a nenhuma das formas clínicas avaliadas para ambos os gêneros (TABELAS 6 e 7).

Em indivíduos do gênero feminino, a comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos (NI x IND x CARD) não apresentou resultados estatisticamente significativos. Foi observado que o genótipo homocigoto CC apresenta uma baixa frequência na população amostral e não foi encontrado em pacientes portadores da forma clínica IND (TABELA 6). Com relação aos estudos alélicos, foi observado que o alelo polimórfico -3279 T esteve presente na grande maioria da população estudada de uma forma semelhante entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Esses resultados estão de acordo com as frequências genótípicas e alélicas demonstradas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Ainda em indivíduos do gênero feminino, com relação à análise de funcionalidade desse polimorfismo, os resultados demonstraram que pacientes da forma clínica IND

que possuem o genótipo heterozigoto CT apresentam maior expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> quando comparados com os outros indivíduos estudados (FIGURA 12 A). É importante salientar, que apesar do genótipo CT em indivíduos portadores da forma clínica IND apresentar os maiores níveis de expressão do FOXP3, não foi possível associar a expressão da proteína apenas ao genótipo, pois o mesmo foi distribuído de uma forma homogênea entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (8% em pacientes IND e 9% em pacientes CARD).

Para indivíduos do gênero masculino, a análise de presença/ausência do alelo polimórfico T entre os três genótipos nos diferentes grupos (NI x IND x CARD) não apresentou resultados estatisticamente significativos. De forma semelhante aos indivíduos do gênero feminino, a grande maioria dos pacientes apresentou elevada presença do alelo polimórfico T+ (TT+CT) (TABELA 7). Já relacionado à análise de funcionalidade, os resultados demonstraram que os pacientes do gênero masculino portadores da forma clínica IND que possuem o alelo polimórfico T+ apresentam a maior de expressão de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (FIGURA 14 A). Entretanto, não foi possível associar o aumento na expressão da molécula FOXP3 apenas à presença do alelo polimórfico T, pois o mesmo foi distribuído de uma forma homogênea entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (89% em pacientes IND e 86% em pacientes CARD). Dessa forma, os indivíduos do gênero masculino portadores da forma clínica IND apresentaram as maiores frequências de expressão do FOXP3 de forma independente a presença/ausência do alelo polimórfico.

Outro polimorfismo presente no gene FOXP3 que já foi descrito na literatura como associado a doenças relacionadas com desvios na imunorregulação é o locus -3499 G/T. BOTEMMA e colaboradores (2009) realizaram um estudo comparando crianças caucasianas quanto à presença do polimorfismo e desenvolvimento de atopia a diferentes alérgenos. Foram encontrados diferentes resultados relacionados ao gênero dos indivíduos pesquisados. O polimorfismo -3499 G/T se mostrou associado com o desenvolvimento de sensibilização e alergia em meninas, enquanto o mesmo polimorfismo esteve associado com uma remissão de sensibilização a alérgenos em meninos. Segundo dados demonstrados por BASSUNNI (2003), esse polimorfismo está associado com o desenvolvimento de diabetes tipo 1 em mulheres e homens da população japonesa. De acordo com o mesmo estudo, o genótipo homozigoto polimórfico TT no locus polimórfico -3499 G/T está associado com uma diminuição

da expressão do FOXP3, devido a alterações da ligação desse gene a fatores importantes para a sua transcrição.

Em relação ao polimorfismo -3499 G/T, os resultados demonstraram que o genótipo heterozigoto GT é duas vezes mais predominante no grupo IND quando comparado ao grupo CARD, para o gênero feminino (TABELA 9). Observou-se também, que esse genótipo está associado com uma maior expressão do gene FOXP3 em células TCD4CD25<sup>high</sup> de pacientes portadores da forma clínica IND (FIGURA 12 B). Além disso, o grupo de pacientes CARD apresentou percentuais mais elevados do genótipo homozigoto selvagem GG que está associado a uma menor expressão do FOXP3 quando comparado a genótipo heterozigoto GT. Os resultados demonstraram, ainda, uma diferença estatística significativa relacionada à presença do alelo polimórfico T+ quando comparados os indivíduos do gênero feminino das formas clínicas IND e CARD. Esse alelo se mostrou fortemente associado com a forma clínica IND (TABELA 9) e indivíduos que o apresentam possuem 2,9 vezes mais chance de desenvolver essa forma clínica da doença de Chagas (TABELA 9). Com relação à análise de funcionalidade desse polimorfismo, os resultados demonstraram que pacientes da forma clínica IND que apresentam o alelo polimórfico T+ possuem uma maior expressão de FOXP3 em células TCD4+CD25<sup>high</sup> quando comparados aos outros grupos estudados (FIGURA 13 B). Esses resultados sugerem que a presença do alelo polimórfico T+ parece estar relacionada a um desenvolvimento diferencial da doença de Chagas em indivíduos do gênero feminino, e que esse alelo pode ser um dos fatores que levariam ao desenvolvimento de um papel protetor relacionado a não exacerbação da miocardiopatia chagásica.

Para indivíduos do gênero masculino, a análise de presença/ausência do alelo polimórfico T, relacionada ao polimorfismo -3499 G/T, entre os três genótipos nos diferentes grupos (NI x IND x CARD) não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Os resultados demonstraram que o alelo polimórfico se encontra bem distribuído entre os pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (TABELA 10). Quanto à análise de funcionalidade, os pacientes da forma clínica IND que apresentam o alelo selvagem G (T-) possuem uma expressão maior de FOXP3 em células TCD4+CD25<sup>high</sup>, quando comparados com os outros indivíduos que possuem o alelo polimórfico T+ (FIGURA 14 B). É importante salientar que os indivíduos do gênero masculino apresentam um padrão de expressão da molécula

FOXP3 de uma forma completamente diferente daquela observada em pacientes do gênero feminino. Enquanto, a presença do alelo polimórfico T+ está associada a uma maior expressão do FOXP3 em mulheres, este mesmo alelo está associado a uma menor expressão em homens (FIGURAS 13 B e 14 B). De forma interessante, diferenças estatísticas entre os grupos estudados foram encontradas apenas em indivíduos do gênero feminino e esse fator pode direcionar a ideia, de uma possível contribuição entre polimorfismos relacionados a cromossomos sexuais e a evolução diferencial da doença de Chagas relacionada ao gênero. É importante salientar que em estudos descritos na literatura as análises de polimorfismo no gene FOXP3 são agrupadas por gênero. As fêmeas carregam dois cromossomos X, sendo que um deles é silenciado aleatoriamente durante as fases da embriogênese. Esse processo de inativação resulta em uma diversidade celular feminina aonde metade das células de uma fêmea expressa genes derivados do cromossomo X da mãe e a outra metade do cromossomo X paterno. Dessa forma, mutações ou polimorfismos desvantajosos que ocorrem em um gene ligado ao cromossomo X poderão resultar em perda da proteína em todas as células de um homem, mas em apenas metade das células das mulheres. Esta desvantagem de sobrevivência pode ser demonstrada devido à existência de numerosas doenças ligadas ao cromossomo X, sendo que estas não afetam ou causam efeitos menos deletérios em mulheres (LIBERT, *et al.*, 2010).

Adicionalmente, pode-se verificar que polimorfismos em cromossomos sexuais possam influenciar o desenvolvimento de cardiopatias não associadas à doença de Chagas. De fato, estudos mostram que mulheres são menos susceptíveis a doenças cardíacas (MILLER, *et al.*, 2010) uma vez que polimorfismos em receptores para esteróides sexuais, seus ligantes e moléculas que podem influenciar no remodelamento cardíaco, dentre outros fatores, podem ser importantes para o controle de doenças cardiovasculares.

A expressão do gene FOXP3 é um importante fator para a diferenciação celular das células T reguladoras e é crítica para sua função supressora. Além disso, a expressão de FOXP3 sustentada em células TREG maduras é necessária para a manutenção do fenótipo regulador dessa célula (BATTAGLIA, *et al.*, 2002). A deleção de um alelo condicional para a expressão de FOXP3 resulta em perda de função supressora e de alguns marcadores de superfície característicos de células TREG. Em contrapartida, as TREG maduras que sofrem essa deleção adquirem

propriedades de células T efectoras e passam a produzir citocinas inflamatórias como IL-2, IL-4, IL-7 e IFN- $\gamma$  (JOSEFOVICV, *et al.*, 2011). De forma interessante, estudos mostram que não apenas a completa falta de FOXP3 leva ao desenvolvimento de resposta autoimune fatal, mas a redução dos níveis dessa molécula pode também conduzir ao mesmo fenótipo (CAMPBELL, *et al.*, 2007). Dados anteriores, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, através de estudos de cinética de expressão de FOXP3 por células TCD4+CD25<sup>high</sup>, demonstraram que pacientes apresentando a forma clínica IND mantêm a expressão de FOXP3 após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*, enquanto os pacientes do grupo CARD apresentam uma diminuição da na expressão dessa molécula após o quarto dia de cultura (DE ARAUJO, *et al.*, 2009). Além disso, para a verificação se a diminuição da expressão de FOXP3 poderia estar associada a outros mecanismos reguladores e se o padrão de citocinas apresentado por esses pacientes e indivíduos não infectados poderia estar associado à perda e /ou controle da expressão de FOXP3 foi avaliado a produção de citocinas reguladoras IL10 e TGF- $\beta$ . Os resultados demonstraram que pacientes IND apresentam uma alta produção de IL10 e TGF-  $\beta$ . Enquanto os pacientes CARD apresentam, além da diminuição na expressão de FOXP3 pelas células TREG, uma produção elevada de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (DE ARAUJO, *et al.*, 2012).

Baseado nestes dados e acreditando que a expressão de FOXP3 pode ser um fator diferencial em células TC4+CD25<sup>high</sup> nos indivíduos estudados, avaliou-se através da marcação *ex-vivo* a frequência da molécula FOXP3. É importante salientar que, nossas análises, de forma diferente daquelas realizadas em estudos anteriores agruparam os indivíduos estudados de acordo com o gênero. Corroborando com os dados demonstrados por DE ARAUJO (2009), nossos resultados nos permitem sugerir que a expressão de FOXP3 pode estar correlacionada com a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que indivíduos NI apresentam os menores níveis de expressão dessa molécula (FIGURA 8). Podemos observar, ainda, que os pacientes portadores da forma clínica IND apresentam os maiores níveis de expressão da molécula FOXP3 de forma independente de gênero (FIGURAS 8A, 8B e 8C). Os pacientes portadores da forma clínica CARD apresentam menores níveis de células TCD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3+ e esse resultado pode sugerir que o número de células TCD4+ ativadas está aumentado nestes indivíduos. Podemos sugerir também que esses pacientes expressam a molécula FOXP3, porém não conseguem manter essa expressão nas células T reguladoras, não

sendo suficiente para controlar o desenvolvimento do processo inflamatório, o que poderia levar a progressão da patologia para a forma clínica cardíaca. Para reforçar ainda mais a hipótese de que as células TREG e o gene FOXP3 podem ser considerados importantes fatores para o controle do desenvolvimento das formas clínicas graves da doença de Chagas, realizou-se análises de correlação entre a expressão de FOXP3 nas células TREG e fatores preditores de boa função cardíaca. Os resultados demonstraram que os pacientes portadores da forma clínica IND apresentam uma correlação positiva entre a expressão de FOXP3 por células TCD4+CD25<sup>high</sup> e o parâmetro clínico relacionado a melhor função cardíaca FEVE (FIGURA 9). Esses dados sugerem que essas células podem influenciar no controle da manutenção de uma melhor função cardíaca nestes pacientes, provavelmente modulando a resposta imune exacerbada induzida pelo *T. cruzi*. Para verificar se os dados relacionados ao perfil genotípico, fenotípico e dados clínicos, quando agrupados, interferem na evolução da doença de Chagas realizou-se a análise multivariada. Os resultados mostraram que apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas entre os diferentes grupos estudados (TABELAS 12, 13, 14 e 15), observa-se que em indivíduos do gênero feminino existe uma tendência das variáveis, polimorfismo rs3761548 (-3499 G/T), percentual de expressão do gene FOXP3 (% FOXP3) e intensidade média de expressão de FOXP3 (MIF FOXP3) estarem relacionadas com as formas clínicas IND (TABELAS 12 e 14). Esses resultados reforçam a hipótese de que exista um desenvolvimento diferencial da doença de Chagas relacionado ao gênero, uma vez que os resultados aproximados foram encontrados apenas em mulheres.

É importante destacar que o presente estudo é o primeiro a demonstrar uma associação significativa entre polimorfismos do gene FOXP3 em pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas. Além disso, é também o primeiro trabalho a associar os diferentes níveis de expressão do FOXP3 em células TREG com os genótipos apresentados por indivíduos chagásicos. Dessa forma, esperamos que este estudo possa ter dado a sua contribuição para uma melhor compreensão de marcadores relacionados à imunogenética do hospedeiro humano e sua importância para o desenvolvimento diferencial da doença de Chagas, contribuindo para um melhor entendimento de sua patofisiologia. A partir dos resultados encontrados, pode-se desenvolver um programa populacional utilizando os dados desenvolvidos para

determinar se FOXP3 têm validade epidemiológica como marcador de evolução da morbidade permitindo a identificação de pacientes que deverão ser acompanhados mais intensamente, que deverão receber tratamentos alternativos, se disponíveis, beneficiando assim aqueles que em etapas definidas deverão receber terapêutica específica.

Em resumo, os estudos de polimorfismos presentes no gene FOXP3, realizado em uma amostra da população brasileira, permitiram-nos chegar aos seguintes resultados:

\*Os polimorfismos -3279 C/T e -3499 G/T, estão associados e podem ser transmitidos de forma conjunta em indivíduos portadores da doença de Chagas;

\*O polimorfismo -3279 C/T não está associado ao desenvolvimento diferencial da doença de Chagas na população estudada;

\*Em pacientes do gênero feminino o polimorfismo -3499 G/T está associado com a doença de Chagas. A frequência do genótipo heterozigoto (GT) e a presença do alelo polimórfico (alelo T+) parecem estar relacionadas a uma função protetora e ao desenvolvimento da forma clínica IND;

\*Em pacientes do gênero masculino o polimorfismo -3499 G/T não está associado com a doença de Chagas em nossa população de estudo;

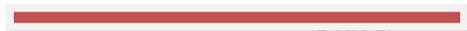
\*Em pacientes do gênero feminino portadores da forma clínica IND, o genótipo heterozigoto (GT) e a presença do alelo polimórfico (alelo T+), do polimorfismo -3499 G/T estão relacionados a um aumento da expressão do FOXP3 em células TREG;

\*Em pacientes do gênero masculino, o polimorfismo -3499 G/T não está relacionado a um aumento da expressão do FOXP3 em células TREG, uma vez que os alelos foram distribuídos de forma semelhante entre indivíduos IND e CARD;

\*A expressão da molécula FOXP3 em células TREG é maior em indivíduos portadores da forma clínica IND em ambos os gêneros;

\*A expressão fenotípica da molécula FOXP3 em células TREG está diretamente relacionada com melhor função cardíaca em pacientes portadores da doença de Chagas.

## ***7.0- CONCLUSÃO***



Os resultados adquiridos com este trabalho mostram que os dois polimorfismos presentes no gene FOXP3 estudados estão em desequilíbrio de ligação e, portanto podem ser transmitidos associados durante as gerações. O polimorfismo -3499 G/T pode ser um importante marcador de prognóstico, pois está associado ao desenvolvimento diferencial da doença de Chagas e, além disso, a expressão do FOXP3 em células TCD4+CD25<sup>high</sup> pode ser influenciada pelas frequências genótípicas e alélicas em indivíduos do gênero feminino. Verificamos, ainda, que a expressão do gene FOXP3 em células TCD4+CD25<sup>high</sup> é maior nos indivíduos portadores da forma clínica IND e está associada com a melhora da função cardíaca em ambos os gêneros, sugerindo que essas células podem influenciar no controle da manutenção de uma melhor função cardíaca nestes pacientes, provavelmente modulando a resposta imune exacerbada induzida pelo *T. cruzi* através da imunomodulação do ambiente de citocinas e/ou matando células efetoras e, conseqüentemente, controlando a morbidade.

## ***8.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ALCAÏS A, ABEL L, DAVID C, TORREZ ME, FLANDRE P, DEDET JP. Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population. *Am J Hum Genet.* 1997 Oct;61(4):968-79.

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

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

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

BAECHER-ALLAN C, BROWN J.A, FREEMAN G.J, HAFLER DA. CD4+CD25+high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167:1245-1253, 2001.

BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Inhibition of human CD4+CD25+high regulatory T cell function. *J. Immunol.* 169:6210-6217, 2002.

BARRETO JC. Chagas' disease. *Br J Anaesth.* 1979 Dec;51(12):1189.

BASSUNY WM, IHARA K, SASAKI Y, KUROMARU R, KOHNO H, MATSUURA N, HARA T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics.* 2003 Jun;55(3):149-56.

BATTAGLIA M, BLAZAR BR, RONCAROLO MG. The puzzling world of murine T regulatory cells. *Microbes and Infection.* 4:559-566, 2002.

BERIOU G, COSTANTINO CM, ASHLEY CW, YANG L, KUCHROO VK, BAECHER-ALLAN C, HAFLER DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood Journal*. 113:4240-4249, 2009.

BJORNVOLD M, AMUNDSEN SS, STENE LC, JONER G, DAHL- JORGENSEN K, NJOLSTAD PR, EK J, ASCHER H, GUDJONSDOTTIR AH, LIE BA, KINNINGSRUD B, AKSELSEN HE, RONNINGEN KS, SOLLID LM, UNDLIEN DE. FOXP3 polymorphisms in type 1 diabetes and celiac disease. *J Autoimmun*. 27,140-144.2006.

BOTTEMA RW, KERKHOF M, REIJMERINK NE, KOPPELMAN GH, THUIS C, STELMA FF, SMIT HA, BRUNEKREEF B, VAN SCHAYCK CP, POSTMA DS. X-chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts. *Allergy*. 2010 Jul;65(7):865-74.

BRADBURY J. Ancient footsteps in our genes: evolution and human disease. Gene variants selected during evolution may underlie many common diseases. *Lancet*. 2004 Mar 20;363 (9413):952-3.

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

CALZADA JE, BERAÚN Y, GONZÁLEZ CI, MARTÍN J. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine*. 2009 Mar;45(3):149-53.

CALZADA JE, NIETO A, BERAÚN Y, MARTÍN J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 2001 Sep;58(3):154-8.

CAMPBELL D & ZIEGLER SF. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 7:305-310. 2007.

COSTA GC, DA COSTA ROCHA MO, MOREIRA PR, MENEZES CA, SILVA MR, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2009 Feb 1;199(3):451-4.

COURA JR, DIAS JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.

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

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

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

DE ARAÚJO FF, CORREA-OLIVEIRA R, ROCHA MO, CHAVES AT, FIUZA JA, FARES RC, FERREIRA KS, KESSEN ST, SILVA GOMES JA. FOXP3<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> Regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 2012 (artigo aceito para publicação)

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

DE ARAUJO FF, GOMES JA, ROCHA MO, WILLIAMS-BLANGERO S, PINHEIRO VM, MORATO MJ, CORREA-OLIVEIRA R. Potential role of

CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 2007 May 1;12:2797-806.

DE ARAÚJO FF, VITELLI-AVELAR DM, TEIXEIRA-CARVALHO A, ANTAS PR, ASSIS SILVA GOMES J, SATHLER-AVELAR R, OTÁVIO COSTA ROCHA M, ELÓI-SANTOS SM, PINHO RT, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e992.

DE NARDIN E. Genetic polymorphisms and immune responses. *Immunol Invest.* 2009;38(3-4):198-202.

DE REZENDE JM. Chagas' disease of the gastrointestinal tract: megaesophagus, megacolon and denervation. *Med Monatsschr.* 1969 Aug; 23(8):344-50. German.

DESSEIN AJ, HILLAIRE D, ELWALI NE, MARQUET S, MOHAMED-ALI Q, MIRGHANI A, HENRI S, ABDELHAMEED AA, SAEED OK, MAGZOUB MM, ABEL L. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *Am J Hum Genet.* 1999 Sep;65(3):709-21.

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

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

DIAS JC. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:11-8.

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

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

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

EASTELL T; BSPAR STUDY GROUP, HINKS A, THOMSON W. SNPs in the FOXP3 gene region show no association with Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Caucasian population. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Aug;46(8):1263-5

FERREIRA RC, IANNI BM, ABEL LC, BUCK P, MADY C, KALIL J, CUNHANE NETO E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Apr; 98(3):407-11. Epub 2003 Jul 18.

FLINT-GARCIA SA, THORNSBERRY JM, BUCKLER ES. 4th. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:357-74.

FLÓREZ O, ZAFRA G, MORILLO C, MARTÍN J, GONZÁLEZ CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol.* 2006 Sep;67(9):741-8.

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

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

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

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

GUEDES, PMM, GUTIERREZ FRS, MAIA FL, MILANEZI CM, SILVA GK, PAVANELLI WR, SILVA JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 4: 1-11, 2010.

GUTIERREZ FRS, GUEDES PMM, GAZZINELLI RT, SILVA JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology.* 31: 673-685, 2009.

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

HORI S. and SAKAGUCHI S. FOXP3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* Jul;6(8):745-51, 2004.

HUAN J, CULBERTSON N, SPENCER L, BARTHOLOMEW R, BURROWS GG, CHOU YK, BOURDETTE D, ZIEGLER SF, OFFNER H, VANDENBARK AA. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005 Jul 1;81(1):45-52.

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

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

KROEGER KM, STEER JH, JOYCE DA, ABRAHAM LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine.* 2000 Feb;12(2):110-9.

LIBERT C, DEJAGER L, PINHEIRO I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol.* 2010 Aug;10(8):594-604.

LIU H, HU B, XU D, LIEW FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta and CTLA-4. *J. Immunol.* 171:5012-5017, 2003.

LIU H, HU B, XU D, LIEW FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- $\beta$  and CTLA-4. *J. Immunol.* 171:5012-5017, 2003

LOIZOU L, ANDERSEN KG, BETZ AG. Foxp3 interacts with c-Rel to mediate NF-Kb repression. *PLoS One.* 2011 Apr 7;6(4):e18670.

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

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

MARQUET, S. et al. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nat. Genet., New York,* v. 14, n. 2, p.181-184, 1996.

MÄURER M, LOSERTH S, KOLB-MÄURER A, PONATH A, WIESE S, KRUSE N, RIECKMANN P. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics.* 2002 Apr;54(1):1-8.

MILLER S, DYKES D, POLESKY H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res.* 1988;16:1215–1215.

MILLER VM. Sex-based differences in vascular function. *Womens Health (Lond Engl).* 2010 Sep;6(5):737-52.

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

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

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):177-82.

POWRIE F, CARLINO J, LEACH MW, MAUZE S, COFFMAN RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1996 Jun 1;183(6):2669-74.

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

RIDLEY, 2006. *Evolução.* Porto Alegre, 3 ed., Artmed, 2006.

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

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

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

RODRÍGUEZ-PÉREZ JM, CRUZ-ROBLES D, HERNÁNDEZ-PACHECO G, PÉREZ-HERNÁNDEZ N, MURGUÍA LE, GRANADOS J, REYES PA, VARGAS-LARCÓN G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett.* 2005 Apr 15;98(1):97-102.

ROMANA C. The developmental cycle of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas 1909. in its tissular and hematic phases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1956 Jun;54(1):255-69.

SANCHEZ E, RUEDA B, OROZCO G, OLIVER J, VILCHEZ JR, PACO L, LOPEZ-NEVOT MA, CALLEJA JL, SABIO JJM, GOMEZ-GARCIA M, NIETO A, DELGADO M, MARTIN, J. Analysis of GT microsatellite in the promoter of the FOXP3 / scurfing gene in autoimmune diseases. Hum. Immunol. 66, 869- 873.2005.

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

SATHLER-AVELAR R, VITELLI-AVELAR DM, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:246-51.

SCHMUNIS GA, YADON ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2010 Jul-Aug;115(1-2):14-21. Epub 2009 Nov 20.

SCHMUNIS GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85. Erratum in: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Dec;102(8):2 p following 1009.

SHEN Z, CHEN L, HAO F, WANG G, LIU Y. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of *Foxp3* in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. J Cell Mol Med. 2010 Jan;14 (1-2):226-41. Retraction in: J Cell Mol Med.2010 Jan;14(1-2):226.

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

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

STRAUSS L, BERGMANN C, WHITESIDE TL. Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol*. Feb; 182(3):1469-1480, 2009.

STRZEPA, A. & SZCZEPANIK, M. IL-17 expressing cells as a potential therapeutic target for treatment of immunological disorders. *Pharmacological Reports*. Jan-Feb; 63(1): 30-44, 2011.

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

TANOWITZ HB, MACHADO FS, JELICKS LA, SHIRANI J, DE CARVALHO AC, SPRAY DC, FACTOR SM, KIRCHHOFF LV, WEISS LM. Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 May-Jun;51(6):524-39.

TEIXEIRA PC, IWAI LK, KURAMOTO AC, HONORATO R, FIORELLI A, STOLF N, KALIL J, CUNHA-NETO E. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Dec;39(12):1549-62.

TORGERSON TR, GENIN A, CHEN C, ZHANG M, ZHOU B, AÑOVER-SOMBKE S, FRANK MB, DOZMOROV I, OCHELTREE E, KULMALA P, CENTOLA M, OCHS HD, WELLS AD, CRON RQ. FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):907-15.

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

VAN DER VLIET HJ, NIEUWENHUIS EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:89017.

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

VITELLI-AVELAR DM, SATHLER-AVELAR R, DIAS JC, PASCOAL VP, TEIXEIRA-CARVALHO A, LAGE PS, ELOI-SANTOS SM, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO AO. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62(3):297-308. 2005.

VOO KS, WANG YH, SANTORI FR, BOGGIANO C, ARIMA K, BOVER L, HANABUCHI S, KHALIL J, MARINOVA E, ZHENG B, LITTMAN D, LIU Y.J. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *PNAS.* 106:4793-4798, 2009.

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

XIAO Y, LI B, ZHOU Z, HANCOCK WW, ZHANG H, GREENE MI. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Curr Opin Immunol.* 2010 Oct;22(5):583-91.

ZAFRA G, MORILLO C, MARTÍN J, GONZÁLEZ A, GONZÁLEZ CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1049-52.

ZHANG L, ZHANG Y, DESROSIERS M, WANG C, ZHAO Y, HAN D. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Hum Immunol.* 2009 Nov;70(11):930-4.

ZHAO H, PFEIFFER R, GAIL MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*. 2003 Mar;4(2):171-8.

## ***9.0- ANEXO I: PRODUÇÃO CIENTÍFICA***



**Apresentação de trabalhos em congressos:**

*"FOXP3 GENE POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE". **FERREIRA,KS**; DAMASIO, MPS; ROCHA, MOC; ALVES ,JFCS; SOUZA,NSH; KEESEN,JSL; FARES,RCG; CHAVES,AT; DE ARAÚJO,FF; FIUZA, JA; SOUZA,GR; VALENTE,VAA; ARAÚJO,AD; MEDEIROS,NI; DUTRA,WO; CORREA-OLIVEIRA,R; GOMES, JAS. XXXVI brazilian congress of immunology, held on October 15th - 19th 2011, in Foz do Iguaçu-PR, Brazil. Apresentação em formato de pôster.*

*"FOXP3 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE". **FERREIRA,KS**; DAMASIO MPS; ROCHA, MOC; ALVES ,JFCS; SOUZA,NSH; KEESEN,JSL; FARES,RCG;CHAVES,AT; DE ARAÚJO,FF; FIUZA, JA; SOUZA,GR; VALENTE,VAA; ARAÚJO,AD; MEDEIROS,NI; DUTRA,WO; CORREA-OLIVEIRA,R; GOMES, JAS.27<sup>a</sup> Reunião de pesquisa aplicada em Doença de Chagas,15<sup>a</sup> Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 26-28 Outubro 2011, Uberaba MG. Apresentação em formato de pôster.*

*"FOXP3 GENE POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE". **FERREIRA,KS**; DAMASIO MPS; ROCHA, MOC; ALVES ,JFCS; SOUZA,NSH; KEESEN,JSL; FARES,RCG;CHAVES,AT; DE ARAÚJO,FF; FIUZA, JA; SOUZA,GR; VALENTE,VAA; ARAÚJO,AD; MEDEIROS,NI; DUTRA,WO; CORREA-OLIVEIRA,R; GOMES, JAS. IV Simpósio de Biologia Celular (2011). Apresentação em formato de pôster.*

### Artigos publicados

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

-GOMES, JAS; CAMPI-AZEVEDO, AC; TEIXEIRA CARVALHO, A; SILVEIRA-LEMOS, D; VITELLI-AVELAR, DM ; AVELAR, RS ; PERUHYPE-MAGALHÃES,V; **SILVESTRE, K. F**; BATISTA, MA; SCHACHNIK, N; CORREA-OLIVEIRA, R.; SANTOS, SE; MARTINS FILHO, OA. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicit an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from indeterminate clinical form of Chagas disease. **Immunobiology**, 2012.

### Artigos aceitos para publicação

-DE ARAÚJO, FF, CORREA-OLIVEIRA, R, ROCHA, MO, CHAVES, AT, FIUZA, JA, FARES, RC, **FERREIRA, KS**, KESSEN, ST, SILVA, GOMES JA. FOXP3+ CD25<sup>high</sup> CD4+ Regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**. 2012

-KEESEN, SL; GOMES, JS; FARES, CG; DE ARAUJO, FF; **FERREIRA, KS**; CHAVES, NA; ROCHA, OC; CORREA-OLIVEIRA, R. Characterization of cd4+ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by trypanossoma cruzi infection. **Scandinavian journal of Immunology**.2012

