

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Respostas Imunes, Primária e Secundária, de  
Células Mononucleares do Sangue Periférico, *in vitro*, de Indivíduos Não Infectados e de Pacientes  
com Doença de Chagas, estimuladas com  
Antígenos de *Trypanosoma cruzi*.

**Vladimir Martins Pinheiro**

Belo Horizonte

2007

**Vladimir Martins Pinheiro**

**Respostas Imunes Primária e Secundária de Células Mononucleares do Sangue Periférico, *in vitro*, de Indivíduos Não Infectados e de Pacientes com Doença de Chagas, estimuladas com Antígenos de *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde (área de concentração em Infectologia e Medicina Tropical).

**ORIENTADOR: Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha**

**CO-ORIENTADORES: Dra. Maria José Ferreira Morato**

**Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira**

Belo Horizonte

2007

Pinheiro, Vladimir Martins

P654r Respostas imunes primária e secundária de células mononucleares do sangue periférico, in vitro, de indivíduos não infectados e de pacientes com doença de Chagas, estimuladas com antígenos de Trypanosoma cruzi/Vladimir Martins Pinheiro. Belo Horizonte, 2007. viii,86 f., il.

Dissertação. (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.

Área de concentração: Medicina Tropical - Infectologia

Orientador: Manoel Otávio da Costa Rocha

Co-orientadores: Maria José Ferreira Morato, Rodrigo Corrêa-Oliveira

1.Doença de Chagas/imunologia 2.Linfócitos T CD4-positivos/imunologia 3.Linfócitos T CD8-positivos/imunologia 4.Homeostase 5.Sistema imune/parasitologia 6.In vitro 7.Trypanosoma cruzi/imunologia  
I.título

NLM: WC 705  
CDU: 616.937.3

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor**

Ronaldo Tadeu Pena

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Jaime Arturo Ramirez

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Carlos Alberto Pereira Tavares

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Francisco José Penna

### **Chefe do Departamento de clínica médica**

Prof. Dirceu Bartolomeu Greco

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.**

### **Coordenador**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

### **Sub-Coordenador**

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Junior

### **Colegiado**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (Representante Discente)

Este trabalho foi realizado no Ambulatório de doença de Chagas do Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitária Orestes Diniz – CTR-DIP do Hospital das Clínicas, Belo Horizonte, Minas Gerais em colaboração com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz – CPqRR/FIOCRUZ.

Auxílios financeiros:

Conselho de Aperfeiçoamento de Ensino Superior – CAPES;  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Vários foram os obstáculos os quais acredito, consegui vencer. Alguns foram vencidos mais facilmente outros nem tanto, entretanto, chegamos ao final de um trabalho o qual me dediquei com afinco. Porém a elaboração e conclusão deste, não seriam possíveis se não fossem as pessoas que em algum momento surgiram em meu caminho e colaboraram de alguma maneira. Pessoas essas que me ensinaram muito. Aprendi que de todas as situações sempre se é possível obter resultados positivos. A todos vocês o meu muito obrigado. Espero ter atingido as expectativas de todos. Nos agradecimentos, aos grupos/equipes, usarei ordem alfabética, pois todos tiveram grande relevância no curso deste trabalho.

Agradeço;

Aos pacientes e doadores que voluntariamente participaram deste trabalho demonstrando confiança nas propostas do mesmo.

Ao Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha pela confiança, incentivo e oportunidade que me foi oferecida junto a Faculdade de Medicina - UFMG. E pelos momentos em que caminhamos juntos nas proximidades da Faculdade de Medicina, conversando sobre ciências e trivialidades.

A Dra. Maria José Ferreira Morato, pela dedicação, atenção e ajuda tanto no desenvolvimento deste trabalho como em questões pessoais. E pelos momentos em que ficamos até altas horas discutindo imunologia. Espero poder matar saudade dos almoços. Bá obrigado.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira pela confiança, incentivo e oportunidade que me foi oferecida junto ao laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM – CPqRR/FIOCRUZ). E por ter disponibilizado um local onde pude descansar durante os experimentos que iam até de madrugada.

Aos membros do grupo doença de Chagas pela ajuda durante a execução do trabalho e pelas discussões que engrandeceram o mesmo: Ana Thereza Chaves, Andréia Maria Molica, Fernanda Fortes Araújo, Glenda Meira Cardoso, Jacqueline Fiúza, Juliana de Assis Silva Gomes, Maria José Ferreira Morato, Rafaelle Christine Gomes Fares.

Ao Dr. Giovanni Gazzinelli pela confiança, quando me apresentou ao Centro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina - UFMG.

A Dra. Juliana de Assis pela colaboração.

Ao Dr. Ricardo Toshio Fujiwara pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Stefan Geiger pelo auxílio nos textos em inglês.

A Dr. Iramaya Rodrigues Calda pelo esclarecimento de dúvidas e empréstimo de livros.

Ao Dr. Flávio da Fonseca pela oportunidade da participação em um de seus projetos.

Ao Germano, (laboratório de morfologia - ICB/UFMG) pelas sugestões.

A Clari Gandra pela atenção e carinho.

A equipe de apoio técnico do LICM – CPqRR, Daniela Peralva, Lorena Júnia, pelo auxílio durante os experimentos e em especial à Ana Beatriz (Tiza) pelo auxílio no citômetro de fluxo e à Luciana Lisboa, pelo auxílio durante a execução do CBA. E aos demais membros do LICM – CPqRR: Dr. Alexandre Reis, Ana Pacheco, Andréia Rizzia, Anne Jardim, Denise Lemos, Diana Bahia, Eliane, Guilherme, Dr. Jeffrey Bethonny, Paula, Pedro, Renata Diniz, Roberta Prado, Rodolfo Guiunchetti, Simone Mansur,

A equipe do Centro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina - UFMG, em especial à Egler, Hélen, Marcos e Renata. E aos colegas da pós-graduação.

Ao Dr. Olindo e a equipe do laboratório de doença de Chagas - CPqRR/FIOCRUZ, pelo auxílio no cultivo do EPI.

As pessoas que muitas vezes me emprestaram seus ouvidos: Ana Carolina Campi, Dra. Ana Cristina Botelho, Dra. Andréia Teixeira, Haroldo Dutra, Luanda Liboreiro, Luciana Maria, Luciana Pinto, Poliana.

Aos meus familiares e amigos os quais compreenderam minha ausência.

As instituições:

Faculdade de Medicina da UFMG (Programa de Pós Graduação: Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical)

Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ (Laboratório de Imunologia Celular e Molecular).

As agências financiadoras: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

Com intuito de homenagear meus professores/orientadores Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, Dra. Maria José Ferreira Morato e Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira, os quais se tornam eternos em mim, cito Rubem Alves;

*“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre (...).”*

Agradeço a Deus por ter colocado todas estas pessoas em meu caminho.

Dedico este trabalho a minha família que nos momentos de cansaço me motivaram. Minha mãe Cacilda Louro Pinheiro, meu pai (*in memoriam*) Milton Martins Pinheiro Filho, meu sobrinho-afilhado Lucas Louro, e as minhas irmãs Cristina e Izabela.

Dedico também a minha noiva Flávia que, como uma grande companheira soube compreender minha ausência, além de, me oferecer colo quando precisei. Lindíssima, muito obrigado por todos os momentos.



*“Fazer bem um trabalho, de uma perspectiva filosófica, não significa necessariamente fazê-lo com perfeição ou melhor do que qualquer outra pessoa. Não há nenhum significado moral em vencer ou perder uma corrida. O vencedor pode ser o corredor mais rápido, mas isso não tem nada a ver com o fato de ele ser uma boa pessoa. O valor está em trabalhar com afinco e fazer o melhor possível (...).”*

*Lou Marinoff*

**Sumário**

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
ABSTRAT	VIII
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Caracterização das formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas	4
1.2 – Aspectos imunes da doença de Chagas.	7
1.2.1 – Mediadores envolvidos da doença de Chagas	8
1.2.2 – Expressão de moléculas acessórias em Linfócitos T ativados	10
2 – OBJETIVOS	13
2.1 – Objetivo geral.	13
2.2 – Objetivos específicos.	13
3 – POPULAÇÃO ESTUDADA.	14
3.1 – Caracterização da população estudada	14
3.1.1 – Critérios de inclusão	14
3.1.2 – Critérios de exclusão	15
3.1.3 – Grupos de estudo	16
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.	17
4.1 – Obtenção do homogenato antigênico derivado das formas epimastigotas (EPI) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4.2 – Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	17
4.3 – Cultura de células mononucleares do sangue periférico	18
4.4 – Avaliação da cinética de expressão das moléculas acessórias na superfície dos linfócitos T	18
4.5 – Obtenção de sobrenadante de culturas para identificação das citocinas	22
4.5.1 – Quantificação dos níveis de citocinas secretadas no sobrenadante	22

---

4.6 – Quantificação dos níveis de prostaglandinas E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) secretadas, no sobrenadante, durante as culturas das células.	25
4.7 – Análise estatística dos dados	26
5 – RESULTADOS	27
5.1 – Cinética da produção de prostaglandina-E2 (PGE <sub>2</sub> ) por PBMC de indivíduos do grupo NI e pacientes dos grupos IND e CARD.	27
5.2 – Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por PBMC de indivíduos do grupo NI.	29
5.2.1 – Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos do grupo NI.	31
5.3 – Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por PBMC de pacientes do grupo IND.	34
5.3.1 – Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de pacientes do grupo IND	36
5.4 – Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por PBMC de pacientes do grupo CARD.	39
5.4.1 – Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de pacientes do grupo CARD.	41
5.5 – Moléculas produzidas na ausência de estímulo (RPMI) ou na presença de EPI	44
5.5.1 – Produção de PGE <sub>2</sub> na presença e ausência de estímulo antigênico.	44
5.5.2 – Produção de Citocinas IL-2, IL-10 e IFN na presença e ausência de estímulo antigênico.	46
5.6 – IMF da expressão dos fenótipos CD28, CD25 e CTLA-4 em LTCD4 <sup>+</sup> e LTCD8 <sup>+</sup> .	50
5.7 – Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD.	57
5.7.1 – IMF das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em LT CD4 <sup>+</sup> ou LT CD8 <sup>+</sup> .	57
5.7.2 – Produção de PGE <sub>2</sub> e secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ .	62
6 – DISCUSSÃO.	65
7 – CONCLUSÃO.	71
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	72
9 – ANEXO.	85

9 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

86

**Lista de Abreviaturas**

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CAMs	Moléculas de Adesão celular
CARD	Forma crônica Cardíaca grau V
Célula NK	Célula Natural Killer
CMblast	Meio de cultura celular modificado
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CTLA-4	Antígeno Intracelular-4 Associado ao Linfócito Citolítico
DIG	Forma crônica Digestiva
ECG	Eletrocardiograma
EP (1, 2, 3, 4)	Receptores de membrana da prostaglandina E2
EPI	Homogenato antigênico da forma epimastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> .
FACS	Separador de Células por Fluorescência ativada
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FL 1	Fluorescência do tipo 1
FL 2	Fluorescência do tipo 2
FL 3	Fluorescência do tipo 3
FoxP3	Fator de Transcrição P3
FSC	Tamanho
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IA	Imunidade Adaptativa
IFN $\gamma$	Interferon gama
II	Imunidade Inata
IL-	Interleucinas
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
IND	Forma crônica Indeterminada
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
LTreg	Linfócito T Regulador
MEM	Meio de Cultura Essencial
MFF	Solução fixadora: Max FACS Fix.
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NI	Indivíduo Não - Infectado

PBS	Solução Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofílica Peridinina
PFR	Proteína Paraflagelar do <i>Trypanosoma cruzi</i>
PG	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RNAM	Ácido Ribonucléico mensageiro
RPMI	Meio de Cultura Celular - 1640
SI	Sistema Imune
SSS	Granulosidade
STAT-5	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição tipo 5
TCR	Receptor de Célula T
TGFβ	Fator de Crescimento de Fibroblastos
Th1	Células CD4 <sup>+</sup> produtoras de citocinas do tipo Th1
Th2	Células CD4 <sup>+</sup> produtoras de citocinas do tipo Th2
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa

**LISTA DE FIGURAS GRÁFICAS.**

- FIGURA I** - Análise de linfócitos do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígenos EPI. 22
- FIGURA II** - Análise quantitativa de citocinas de sobrenadantes de cultura utilizado pelo BD CBA Analyses Software. 25
- FIGURA 1** - Análise das cinéticas de produção de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas).CMSP de indivíduos dos grupos NI, IND e CARD. 29
- FIGURA 2** - Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ , nos sobrenadantes das culturas, na presença de RPMI ou EPI nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas). CMSP de indivíduos NI pelo *Trypanosoma cruzi*. 31
- FIGURA 3** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, na presença de RPMI ou EPI, de indivíduos NI pelo *T. cruzi*, nos diferentes tempos (0, 2, 6, 12 e 24 horas). 33
- FIGURA 4** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, na presença de RPMI ou EPI, de indivíduos NI pelo *T. cruzi*, nos diferentes tempos (0, 2, 6, 12 e 24 horas). 34
- FIGURA 5** - Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ , nos sobrenadantes das culturas, na presença de RPMI ou EPI nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas). CMSP obtidas de pacientes com a forma clínica IND. 36
- FIGURA 6** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, na presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica IND, nos diferentes tempos (0, 2, 6, 12 e 24 horas). 38
- FIGURA 7** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtidas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica IND nos diferentes tempos (0, 2, 6, 12 e 24 horas). 39
- FIGURA 8** - Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ , nos sobrenadantes das culturas na presença de RPMI ou EPI nos diferentes tempos de cultura (2, 6, 12 e 24 horas), por CMSP obtidas de pacientes com a forma clínica CARD. 41
- FIGURA 9** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> obtidas de CMSP, na 43

presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica CARD nos diferentes tempos de cultura (0, 2, 6, 12 e 24 horas).

**FIGURA 10** - Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtidas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica CARD nos diferentes tempos de cultura (0, 2, 6, 12 e 24 horas). 44

**FIGURA 11** - Análise da secreção de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 46

**FIGURA 12** - Análise da secreção de IL-2 nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 48

**FIGURA 13** - Análise da secreção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 49

**FIGURA 14** - Análise da secreção de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 50

**FIGURA 15** - Análise da IMF da molécula CD28 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 52

**FIGURA 16** - Análise da IMF da molécula CD25 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 53

**FIGURA 17** - Análise da IMF da molécula CTLA-4 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 54

**FIGURA 18** - Análise da IMF da molécula CD28 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 55

**FIGURA 19** - Análise da IMF da molécula CD25 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 56

**FIGURA 20** - Análise da IMF da molécula CTLA-4 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (2, 6, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente. 57



**LISTA DE TABELAS.**

<b>Tabela 1</b> - Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica de acordo com os critérios de Belo horizonte.	6
<b>Tabela 2</b> - Anticorpos utilizados.	20
<b>Tabela 3</b> - Combinação de anticorpos e estímulos antigênicos	20
<b>Tabela 4</b> - Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD: Expressão da molécula CD28 na superfície de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> .	60
<b>Tabela 5</b> - Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD: Expressão da molécula CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> ou T CD8 <sup>+</sup> .	61
<b>Tabela 6</b> - Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD: Expressão da molécula CD25 na superfície de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> .	62
<b>Tabela 7</b> - Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD: Produção de PGE <sub>2</sub> e secreção de IL-2 em sobrenadante de cultura de CMSP.	64
<b>Tabela 8</b> - Análise dos dados entre os grupos NI, IND e CARD: Secreção de IL-10 e IFN $\gamma$ em sobrenadante de cultura de CMSP.	65

**RESUMO**

O sistema imune (SI), assim como os outros sistemas orgânicos atuam diretamente na homeostasia do organismo. Durante a fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* o SI age intensamente na tentativa de eliminar os parasitos que, no entanto, se evadem do sangue circulante para o meio predominantemente intracelular, favorecendo assim a evolução para a fase crônica. O objetivo do trabalho foi avaliar a habilidade de células do SI de indivíduos NI ou portadores da doença de Chagas em responder *in vitro* a antígenos do *T. cruzi*, através da expressão ou secreção de moléculas responsáveis pelos processos de ativação ou regulação desse estímulo. Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos indivíduos estudados foram separadas e analisadas antes e após serem cultivadas, na presença e na ausência de homogenatos antigênicos. As células e os sobrenadantes das culturas foram coletados nos tempos zero (antes do estímulo antigênico), e nos tempos 2h, 6h, 12h e 24 horas após o estímulo para análise da expressão das moléculas CD25, CD28 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como dos níveis de prostaglandina E2 e das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ . Os resultados mostraram que antígenos de *T. cruzi* são capazes de estimular PBMC de indivíduos do grupo NI a produzirem IL-10 e PGE<sub>2</sub>, além de induzirem maior intensidade média de fluorescência de CD25 em LT CD4<sup>+</sup>. IL-10 foi detectada precocemente em culturas de pacientes do grupo IND e mantém seus níveis no período estudado, enquanto a detecção do IFN $\gamma$  ocorreu somente às 12 horas de cultura, ao contrário dos sobrenadantes de cultura do grupo CARD, onde foram detectadas indistintamente as citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ . A intensidade média de fluorescência de CTLA-4 foi maior em LT CD4<sup>+</sup> estimulados no grupo IND, enquanto que no grupo CARD o estímulo antigênico induziu maior IMF de CD25 em LT CD4<sup>+</sup> e em LT CD8<sup>+</sup>. Admitindo-se a possibilidade de que regulação induzida pelo estímulo antigênico no grupo IND seja mediada por IL-10 e pela expressão de CTLA-4, que impede a geração do segundo sinal de ativação celular, a ausência precoce dessa no grupo CARD poderia ser um dos fatores relacionados a uma falha na regulação do sistema imune destes pacientes. Além disso, a produção de moléculas reguladoras IL-10 e PGE<sub>2</sub> por células dos indivíduos do grupo NI favorece a interpretação de que o SI é

também capaz de promover a manutenção da homeostasia nos organismos isentos de memória imunológica específica.

**Palavras chave:** homeostasia, imunorregulação doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*,

**Abstract**

The immune system (IS) as others has physiological functions that works toward the maintenance of homeostasis. During the acute phase of the infection by *Trypanosoma cruzi*, the IS functions intensively to eliminate the parasites that are able to leave the peripheral blood becoming predominantly intracellular favoring, therefore, the its maintenance and the development of the chronic phase of the disease. The objective of this work was to evaluate the ability of the IS of NI or individuals with Chagas disease to react in vitro to *T. cruzi* antigens. This was evaluated by the analysis of the expression or secretion of molecules involved on the process of activation or regulation of the response induced by the stimuli. Peripheral blood mononuclear cells of the individuals included in this study were fractionated and evaluated before and after in vitro culture. Cells and supernatants from these cultures were collected at time zero (before antigenic stimulation) and at 2, 6 and 24 hours after antigenic stimulation for analysis of CD25, CD28 e CTLA-4 expression on the surface of T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells as well as the levels of prostaglandins E<sub>2</sub> and the cytokines IL-2, IL-10 and IFN $\gamma$ . The results show that *T. cruzi* antigens stimulate PBMC from NI to secrete IL-10 and PGE<sub>2</sub> besides the induction of higher fluorescence intensity of CD25 in CD4<sup>+</sup> cells. IL-10 is detectable early in cell cultures of IND patients and remains high for the time period of the study, while IFN $\gamma$  was detected only at 12 h, in contrast with PBMC from CARD where IL-2, IL-10 and IFN $\gamma$  where detectable at all time points. In stimulated cultures, the mean fluorescence intensity of CTLA-4 was high in CD4<sup>+</sup> T cells from the IND group while in the CARD group the antigenic stimuli induced higher CD25 mean fluorescence intensity in CD4<sup>+</sup> and in CD8<sup>+</sup> cells. Admitting the possibility that regulation induced by the stimuli in the IND is mediated by IL-10 and expression of CTLA-4, impairing the second cell activation signal, the absence of early secretion of this cytokine by cells from CARD may be one of the major factors related to the lack of immuno regulatory activity in these patients,. Furthermore, the secretion of regulatory molecules IL-10 and PGE<sub>2</sub> by cells from NI individuals favors our interpretation that the IS also induces homeostasis in situations where immune response memory is not specific.

**Key words:** homeostasis, imunoregulation, Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*.

## 1- Introdução

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, o qual na época desenvolvia trabalhos sobre malária no norte de Minas Gerais (COURA, 1997; DIAS, 2001). O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, tem a capacidade de promover alterações tissulares no hospedeiro vertebrado com morbidade diferenciada, segundo os graus de acometimento (MACEDO, *et al.*, 1982, DIAS, 1989; RASSI, *et al.*, 1992, PARADA, *et al.*, 1997, MARIN-NETO, *et al.*, 1999). A enfermidade é reconhecida como uma endemia rural, com distribuição entre as Américas Central e do Sul, sendo endêmica em 21 países, onde acometem 16 – 18 milhões de indivíduos basicamente populações pobres com baixo nível de instrução que vivem em casebres de má qualidade, onde algumas das espécies do inseto vetor se domicilia com relativa facilidade (MARTINS, 1968; WHO, 1997; DIAS, 2000). Recentemente, o Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, um dos principais vetores do *T. cruzi*, conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde (WHO, 2002; FERREIRA & SILVA, 2006). No entanto, ainda ocorrem outras formas de transmissão, como por exemplo, a transfusão de sangue ou mesmo ingestão dos parasitos em alimentos contaminados (DIAS & COURA, 1997; WENDEL, 1998; DIAS, 2000).

Após a infecção, o indivíduo apresenta a fase aguda, a qual perdura 2-4 meses, e é caracterizada pela presença de formas tripomastigotas dos parasitos no sangue, o que facilita o diagnóstico direto da doença. Nesta fase, o sistema imune (SI) age intensamente com o objetivo de eliminar os parasitos, através de mecanismos humorais e celulares da imunidade inata como a lise mediada pelo complemento, fagocitose, citotoxicidade de células *natural killer* (NK) (CERISOLA, *et al.*, 1977; ANDRADE, 1991; DEUTSCHLÄNDER, *et al.*, 1978). Entretanto, os parasitos são capazes de se evadirem da resposta imune do hospedeiro através de diferentes mecanismos de escape (DAMATTA, *et al.*, 2007), o que compromete a eliminação total destes tripomastigotas, favorecendo desta maneira a evolução para a fase crônica com duração longa, tendo como características principais a baixa parasitemia e o parasitismo intracelular com as formas amastigotas (KOEBERLE, 1959; DIAS, 1989; ANDRADE, 1991; RASSI, *et al.*, 1992; HIGUCHI, 1997).

Neste contexto, os mecanismos de resposta imune também se modificam e se estabelece um equilíbrio que tenta preservar o hospedeiro dos danos causados pelo processo inflamatório gerado.

O SI, assim como os outros sistemas orgânicos, tem função fisiológica, atuando no sentido de manter a homeostasia do organismo, alterada por estímulos induzidos por fatores internos ou externos. A resposta imune contra fatores externos, incluindo patógenos, e fatores internos, como células tumorais, tem sido estudada ao longo dos tempos como sendo responsável pelos mecanismos de defesa. Para isto o SI conta com células e moléculas que atuam de maneira inespecífica, denominada imunidade inata (II), atuando como primeira linha de defesa (entenda-se: retorno à homeostasia) contra patógenos, enquanto que a permanência destes é capaz de estimular outras células -linfócitos- que se adaptam a estes estímulos externos, tornando-se mais específicas na tentativa de dar continuidade a homeostasia do organismo.

A característica comum às células da II é a expressão de moléculas de superfície com capacidade de reconhecimento de padrões estruturais diferentes do próprio (non-self), especialmente carboidratos e glicolipídios complexos – receptores Toll - comuns em microrganismos. Pode-se também destacar os receptores de membrana *scavenger* e os para proteínas solúveis do complemento (ARAUJO-JORGE, 2000; TAKEDA *et al.*, 2003).

A apresentação de antígenos por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) presentes nas células da II é o mecanismo responsável pela interação entre estas e a imunidade adaptativa (IA), representada pelos linfócitos T (LT) CD4<sup>+</sup> e os LT CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos B (LB) CD5<sup>+</sup> atuam também como células apresentadoras de antígeno (APC), como macrófagos e células dendríticas da II, além de secretarem anticorpos (BACHMANN & KOPF, 2002; JANEWAY, *et al.*, 2007<sup>a</sup>).

A ativação das células T requer, portanto, sinais oriundos das APC, que influenciam na evolução da resposta imune com estímulo ou inibição de outras células e mediadores que regulam os mecanismos patológicos (STADECKER, *et al.*, 1999).

Assim, a evolução da morbidade da doença de Chagas, nas fases aguda e crônica, é conseqüência destes mecanismos endógenos que tentam sempre restabelecer o equilíbrio interno do organismo.

Durante a **fase aguda** ocorrem graus variados de sintomas inespecíficos e miocardites associadas ao parasitismo tecidual e elevada parasitemia (PARADA, *et al.*, 1997). A miocardite mostra-se intensa e difusa, ocorrendo ainda necrose miocitolítica, edema, vasculite e infiltrado inflamatório, que é resultante da presença dos parasitos e de células polimorfos e mononucleares. Trombose mural pode complicar o processo inflamatório, que se estende até o endocárdio. Há também envolvimento do sistema de condução e dos plexos nervosos intramurais e extracardíacos. Durante esta fase, as alterações patológicas se manifestam, principalmente, por dilatação cardíaca global e derrame pericárdico (MARIN-NETO, *et al.*, 1999).

Controlada a parasitemia, os sintomas melhoram e a fase crônica da doença é estabelecida. No entanto, seqüelas relacionadas às lesões desenvolvidas durante a infecção aguda, como denervação do músculo liso parietal no trato digestivo e dos nervos parassimpático e simpático do tecido cardíaco, podem ter conseqüências patofisiológicas na fase crônica da doença (DIAS, 1989; ANDRADE, 1991; RASSI *et al.*, 1992; HIGUCHI, 1997).

As manifestações clínicas de desenvolvimento da **fase crônica** podem ser observadas ao longo dos anos após a infecção. A maioria dos pacientes permanece assintomática por toda vida. Aproximadamente 20-40% dos pacientes, após 10-20 anos de evolução da doença, desenvolvem miocardites e/ou alterações funcionais e anatômicas do esôfago e/ou cólon levando ao desenvolvimento de dilatações denominadas megaesôfago e megacólon (MACEDO, *et al.*, 1982; DIAS, 1989; RASSI, *et al.*, 1992).

Os fatores que influenciam a evolução dos pacientes assintomáticos para as formas crônicas cardíacas e/ou digestivas não estão ainda bem estabelecidos. Fatores específicos como, genética do hospedeiro e do parasito, a resposta imune do hospedeiro, a cepa do parasito, o nível de parasitemia, certamente são importantes e merecem serem investigados (DIAS, 1989, 1997; MACEDO, 1997).

Um dos aspectos mais intrigantes da doença de Chagas crônica são os intensos processos inflamatórios, associados à relativamente poucos parasitos (ANDRADE, 1983 e 1991; ANDRADE, *et al.*, 1994). Estes achados em autópsias de pacientes sintomáticos com doença de Chagas levaram a um conceito de que componentes autoimunes estariam envolvidos na gênese das alterações funcionais e das miocardites, encontradas em pacientes com as formas crônicas. Entretanto,

estudos mais recentes usando técnicas, como reação de polimerização em cadeia (PCR) e imunocitoquímica têm demonstrado correlação positiva entre o número de parasitos e a gravidade da doença cardíaca e digestiva nos pacientes, desafiando a hipótese autoimune para a patogênese da doença de Chagas (JONES, *et al.*, 1993; HIGUCHI, *et al.*, 1993<sup>a</sup>; VAGO, *et al.*, 1996; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004).

### **1.1 – Caracterização das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas**

Como já mencionado, cerca de 50% dos pacientes portadores da doença de Chagas apresentam a **forma clínica indeterminada (IND)**. Acredita-se que deste total cerca de 2 - 5% poderão desenvolver a forma clínica cardíaca (MACEDO, 1982; DIAS, 1989; MACEDO, 1997).

São considerados portadores da forma indeterminada da doença de Chagas os indivíduos soropositivos e/ou com exame parasitológico positivo para o *T. cruzi* que não apresentam quadro sintomatológico próprio da doença e com resultados de eletrocardiograma de repouso, estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon normais (RELATÓRIO OFICIAL DA 1ª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 1984).

Apesar de estar bem caracterizada, a forma IND permanece pouco conhecida. O substrato anatômico é representado pelas lesões inflamatórias microscópicas focais, onde os parasitos são raramente demonstrados por métodos histológicos comuns (ANDRADE, 1991; SANCHEZ, *et al.*, 1993). Porém, a utilização de PCR *in situ*, tem demonstrado a existência de material antigênico ou de partes do genoma do *T. cruzi* em algumas lesões (HIGUCHI, *et al.*, 1993<sup>a</sup>; JONES, *et al.*, 1993).

Para ANDRADE, (2005) os focos inflamatórios que aparecem no coração dos pacientes com a forma IND da doença de Chagas apresentam um ciclo evolutivo no qual o estímulo antigênico atrai células inflamatórias que aparecem como que inibidas no seu potencial agressivo, mas se acumulam no tecido intersticial acompanhadas por certo grau de fibrose. Após um tempo, as células inflamatórias são removidas por apoptose, enquanto o pequeno excesso de matriz sofre degradação e reabsorção. Com base em dados ultra-estruturais, as lesões da miocardite focal da forma IND foram interpretadas como sujeitas a um ciclo evolutivo,



auto-limitado, equilibrado pelo aparecimento de umas lesões e desaparecimento de outras, o que permite a longa sobrevivência do hospedeiro (ANDRADE, *et al.*, 1997). Assim é possível entender como um indivíduo infectado com o *T. cruzi* reproduzindo-se no interior de seus tecidos, especialmente no miocárdio, pode viver sem apresentar, aparentemente maiores problemas cardíacos (ANDRADE, 2005).

Apesar da enorme importância clínico-epidemiológica da **forma clínica cardíaca (CARD)** crônica, em nosso meio, as definições de conduta clínica referentes ao cuidado desses pacientes são, habitualmente, derivadas da transposição de conhecimentos adquiridos em outras cardiopatias para a cardiopatia chagásica. O acometimento cardíaco na fase crônica inclui amplo espectro de manifestações, que vai desde a presença de anormalidades silenciosas, registradas em exames complementares sofisticados, até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária ou a morte súbita, como estabelecido pelo CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005. ROCHA & MOURA, (1999) acreditam que a morte súbita possa estar relacionada à gravidade das extra-sístolas ventriculares, as quais são bastante comuns durante a cardiopatia chagásica crônica. Dentre as características mais peculiares da cardiopatia chagásica crônica destaca-se de maneira especial seu caráter fibrosante, considerado o mais expressivo dentre as miocardites, a destacada frequência e complexidade das arritmias cardíacas e sua combinação com distúrbios da condução do estímulo atrioventricular e intraventricular, a grande incidência de morte súbita e fenômenos tromboembólicos, assim como de aneurismas ventriculares. A cardiopatia chagásica crônica é a principal responsável pela elevada morbidade-mortalidade da doença, com grande impacto social e médico-trabalhista. Sendo assim a presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença. O prognóstico do paciente chagásico é semelhante ao da população geral enquanto o eletrocardiograma estiver normal, sendo que a realização desse exame de maneira seriada pode detectar a evolução para a forma cardíaca (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Recentemente foi publicada por ROCHA, *et al.*, (2003) uma classificação para cuidados clínicos de cardiopatias chagásicas que são mostrados na tabela 1, levando em consideração diferentes aspectos clínicos envolvidos nas alterações cardíacas, diferentemente da estabelecida pela WHO, (2002) que considera apenas presença e

gravidade dos sintomas. A classificação estabelecida por ROCHA, *et al.*, (2003) avalia a função cardíaca, utilizando técnicas padrões como ecocardiograma (ECG), radiografia e técnicas mais sensíveis como Doppler ecocardiográfico, Holter de 24 horas e teste de esforço físico. O que permite uma separação mais criteriosa dos pacientes apresentando as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

**Tabela 1. Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica de acordo com os critérios de Belo horizonte (ROCHA, *et al.*, 2003).**

<p><b>Cardiopatia Chagásica Crônica 1 (CCC 1)</b></p> <p>Sem sintomas; sem alterações significativas ao exame físico, esofagograma e enema opaco; técnicas sensíveis podem detectar anormalidades de gravidade variada (mas sem aumento do coração).</p>
<p><b>Cardiopatia Chagásica Crônica 2 (CCC 2)</b></p> <p>Sem sinais clínicos ou laboratoriais (raio-X do tórax ou ecocardiográfico) de aumento do coração; pequenas alterações ao ECG.</p>
<p><b>Cardiopatia Chagásica Crônica 3 (CCC 3)</b></p> <p>Sem sinais clínicos ou laboratoriais (raio-X do tórax ou ecocardiográfico) de aumento do coração; alterações consideráveis ao ECG – principalmente anormalidade de condução avançada.</p>
<p><b>Cardiopatia Chagásica Crônica 4 (CCC 4)</b></p> <p>Sem sinais clínicos ou laboratoriais (raio-X do tórax ou ecocardiográfico) de aumento do coração; graves alterações ao ECG – forma complexa e/ou predominantemente freqüente de arritmia ventricular.</p>
<p><b>Cardiopatia Chagásica Crônica 5 (CCC 5)</b></p> <p>Sinais clínicos, radiológicos e especialmente ecocardiográfico de aumento do coração com ou sem manifestação de insuficiência cardíaca.</p>

## 1.2 - Aspectos imunes da doença de Chagas.

A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas graves observadas em alguns pacientes (BAHIA-OLIVEIRA, *et al.*, 1998; GOMES, *et al.*, 2003).

Dentre os vários fatores imunológicos que têm sido demonstrados como importantes para o desenvolvimento das formas graves da doença podemos citar a ativação de leucócitos e conseqüente produção e secreção de citocinas. Estudando infiltrados inflamatórios do tecido cardíaco, HIGUCHI, *et al.*, (1993<sup>b</sup>) observaram grande quantidade de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> com predominância de subgrupos de CD8<sup>+</sup>. Alguns autores (DOS SANTOS, *et al.*, 2001; LANNES-VIEIRA, 2003) acreditam que a predominância de células T CD8<sup>+</sup> nos tecidos cardíacos é devida à expressão de moléculas de adesão (CAMs) nestas células. VITELLI-AVELAR, *et al.*, (2005) avaliaram, no contexto *ex vivo*, o fenótipo celular de pacientes com as formas clínicas IND, CARD e DIG. Os resultados mostraram uma maior freqüência de células T CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> nos pacientes com a doença de Chagas em relação aos indivíduos NI, além disso, eles observaram que o maior percentual de células TCD8<sup>+</sup> estava exclusivamente associado às formas mais graves da doença.

Dentre os sinais co-estimuladores, destaca-se a ligação entre a molécula CD28, presente nas células T, à CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2), presente nas APC, que participam de um dos eventos mais importantes no fenômeno de estimulação dos linfócitos T. Outras moléculas também são expressas dentre elas CD25, CD69, CD71, HLA-DR, CTLA-4 e CD95 (CARUZO, *et al.*, 1997).

Aqui a atenção será direcionada aos mediadores prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e às citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  produzidas por CMSP e às moléculas acessórias CD28, CD25 e CTLA-4, expressas na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

### 1.2.1 Mediadores envolvidos na doença de Chagas

**Prostaglandinas (PG)** são pequenas moléculas lipídicas que regulam vários processos no corpo, incluindo função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação do sistema imune (GOETZL, *et al.*, 1995; PHIPPS, *et al.*, 1991). A produção de PG inicia com a liberação de ácido aracdônico proveniente de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase-A<sub>2</sub> em resposta a estímulo inflamatório (SMITH, *et al.*, 1994). O ácido aracdônico, sob ação da enzima cicloxigenase (COX), é convertido à prostaglandina-H<sub>2</sub> a qual é convertida a vários subtipos de PG entre elas PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> (FILION, *et al.*, 2001). Estas PGs são liberadas rapidamente pelas células e agem próximas ao seu sítio de produção através de ligações específicas de alta afinidade a seus receptores da membrana plasmática (NARUMIYA, 1994; COLEMAN, *et al.*, 1994).

Entre os mediadores lipídicos derivados do ácido aracdônico, a PGE<sub>2</sub> é um dos melhores caracterizados em termos de imunomodulação (RIESER, *et al.*, 1997). Ela é produzida por muitos tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos e algumas células malignas e, exerce suas ações ligando-se a seus receptores de membrana EP1, EP2, EP3 e EP4, sozinhos ou em combinação (COLEMAN, *et al.*, 1994; BREYER, *et al.*, 2001). Após a ligação aos receptores ela exerce efeitos diversos sobre as células T (HARRIS, *et al.*, 2002). Alguns autores (CHOUDHRY, *et al.*, 1999; RUGGERI, *et al.*, 2000; COSME, *et al.*, 2000; DE BARROS-MAZON, *et al.*, 2004) têm mostrado a PGE<sub>2</sub> inibindo a proliferação celular. Outros autores (MASTINO, *et al.*, 1992; PINGE-FILHO, *et al.*, 1999; PORTER & MALEK, 1999; NISHIMURA, *et al.*, 2006) mostram a PGE<sub>2</sub> interferindo na morte celular induzindo ou inibindo a apoptose. A PGE<sub>2</sub> também tem sido associada à produção de citocinas antiinflamatórias e pro - inflamatórias por células T (COLEMAN, *et al.*, 1994, RIESER, *et al.*, 1997; WU, *et al.*, 1998; MEYER, *et al.*, 2003). HILKENS, *et al.*, (1996<sup>a</sup>, 1996<sup>b</sup>) mostraram a PGE<sub>2</sub> inibindo a produção de citocinas Th<sub>1</sub> favorecendo uma intensificação de resposta Th<sub>2</sub>.

**As citocinas** são moléculas solúveis, produzidas e secretadas pelas células do sistema imune em resposta a patógenos e outros antígenos. Elas medeiam e regulam a resposta imune por meio de ligações à receptores específicos. Podem atuar de forma autócrina ou podem atuar em células adjacentes (JANEWAY, *et al.*, 2007<sup>b</sup>). Seguramente estão envolvidas, tanto na resistência quanto nos mecanismos

relacionados à patologia da doença de Chagas (SILVA, *et al.*, 1992; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995; SAMUDIO, *et al.*, 1998; SOARES, *et al.*, 2001). Neste trabalho foi feita análise das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$

IL-2 é uma citocina que atua como um fator de crescimento e regulador central no sistema imune e seus efeitos são mediados através da ligação dos heterotrimeros das subunidades dos receptores IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ . (NEEPER, *et al.*, 1987; NAKAMURA, *et al.*, 1994; THEZE, *et al.*, 1996; STAUBER, *et al.*, 2006). Ela influencia vários componentes do sistema imune como células B e células T, células NK e monócitos (GAFFEN, *et al.*, 1996). Em linfócitos T, as cadeias IL-2R $\beta$  e  $\gamma$  estão expressas constitutivamente em sua superfície (HATAKEYAMA *et al.*, 1992; TAKESHIDA, *et al.*, 1992; RICKERT, *et al.*, 2005) enquanto a cadeia IL-2R $\alpha$  aparece apenas sob ativação antigênica. A expressão máxima e prolongada do IL-2R $\alpha$  por células T é dependente da estimulação de IL-2 produzida pela própria célula (LEONARD, *et al.*, 1985). A IL-2 ativa o fator de transcrição STAT-5 e regula a transcrição do IL-2R $\alpha$  (JOHN, *et al.*, 1996; LECINE, *et al.*, 1997).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, produzida por diferentes células como macrófagos, células T, células B, mastócitos, queratinócitos e algumas células tumorais. Ela regula uma variedade de funções das células hemopoiéticas. Facilita a eliminação de organismos infecciosos com dano mínimo aos tecidos do hospedeiro. Além disso, desempenha importante função na tolerância imune, desenvolvimento de células T e dendríticas e no crescimento e diferenciação de células B (MOORE, *et al.*, 2001; CONTI, *et al.*, 2003). Ela está também associada à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (SILVA, *et al.*, 1992) devido, provavelmente, ao seu papel em regular a ativação de macrófagos induzida pelo IFN $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de metabólitos tóxicos quanto a diferenciação de células Th1 (CARDILLO, *et al.*, 1996; REED, 1988).

Dentre as diversas citocinas estudadas na infecção pelo *T. cruzi*, o IFN $\gamma$  tem sido associado tanto em modelos experimentais (SILVA, *et al.*, 1992; SAMUDIO, *et al.*, 1998; SOARES, *et al.*, 2001) quanto em humanos com a resistência do hospedeiro a infecção (BAHIA-OLIVEIRA, *et al.*, 1998, 2000). Segundo BAHIA-OLIVEIRA, *et al.*, (1998), o IFN $\gamma$  pode desempenhar uma possível ação na proteção e no desenvolvimento da patologia chagásica e em conjunto com quimioterapia específica o IFN $\gamma$  pode levar a eliminação do parasito em pacientes portadores da fase aguda. Já, nas formas graves da fase crônica da doença de Chagas, GOMES, *et*

*al.*, (2003) sugerem a participação do IFN $\gamma$  na indução da resposta inflamatória em humanos. DUTRA, *et al.*, (1997) detectaram elevados níveis de RNAm para IFN $\gamma$  em culturas de CMSP, estimuladas por homogenatos do *T cruzi*, de pacientes com as formas crônicas da doença de Chagas. REIS, *et al.*, (1997) com estudos de imunohistoquímica, mostraram que o IFN $\gamma$  foi a citocina mais abundante em tecidos cardíacos de pacientes cronicamente infectados. A produção do IFN $\gamma$ , no início da infecção, diminui a parasitemia e a mortalidade de animais infectados, uma vez que macrófagos estimulados produzem metabólitos tóxicos para o parasito (SILVA, *et al.*, 1992; CARDILLO, *et al.*, 1996; HOLSCHER, *et al.*, 1998; SILVA, *et al.*, 1995; VESPA, *et al.*, 1994). Outras citocinas também desempenham papel importante no controle e desenvolvimento da patologia, entre elas a IL-12 e TNF $\alpha$ .

### 1.2.2 – Expressão de moléculas acessórias em Linfócitos T ativados

Moléculas acessórias ou co-sinalizadoras são representadas por diferentes proteínas de membrana, presentes na superfície dos linfócitos e APC, são componentes essenciais para ativação das células T bem como na migração destas células para os sítios de infecção e inflamação (CHEN & HENDRICKS, 1998; OLSSON, *et al.*, 1998; TUOSTO & ACUTO, 1998).

A interação de CD28 com seus dois ligantes, CD80 ou CD86, nas APC é reconhecida como a principal via co-estimuladora da célula T. A co-estimulação de CD28 tem sido implicada em uma ampla série de respostas da célula T, incluindo proliferação da célula T, produção da citocina IL-2, prevenção de anergia e indução de um fator anti-apoptótico (LENSCHOW, *et al.*, 1996; SALOMON, *et al.*, 2001). Além disso, CD28 desempenha um importante papel na diferenciação de célula B e produção de anticorpos além de dirigir a migração dentro do sítio inflamatório pela indução da produção de quimiocinas específicas e regulação dos receptores das quimiocinas (BOUR-JORDAN & BLUESTONE, 2002).

Em humanos, BORTHWICK, *et al.*, (1996) mostraram que, a maioria dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, expressa CD28, (conforme achados do nosso laboratório), e que uma pequena proporção, aproximadamente 25%, das células T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> não expressam. Análise da correlação entre a frequência de células expressando

citocinas e a freqüência de células T CD4<sup>+</sup> com expressão diferencial de CD28 demonstrou que, células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, correlacionam positivamente com TNF $\alpha$ , nos pacientes apresentando as formas clínicas CARD, e com IL-10 nos naqueles apresentando a forma clínica IND, (MENEZES, *et al.*, 2004).

Estudos anteriores demonstraram que a estimulação dos linfócitos leva a regulação positiva de diversos marcadores de superfície celular entre eles, CD25 (tardio) (FERENCZI, *et al.*, 2000). Segundo MICHAILOWSKY, *et al.*, (2003) após estímulo *in vitro*, de CMSP de pacientes portadores da doença de Chagas, com a proteína paraflagelar Rod (PFR), ocorre um aumento na freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e conseqüente aumento de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , sugerindo que a presença da PFR favorece a proliferação destas células e uma resposta do tipo 1.

A molécula CD25 (cadeia  $\alpha$  IL-2R) funciona como um receptor de baixa afinidade e se associa às moléculas CD122 (cadeia  $\beta$  IL-2R) e CD132 (cadeia  $\gamma$  comum) para formar o complexo receptor de alta afinidade da citocina IL-2 (NEEPER, *et al.*, 1987; NAKAMURA *et al.*, 1993). A molécula CD25 é expressa por células T e B ativadas e macrófagos/monócitos ativados (KNAPP, *et al.*, 1989). Em linfócitos T, as cadeias IL-2R $\beta$  e  $\gamma$  estão expressas constitutivamente em sua superfície enquanto a cadeia IL-2R $\alpha$  aparece apenas sob ativação antigênica (HATAKEYAMA, *et al.*, 1992; TAKESHIDA, *et al.*, 1992). Após ativação, *in vitro*, via complexo TCR/CD3 é observado aumento na densidade de expressão de CD25 na superfície dos linfócitos T (JACKSON, *et al.*, 1990). A expressão máxima e prolongada do IL-2R $\alpha$  por células T é dependente da estimulação de IL-2 produzida pela própria célula (LEONARD, *et al.*, 1985). Em nosso laboratório vimos que pacientes apresentando a forma clínica IND apresentam níveis de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> significativamente maiores quando comparados com indivíduos não infectados, sugerindo a participação destas células no controle da progressão da cardiomiopatia chagásica (ARAUJO, *et al.*, 2007).

O Antígeno Intracelular-4 Associado ao Linfócito Citotóxico (CTLA-4) ou CD152, desempenha um importante papel na regulação do sistema imune. Ele possui 76% de homologia à CD28 e liga-se aos mesmos receptores co-estimuladores, CD80 e CD86, nas APC, com maior afinidade que CD28 (CHAMBERS & ALLISON, 1999; BRUNNER, *et al.*, 1999). Apesar disto, diferentemente da molécula CD28, a expressão de CTLA-4 é raramente detectada em células T não estimuladas e o pico

de expressão ocorre apenas após a ativação das células T via CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (ALEGRE, *et al.*, 1998; OOSTERWEGEL, *et al.*, 1999; ALEGRE, *et al.*, 2001). CTLA-4 e CD28 desempenham funções opostas na regulação do sistema imune. Enquanto CD28 apresenta-se como o segundo sinal requerido para ativação celular (ALEGRE, *et al.*, 2001; SHAHINIAN, *et al.*, 1993), CTLA-4 está implicado com a regulação negativa da ativação da célula T (ALEGRE, *et al.*, 1998; OOSTERWEGEL, *et al.*, 1999; ALEGRE, *et al.*, 2001; CHAMBERS, *et al.*, 1999). Tem sido proposto que o controle da resposta de célula T mediada por CTLA-4 possa facilitar a geração de células T de memória, as quais permanecem prontas a responder a estimulação de antígenos após a redução da expressão de CTLA-4 (OOSTERWEGEL, *et al.*, 1999; GREENWALD, *et al.*, 2002). A ativação do CTLA-4 foi relacionada à indução de tolerância/anergia em células T periféricas (GREENWALD, *et al.*, 2001; PEREZ, *et al.*, 1997). O bloqueio de CTLA-4 por anticorpos monoclonais previne a indução de anergia em alguns sistemas (SHRIKANT, *et al.*, 1999), mas não em outros (SOTOMAYOR, *et al.*, 1999) como, por exemplo, a progressão do ciclo celular (SALOMON & BLUESTONE, 2001) ou indução de TGFβ imunossupressivo (CHEN, *et al.*, 1998; NAKAMURA, *et al.*, 2001). Uma interação direta de CTLA-4 com a cadeia TCR-ζ tem sido relatada (LEE, *et al.*, 1998; CHIKUMA, *et al.*, 2003) o que poderia controlar diretamente o acúmulo e retenção de TCR nas sinapses imunológicas (CHEN, 2004). Alguns autores (SALOMON, *et al.*, 2000; TAKAHASHI, *et al.*, 2000; READ, *et al.*, 2000) observaram que células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressam níveis elevados de CTLA-4. Segundo CEDERBOM, *et al.*, (2000) a expressão elevada do CTLA-4 permite diferenciar as células T reguladoras das células T ativadas recentemente.

Neste trabalho a atenção foi centrada nas alterações induzidas pelo homogenato total de antígenos da forma epimastigota do *T. cruzi* sobre as células do SI de indivíduos não infectados (NI) pelo parasito, em paralelo às alterações induzidas nos pacientes que se encontram nas formas clínicas indeterminada ou cardíaca grau V da fase crônica.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Avaliar o impacto de antígenos do *T. cruzi*, **cepa CL**, sobre as CMSP de indivíduos NI e de pacientes na fase crônica da doença de Chagas, portadores das formas clínicas IND e CARD grau V.

### 2.2 – Objetivos específicos

2.2.1 – Analisar os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidas por CMSP dos indivíduos NI e dos pacientes dos grupos IND e CARD em cultura estimulada ou não por antígenos EPI durante 2, 6, 12 e 24 horas.

2.2.2 – Analisar os níveis das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  produzidas por CMSP dos indivíduos NI e dos pacientes dos grupos IND e CARD em cultura estimulada ou não por antígenos EPI durante 2, 6, 12 e 24 horas.

2.2.3 – Analisar a expressão das moléculas acessórias CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos NI e dos pacientes dos grupos IND e CARD em cultura estimulada ou não por antígenos EPI durante 2, 6, 12 e 24 horas.

2.2.4 – Relacionar as dosagens obtidas de PGE<sub>2</sub> e citocinas (IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ ) com o perfil fenotípico de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de cada grupo estudado.

2.2.5 – Correlacionar às dosagens obtidas de PGE<sub>2</sub> e citocinas (IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ ) e o perfil fenotípico de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os grupos estudados.

### **3- População estudada.**

#### **3.1 - Caracterização da população estudada**

Neste estudo, foi avaliada a resposta imune de cinco indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* e de doze pacientes com as manifestações crônicas da doença de Chagas, apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca. Todos os pacientes foram examinados pelo Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, do Ambulatório de referência em doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. O Prof. Manoel Otávio foi o investigador principal deste trabalho e também responsável pelo arquivamento e análise dos dados clínicos.

Todos os sujeitos da pesquisa foram voluntários e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo COEP da UFMG, de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil. O esclarecimento foi dado, individualmente, antes da coleta de sangue, com o intuito de explicar os objetivos e a metodologia e esclarecer que os participantes eram livres para recusarem a participar do estudo ou a se retirar quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico feito no ambulatório.

##### **3.1.1 - Critérios de inclusão**

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, foram selecionados pacientes de acordo com os seguintes critérios:

- Diagnóstico sorológico de doença de Chagas caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas ELISA, IFI e HAI;
- Idade compreendida entre 25 e 70 anos;
- Presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo;
- Níveis de tensão arterial dentro de faixa da normalidade (sistólica < 160 mmHg e diastólica < 90 mmHg);

- Ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não-chagásico e ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória;
- Conclusão dos exames propostos;
- Assentimento voluntário de participação na pesquisa.

### 3.1.2 - 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:
  - a) Pressão arterial medida durante o exame físico  $\geq 160/95$  mmHg, em mais de uma oportunidade ou;
  - b) Pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a:
    - b.1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou;
    - b.2) quarta bulha ao exame físico, ou;
    - b.3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou;
    - b.4) evidencias 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, (National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes 1979;28:1039-1057).;
- 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) (SKINNER *et al.*, 1984).

- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- Outras cardiopatias não relacionadas à doença de Chagas;
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menor que 10g/dL;
- Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;
- Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmática, associada ou não às manifestações clássicas de uremia.

### 3.1.3 – Grupos de estudo

As formas clínicas foram classificadas segundo os critérios estabelecidos por Rocha *et al* (2003), a idade dos indivíduos não infectados e dos pacientes que participaram voluntariamente deste trabalho variou entre 25-70 anos. Os participantes da pesquisa foram então agrupados em:

**Grupo de indivíduos Não-Infectados (NI):** Constituído por cinco (05) indivíduos saudáveis, não portadores da doença de Chagas que apresentavam testes sorológicos negativos (Imunofluorescência indireta, ELISA, Hemaglutinação ou Fixação do complemento), bem como ausência de qualquer alteração cardíaca.

**Grupo de pacientes com a forma clínica Indeterminada (IND):** Constituído por seis (06) pacientes com positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ou sinais da moléstia; eletrocardiograma convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

**Grupo de pacientes com a forma clínica Cardíaca (CARD):** Constituído por seis (06) pacientes com positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas apresentando cardiopatia crônica grau V, com cardiomegalia e com ou sem sinais de insuficiência cardíaca.

#### **4- Materiais e métodos.**

##### **4.1 - Obtenção do homogenato antigênico derivado das formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi***

As formas epimastigotas (EPI) - (cepa CL) do parasito foram cultivadas e mantidas em meio LIT. Estes parasitos foram lavados três vezes em solução salina (PBS 0,15M pH 7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completou-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvejen a 20.000 rpm cinco vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subseqüentemente, as suspensões foram centrifugadas a 5000g durante 60 minutos a 4°C com PBS. O fluído sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,45µM e mantido em pequenas alíquotas (1mL) a -70°C até o momento de uso.

##### **4.2 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

Foram coletados através de punção venosa, em tubos heparinizados, aproximadamente 40mL de sangue de cada paciente e indivíduo não infectado. A coleta foi efetuada por um profissional capacitado. Após a coleta o sangue total foi adicionado à solução de Ficoll-Hypaque e levado para centrifugação, (400g, 40 minutos a temperatura de 20°C). Ao término da centrifugação formou-se um anel de CMSP o qual foi coletado e transferido para tubos contendo meio de cultura - Minimal Essential Medium (MEM) para serem lavadas por três vezes por centrifugação (400g, 10 minutos a 4°C), ao final desta seqüência de lavagens, o “pellet” de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) formado foi suspenso em RPMI (meio de cultura) e contado em câmara de Neubauer para ser ajustado para a concentração 10<sup>6</sup>/mL (GAZZINELLI, 1983).

### 4.3 - Cultura de células mononucleares do sangue periférico

As CMSP foram cultivadas segundo procedimento descrito por GAZZINELLI *et al* (1983), com algumas modificações aqui descritas. O meio de cultura de células (CMBLAST) continha 1,6% de L-glutamina e 0,03% de um coquetel de antibiótico e anti-micótico (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina) diluídos em meio RPMI 1640. Um volume de 200 $\mu$ L de CMSP (a uma concentração de 10<sup>6</sup> células/mL) foram cultivadas durante diferentes períodos de tempos (2, 6, 12 e 24 horas) em tubos de polipropileno de 14mL (BD 352059) contendo 1600 $\mu$ L de CMBLAST e 200 $\mu$ L RPMI (controle) ou 1600 $\mu$ L de CMBLAST e 200 $\mu$ L EPI, em incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida.

### 4.4 - Avaliação da cinética de expressão das moléculas acessórias na superfície dos linfócitos T

Para avaliar a cinética de expressão das moléculas acessórias na superfície dos linfócitos T foram definidos os tempos em que as células foram submetidas ao ensaio com anticorpos fluorescentes para análise por citometria de fluxo. Os tempos estabelecidos foram: tempo 0 (zero), considerado para a cultura controle (CMSP sem estímulo antigênico prévio); tempos 2h, 6h, 12h, e 24h após a cultura controle, na presença ou ausência de estímulo de antígeno EPI.

A tabela 2 apresenta os anticorpos monoclonais (Becton Dickinson) específicos marcados com fluorocromo, e para a análise por citometria utilizou-se o software Cell Quest. A coleta de dados no FACS foi conduzida de acordo com a seqüência dos tubos ordenados conforme a tabela 3.

**Tabela 2 - Anticorpos utilizados**

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti-CD4-PerCP	SK3	0,5 µg
Anti-CD8- PerCP	SK1	0,5 µg
Anti-CD25-APC	MA251	0,5 µg
Anti-CTLA-4 (CD152)PE	BNI 3	0,5 µg
Anti-CD28-PE	L293	0,5µg

**Tabela 3 - Combinação de anticorpos e estímulos antigênicos**

Tubo	Coquetel de Anticorpos	Estímulo.
01-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD25-APC + Anti-CTLA-4 (CD152)PE	RPMI
02-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD28-PE	RPMI
03-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD25-APC + Anti-CTLA-4 (CD152)PE	RPMI
04-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD28-PE	RPMI
05-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD25-APC + Anti-CTLA-4 (CD152)PE	EPI
06-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD28-PE	EPI
07-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD25-APC + Anti-CTLA-4 (CD152)PE	EPI
08-	Anti-CD4- PerCP + Anti-CD28-PE	EPI

Observação: Os tubos sem estímulo antigênico (EPI) constituem o controle.

As reações de imunofluorescência foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pela Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) e adaptado para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon- Becton Dickinson, EUA). As células, após coleta do sobrenadante, foram re-suspensas em 250µL de PBS-W gelado (PBS contendo 0,5% de albumina sérica bovina). Nos tubos de poliestireno, que continham as combinações de anticorpos, foram colocados 25µL da suspensão celular, seguida de

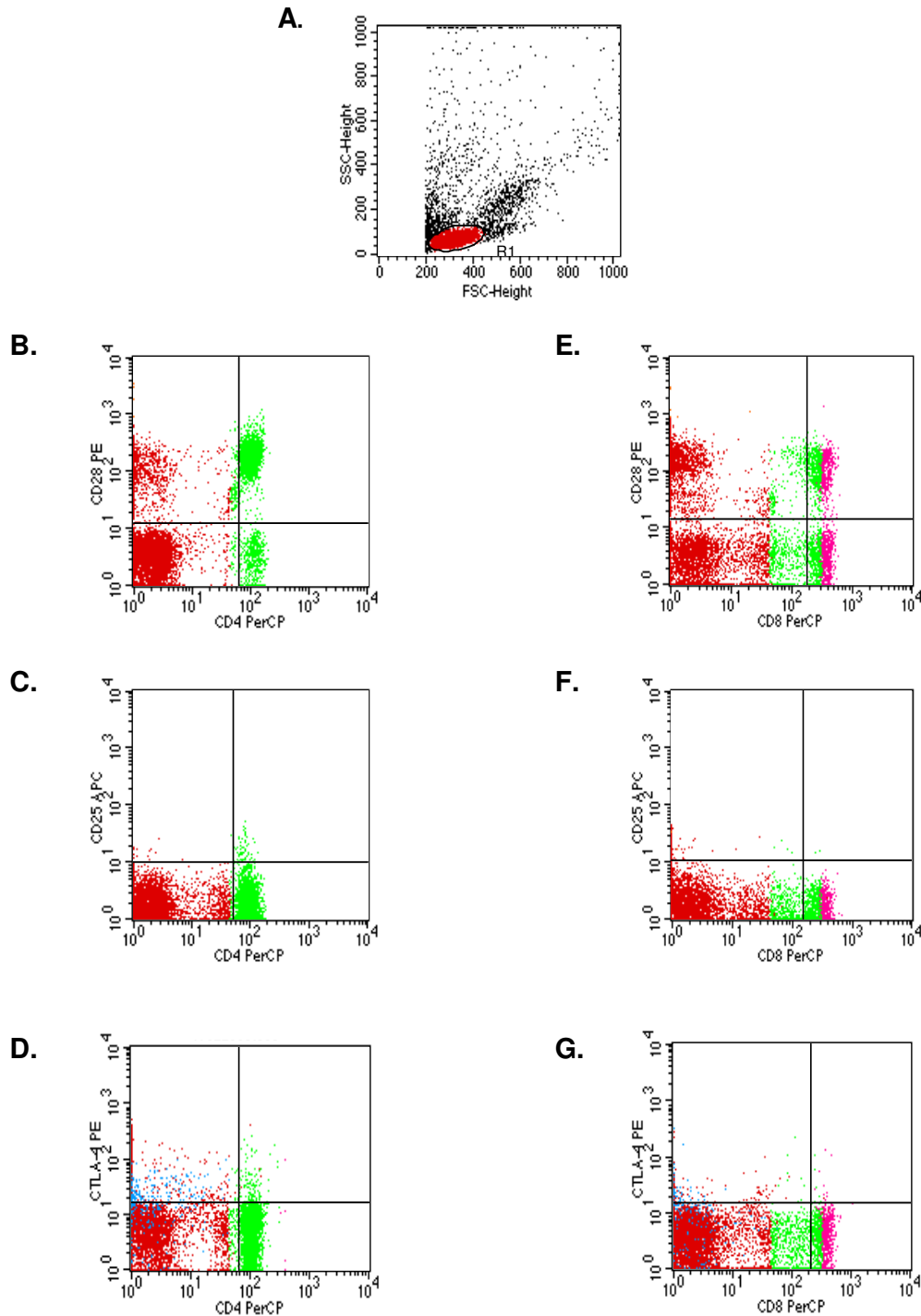
homogeneização e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Terminada a incubação foram adicionados 150µL de PBS-W e os tubos foram centrifugados a 400g à temperatura de 20°C por 10 minutos. Após este procedimento o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se a cada tubo 150µL de PBS-W, seguido de centrifugação a 400g 20°C por 10 minutos. Ao final desta última centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 200µL de solução fixadora MFF e seguiu-se à leitura e análise no citômetro.

O citômetro de fluxo utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 4 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4).

A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram feitas através de um sistema de computador e o “software, Cell Quest”, acoplado ao citômetro. O “Cell Quest” fornece um perfil de células de acordo com o tamanho e granulosidade. Foram coletados 10.000 eventos para a análise após estimulação *in vitro*.

A figura I representa, de forma esquemática, a determinação do fenótipo celular. A figura I-A mostra a seleção da população de linfócitos baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (Dispersão Frontal - FSC - Forward Scatter) *versus* granulosidade (Dispersão Lateral - SSC - Side Scatter). Após seleção da população de interesse, por meio de uma janela (“gate” R1), a frequência das subpopulações fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de FL1 *versus* FL2. As figuras I-B, C e D ilustram a seleção da subpopulação de LT CD4<sup>+</sup> expressando as moléculas CD28, CD25 e CTLA-4, respectivamente; enquanto as figuras I-E, F e G ilustram a seleção da subpopulação de LT CD8<sup>+</sup> expressando as moléculas CD28, CD25 e CTLA-4, respectivamente.





**FIGURA I:** Análise de linfócitos do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígenos EPI. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos selecionada no “Gate” **R1**, em gráfico de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD28. (C) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CD25. (D) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando CTLA-4. (E) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CD28. (F) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CD25. (G) representa o perfil de análise da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CTLA-4.

#### **4.6 - Obtenção de sobrenadante de culturas para identificação das citocinas**

Nos tempos 0h, 2h, 6h, 12h e 24h, os tubos contendo as células cultivadas foram centrifugados a 400g, por 10 minutos à temperatura de 4°C (Centrifuga Beckman modelo j-6d, EUA) e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em alíquotas em tubos estéreis, a -80°C para dosagem de citocinas.

##### **4.6.1 - Quantificação dos níveis de citocinas secretadas no sobrenadante**

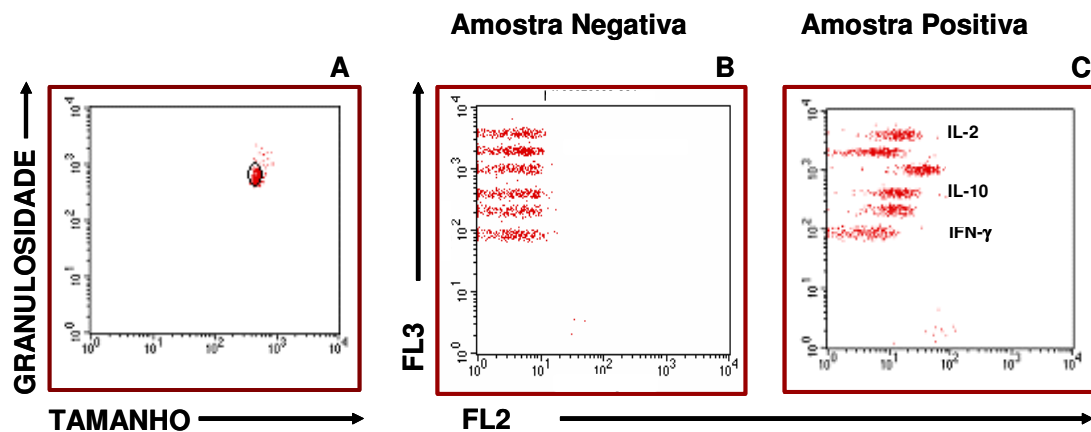
Os níveis das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  presentes nos sobrenadantes de culturas estimuladas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), Becton Dickinson, seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante. Esta técnica emprega uma mistura de 06 esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal de FL3. A utilização de uma mistura de esferas permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra.

Desta forma, 50 $\mu$ L da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais anti-IFN $\gamma$ , IL-2, e IL-10 foram transferidas para tubos de 12x75mm destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 50 $\mu$ L do diluente G e das amostras de sobrenadantes a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos tubos. As misturas foram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 1mL da solução tampão (PBS) e centrifugadas a 200g, por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100 $\mu$ l em cada tubo. As esferas de captura foram então incubadas por 90 minutos, ao abrigo da luz, com um coquetel de anticorpos monoclonais humanos marcados com PE (Human Inflammation PE Detection Reagent). Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas com 1mL de solução tampão e centrifugadas a 200g por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100 $\mu$ L em cada tubo, onde foram

adicionados 300 $\mu$ L de solução tampão para re-suspensão das esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo.

Para aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado utilizando o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. O objetivo do ajuste do aparelho consiste em definir os parâmetros de tamanho e granulidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulidade. Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade da fluorescência 3 (FL3) para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada).

A análise do perfil de citocinas do Tipo 1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e do Tipo 2 (IL-10) nos sobrenadantes de cultura foi realizada segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software, com auxílio do Microsoft Excel, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA Analysis Software faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulidade (Figura II A). Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade FL2, em gráficos bidimensionais (Figura II B e C). A ligação da citocina de interesse, presente na amostra, à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas marcadas com ficoeritrina (PE), pode ser evidenciado através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem amostra (Figuras II B e II C). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina analisada.



**Figura II:** Análise quantitativa de citocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo BD CBA Analyses Software. Inicialmente, o programa promove a seleção automática da população de esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulidade (A). Em seguida, separa as esferas e analisa da intensidade de fluorescência correspondente ao complexo esfera-citocina-anticorpo PE (B e C).

#### **4.7 - Quantificação dos níveis de prostaglandinas E<sub>2</sub> secretadas, no sobrenadante, durante as culturas das células.**

A quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) secretada pelas CSMP, após estimulação por antígenos do *T. cruzi* foi realizada empregando-se o KIT de ELISA - Prostaglandin E<sub>2</sub> Biotrak Enzyme immunoassay (EIA) System – RPN22210 (Amersham Biosciences). Em micro-placas de ELISA de fundo chato (Amersham Biosciences) de 96 poços foram adicionados 50 µL de tampão de ensaio diluído (Amersham Biosciences), 50 µL das amostras de sobrenadante de cultura e 50µL de anticorpo de cabra anti-mouse (Amersham Biosciences). As placas foram incubadas por três horas em geladeira (2-8°C). Em seguida, 50µL de anticorpo anti-PGE<sub>2</sub> conjugado com peroxidase (Amersham Biosciences) foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora em geladeira (2-8°C). Após este tempo, os poços foram aspirados e lavados por quatro vezes com tampão de lavagem (Amersham Biosciences) Em seguida foi adicionado 150µL de substrato Tetramethylbenzidine (TMB) e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de solução de ácido sulfúrico (1M) e a densidade óptica medida em leitor de ELISA automático utilizando-se um filtro de 450nm. A sensibilidade é de 1 – 32 pG/poço, ou seja, 20 – 640pG/mL. Os dados obtidos na leitura foram então processados através do programa Soft Max para o cálculo da concentração de PGE<sub>2</sub> em pG/mL nos sobrenadantes testados.

#### **4.8 – Análise estatística dos dados**

A análise estatística dos dados referentes à expressão dos marcadores celulares e da produção das moléculas pelas CMSP foi realizada através do software GraphPad PRISM 4 (E.U.A.).

Para análise dos dados referentes às cinéticas de produção de PGE<sub>2</sub> e das citocinas IL-2, IL10 e IFN $\gamma$  e da expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 nos LT CD4<sup>+</sup> e nos LT CD8<sup>+</sup> foi realizado o teste de Mann-Whitney, para dados não paramétricos, quando a comparação foi feita entre dois grupos (partes A e C). Para análise dos dados referentes aos tempos específicos, fazendo comparação entre antes e após estimulação foi feito o teste de Wilcoxon.(parte B).

## 5- Resultados

A secreção de citocinas e a expressão de marcadores celulares foram estudadas em pacientes com a doença de Chagas objetivando-se avaliar a habilidade funcional das CMSP e a cinética da expressão de fenótipos de ativação ou de regulação, decorrentes do micro-ambiente de moléculas no sobrenadante das culturas. Para tanto, analisou-se a secreção de prostaglandina-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  por CMSP e os fenótipos CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>. A PGE<sub>2</sub> e as citocinas foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas, na presença de RPMI ou sob estímulo por antígenos EPI após duas, seis, 12 e 24 horas. Já a expressão fenotípica celular foi avaliada no tempo zero - antes do estímulo - e após estimulação com EPI nos diferentes tempos de cultura (dois, seis, 12 e 24 horas).

### PARTE A

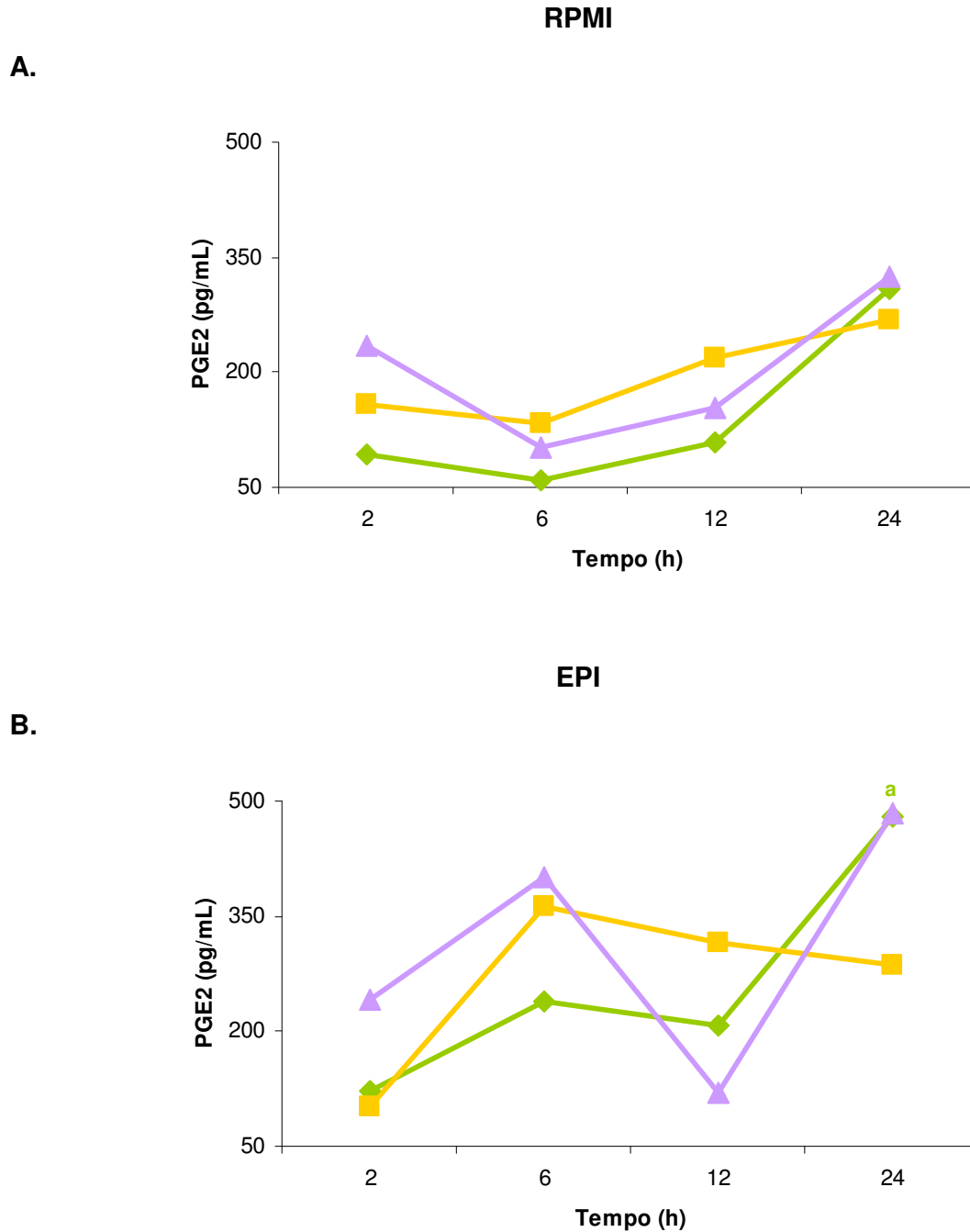
#### 5.1 – Cinética da produção de prostaglandina-E2 por Células Mononucleares do Sangue Periférico de indivíduos do grupo Não Infectado e pacientes dos grupos Indeterminado e Cardíaco.

A cinética de produção de prostaglandina-E2 (PGE<sub>2</sub>) nos sobrenadantes de culturas de CMSP dos indivíduos do grupo NI e de pacientes dos grupos IND e CARD, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas na figura 1. Os dados estão expressos em pg/mL.

A análise dos dados entre os tempos de cada grupo de indivíduos/pacientes não mostrou diferença significativa na produção de PGE<sub>2</sub> (Figura 1A).

Já nos sobrenadantes das culturas de PMBC de NI, estimuladas por EPI, observou-se aumento significativo de PGE<sub>2</sub> no tempo de 24 horas em relação à duas horas ( $p=0,0259$ ). Com relação às formas IND e CARD não houve diferença significativa entre os tempos (Figura 1B).

Esses dados sugerem que PGE<sub>2</sub> não seja um mediador decorrente de resposta de imunorregulação específica para estímulo antigênico, uma vez que indivíduos do grupo NI não apresentam células de memória para antígenos de *T. cruzi*.



**FIGURA 1:** Análise das cinéticas de produção de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de **RPMI** ou **EPI**, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas).

CMSP de indivíduos dos grupos NI=(◆), IND=(■) e CARD=(▲).

(A) PGE<sub>2</sub> obtida de culturas de CMSP na presença de RPMI, (B) PGE<sub>2</sub> obtida de culturas de CMSP após estimulação *in vitro* por antígenos EPI.

Observação: os dados estão em pg/mL; II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor dos grupos de indivíduos/pacientes.

**a-** Diferença estatística da produção da PGE<sub>2</sub> no tempo 24 horas em relação às duas horas.

**b-** Diferença estatística da produção da PGE<sub>2</sub> no tempo 24 horas em relação às seis horas.

**c-** Diferença estatística da produção da PGE<sub>2</sub> no tempo 24 horas em relação às 12 horas

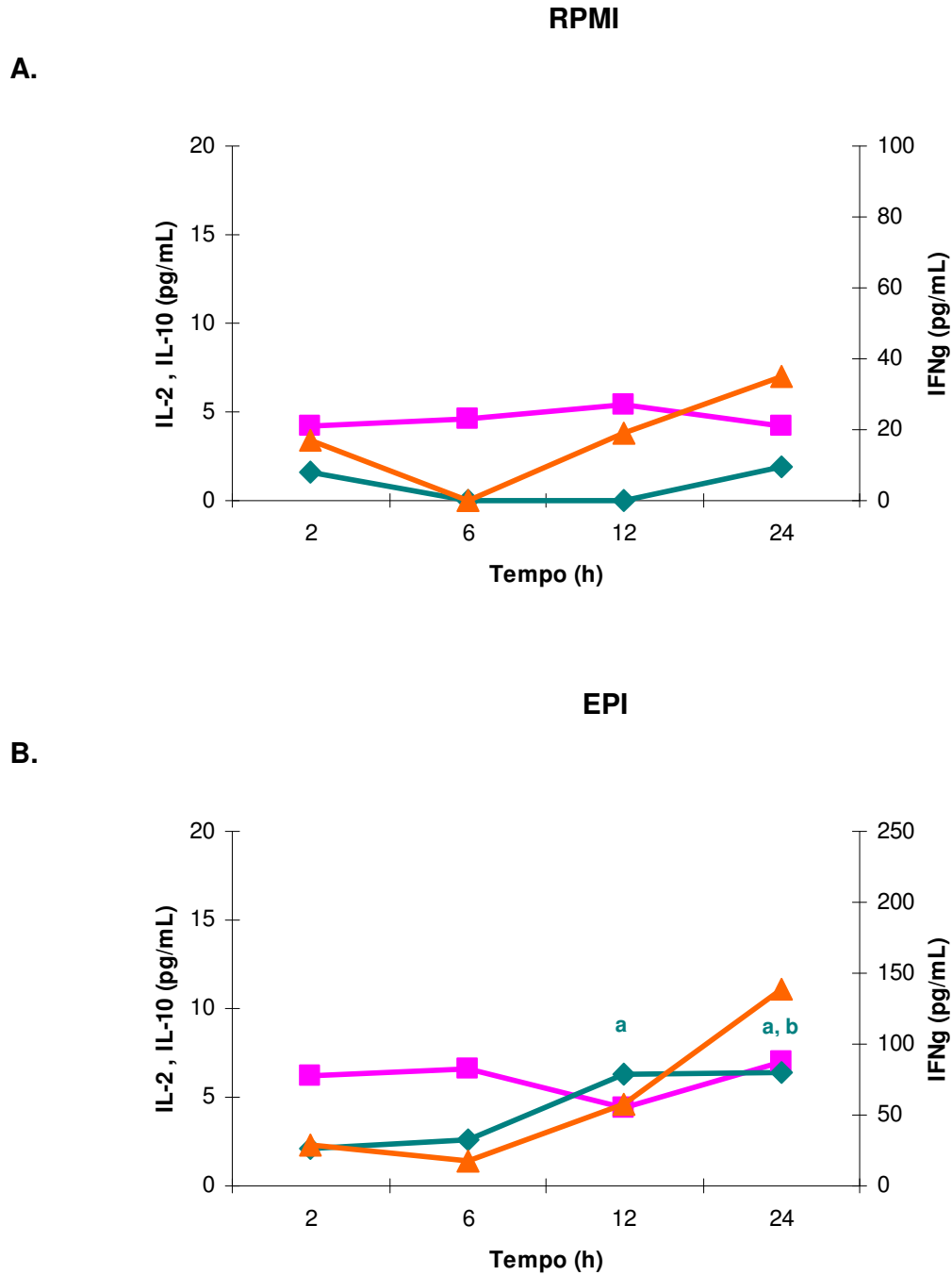


## **5.2 – Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por Células Mononucleares do Sangue Periférico de indivíduos do grupo Não Infectado.**

As cinéticas de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  nos sobrenadantes de culturas de CMSP dos indivíduos do grupo NI, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas na figura 2. Os dados estão expressos em pg/mL.

Células de indivíduos do grupo NI, na presença de RPMI, foram capazes de secretar IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  (Figura 2A). No entanto, quando estas células foram estimuladas por EPI observou-se produção significativa de IL-10 nos tempos 12 e 24 horas, em relação aos de duas ( $p=0,0079$ ) e seis horas ( $p=0,0159$ ) - (Figura 2B).

A produção de IL-10 por células de indivíduos NI sugere também haver um mecanismo de regulação Ag-inespecífico, possivelmente atuando no controle homeostático do sistema imune (resposta ao impacto de moléculas estranhas, independentemente da especificidade antigênica).



**FIGURA 2:** Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2=(■), IL-10=(◆) e IFN $\gamma$ =(▲), nos sobrenadantes das culturas na presença de **RPMI ou EPI** nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas). CMSP de indivíduos **NI** pelo *Trypanosoma cruzi*.

(A) Citocinas obtidas de culturas de CMSP na presença de RPMI, (B) Citocinas obtidas de culturas de CMSP após estimulação *in vitro* por antígenos EPI.

Observação: I - os dados estão em pg/mL.; II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das citocinas.

**a-** Diferença estatística da secreção da citocina IL-10 nos tempos 12 e 24 horas em relação às duas horas.

**b-** Diferença estatística da secreção da citocina IL-10 nos tempo 24 horas em relação às seis horas

### 5.2.1 - Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos do grupo Não Infectado.

As cinéticas de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos do grupo NI, avaliados neste estudo, na presença de RPMI e na presença de EPI, estão representadas nas figuras 3 e 4 respectivamente. Os dados estão expressos em intensidade média de fluorescência (IMF)

Não se observou diferença significativa na IMF das moléculas CD25 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos do grupo NI, em todos os tempos estudados na presença de RPMI. No entanto a IMF da molécula CD28 apresentou uma queda significativa nos tempos seis ( $p=0,0317$ ) e 12 horas ( $p=0,0159$ ) em relação às duas horas iniciais de cultura (Figura 3A).

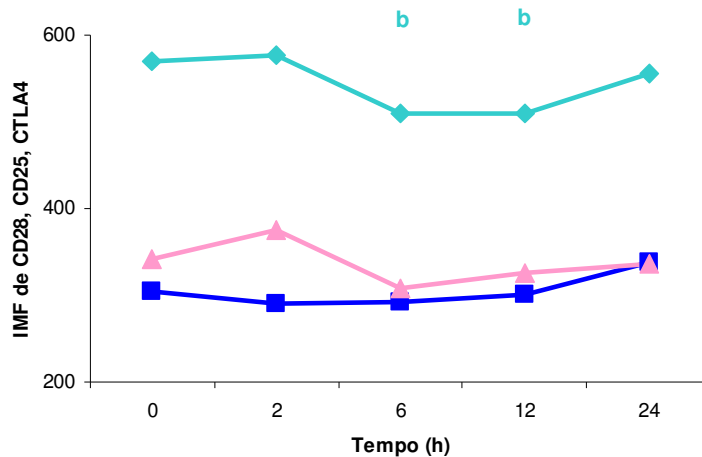
Nas culturas estimuladas com EPI, observou-se diminuição significativa da expressão da molécula CD28, nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no tempo 12 horas em relação ao tempo duas horas ( $0,0159$ ). Interessantemente, a molécula CD25 evidenciou queda significativa ( $p=0,0159$ ) no tempo de duas horas em relação à cultura sem estímulo (tempo 0), embora com 12 e 24 horas tenha sido observado aumento significativo ( $p=0,00079$  e  $p=0,0159$ , respectivamente) de expressão da molécula em relação ao tempo duas horas (Figura 3B).

A análise dos dados não mostrou diferença significativa na IMF das moléculas CD8 e CD25 na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos do grupo NI, na presença de RPMI ou EPI em todos os tempos estudados (Figuras 4A e 4B). No entanto observou-se diminuição significativa da expressão de CTLA-4 no tempo seis horas em relação ao tempo de duas horas ( $p=0,0159$ ) - (Figura 4B).

Células T CD4<sup>+</sup>

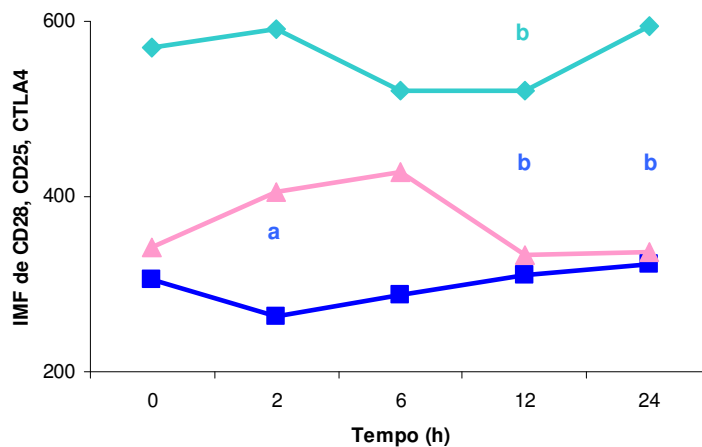
## RPMI

A.



## EPI

B.



**FIGURA 3:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28=(◆), CD25=(■) e CTLA-4=(▲) na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, na presença de RPMI ou EPI, de indivíduos NI pelo *T. cruzi*, nos diferentes tempos (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

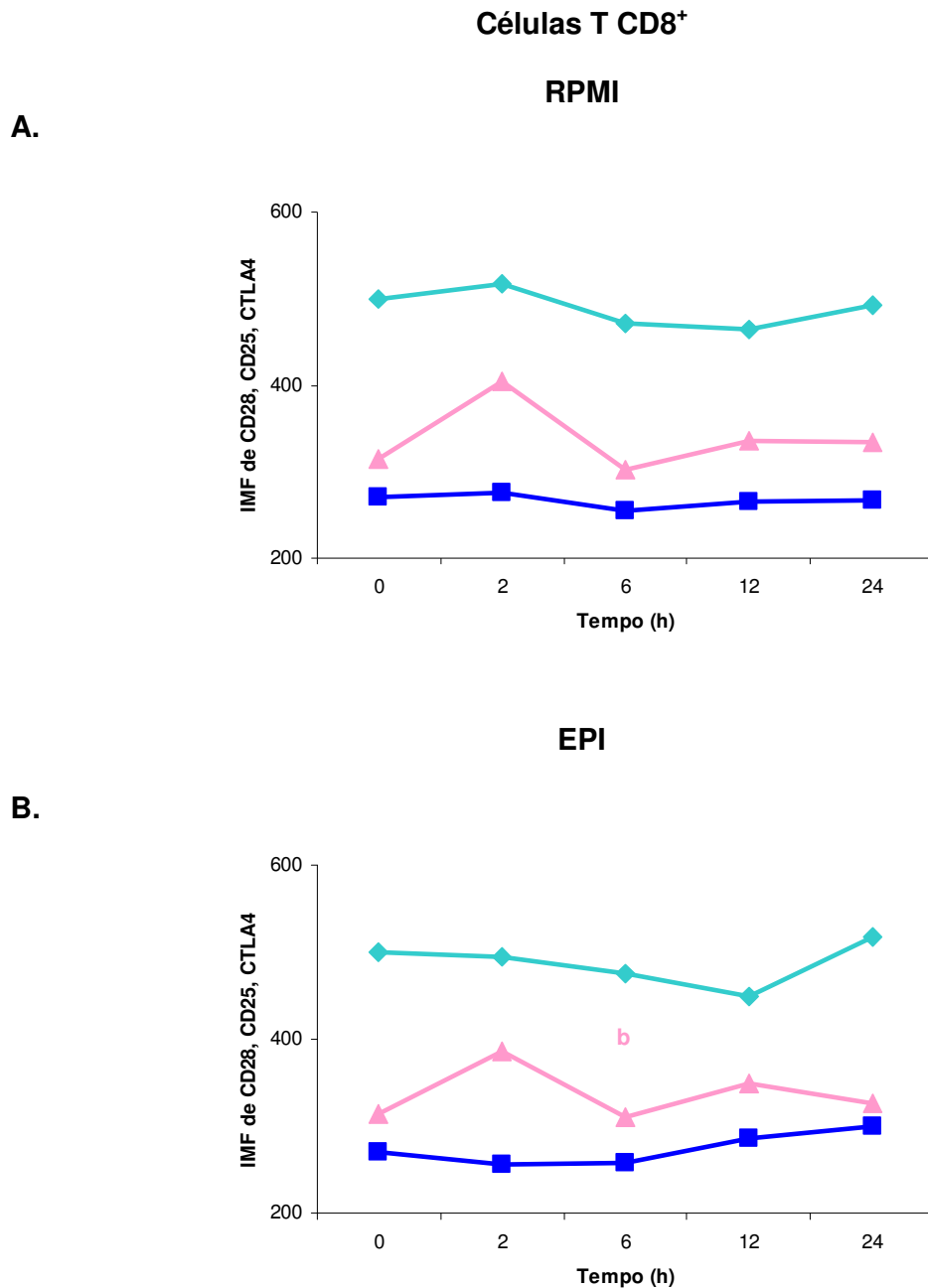
(A) linfócitos T CD4<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI.

T0 significa o tempo de avaliação das moléculas acessórias nas CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

a- Diferença estatística da IMF da molécula CD25 no tempo duas horas em relação ao tempo zero.

b- Diferença estatística da IMF da molécula CD28 nos tempos seis e 12 em relação às duas horas e da molécula CD25 nos tempos 12 e 24 em relação às duas horas.



**FIGURA 4:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas **CD28**=(◆), **CD25**=(■) e **CTLA-4**=(▲) na superfície de **linfócitos T CD8<sup>+</sup>**, na presença de **RPMI** ou **EPI**, de indivíduos **NI** pelo *T. cruzi*, nos diferentes tempos (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

(A) linfócitos T CD8<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI.

T0 significa o tempo de avaliação das moléculas acessórias em CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

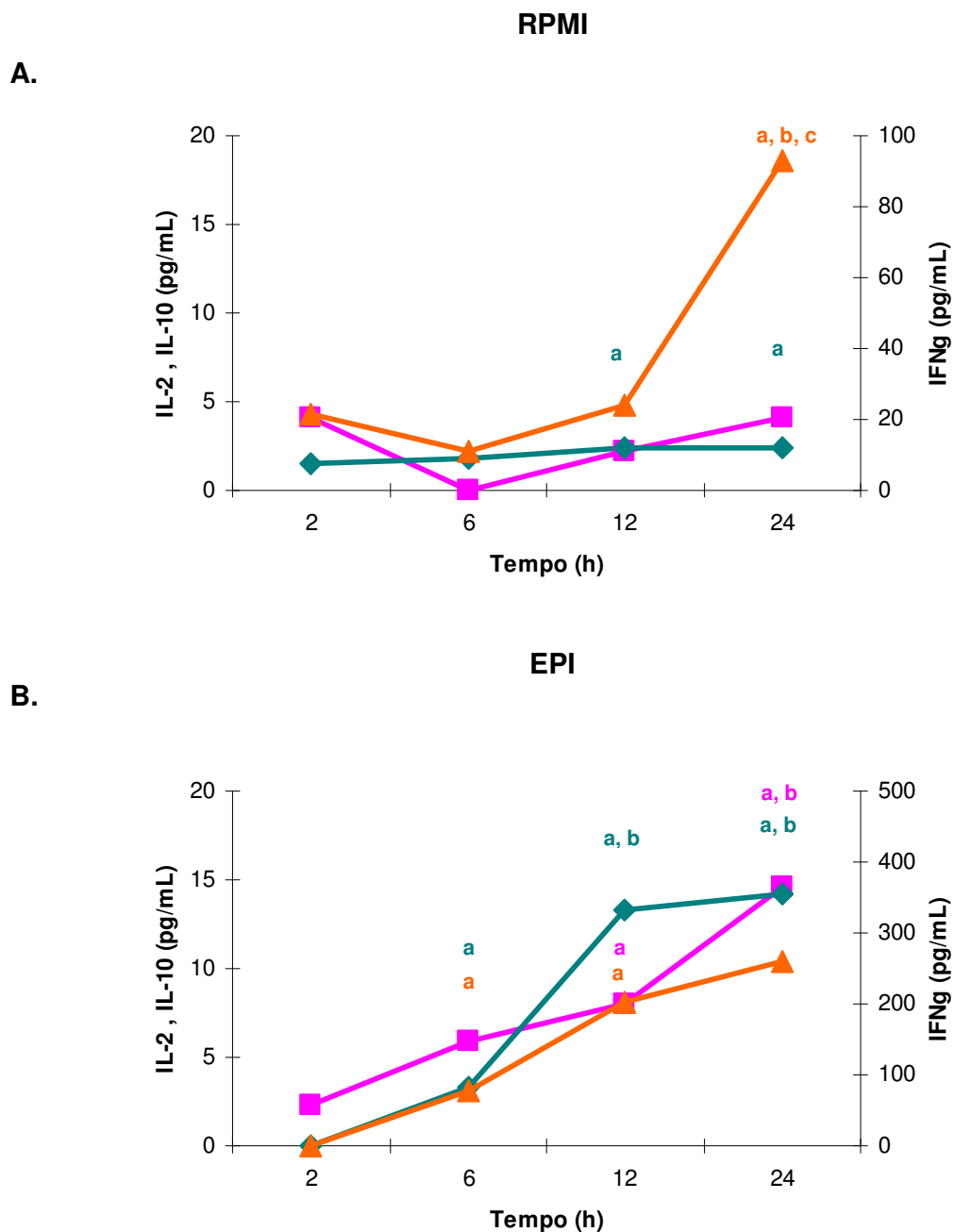
**b-** Diferença estatística da IMF da molécula CTLA-4 no tempo seis horas em relação às duas horas.

### **5.3 - Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por Células Mononucleares do Sangue Periférico de pacientes do grupo Indeterminado.**

A cinética de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  no sobrenadante das culturas de CMSP dos pacientes do grupo IND, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas na figura 5. Os dados estão expressos em pg/mL.

Em presença de RPMI, não se observou diferença significativa na secreção da citocina IL-2 durante as 24 horas de cultura. No entanto, observou-se aumento na secreção de IL-10, nos tempo 12 ( $p=0,0411$ ) e 24 horas ( $p=0,0649$ ) em relação ao tempo de duas horas. A secreção de IFN $\gamma$  no tempo 24 horas apresentou-se aumentada em relação aos tempos de duas ( $p=0,0087$ ), seis ( $p=0,0260$ ) e 12 horas ( $p=0,0260$ ) - (Figura 5A).

Na presença de EPI, a análise dos dados mostra aumento significativo na secreção da citocina IL-2 por CMSP dos pacientes do grupo IND no tempo 12 horas em relação ao tempo duas horas ( $p=0,0043$ ) e no tempo 24 horas relação aos tempos de duas ( $p=0,0022$ ) e seis horas ( $p=0,0087$ ). Quanto à de IL-10, houve um aumento nos tempos seis ( $p=0,0022$ ), 12 ( $p=0,0022$ ) e 24 horas ( $p=0,0022$ ) em relação às duas horas iniciais de cultura. Quanto ao IFN $\gamma$ , observou-se aumento nos tempos seis ( $p=0,0087$ ) e 12 horas ( $p=0,0022$ ) em relação às duas horas (Figura 5B).



**FIGURA 5:** Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2=( $\blacksquare$ ), IL-10=( $\blacklozenge$ ) e IFN $\gamma$ =( $\blacktriangle$ ), nos sobrenadantes das culturas, na presença de **RPMI** ou **EPI** nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas).

CMSP obtidas de pacientes com a forma clínica **IND**.

(A) Citocinas obtidas de culturas de CMSP na presença de **RPMI**, (B) Citocinas obtidas de culturas de CMSP após estimulação *in vitro* por antígenos **EPI**.

Observação: I - os dados estão em pg/mL.; II – a cor utilizada nas letras é relativa à cor das citocinas.

**a-** Diferença estatística da secreção das citocinas IL-10 e IFN $\gamma$  nos tempos seis horas em relação às duas horas e das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  nos tempos 12 e 24 horas em relação às duas horas.

**b-** Diferença estatística da secreção da citocina IL-10 no tempo 12 em relação às seis horas e das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  no tempo 24 horas em relação às seis horas.

**c-** Diferença estatística da secreção da citocina IFN $\gamma$  no tempo 24 horas em relação às 12 horas.

### 5.3.1 - Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes do grupo Indeterminado.

A cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes do grupo IND, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas nas figuras 6 e 7, respectivamente. Os dados estão expressos em IMF.

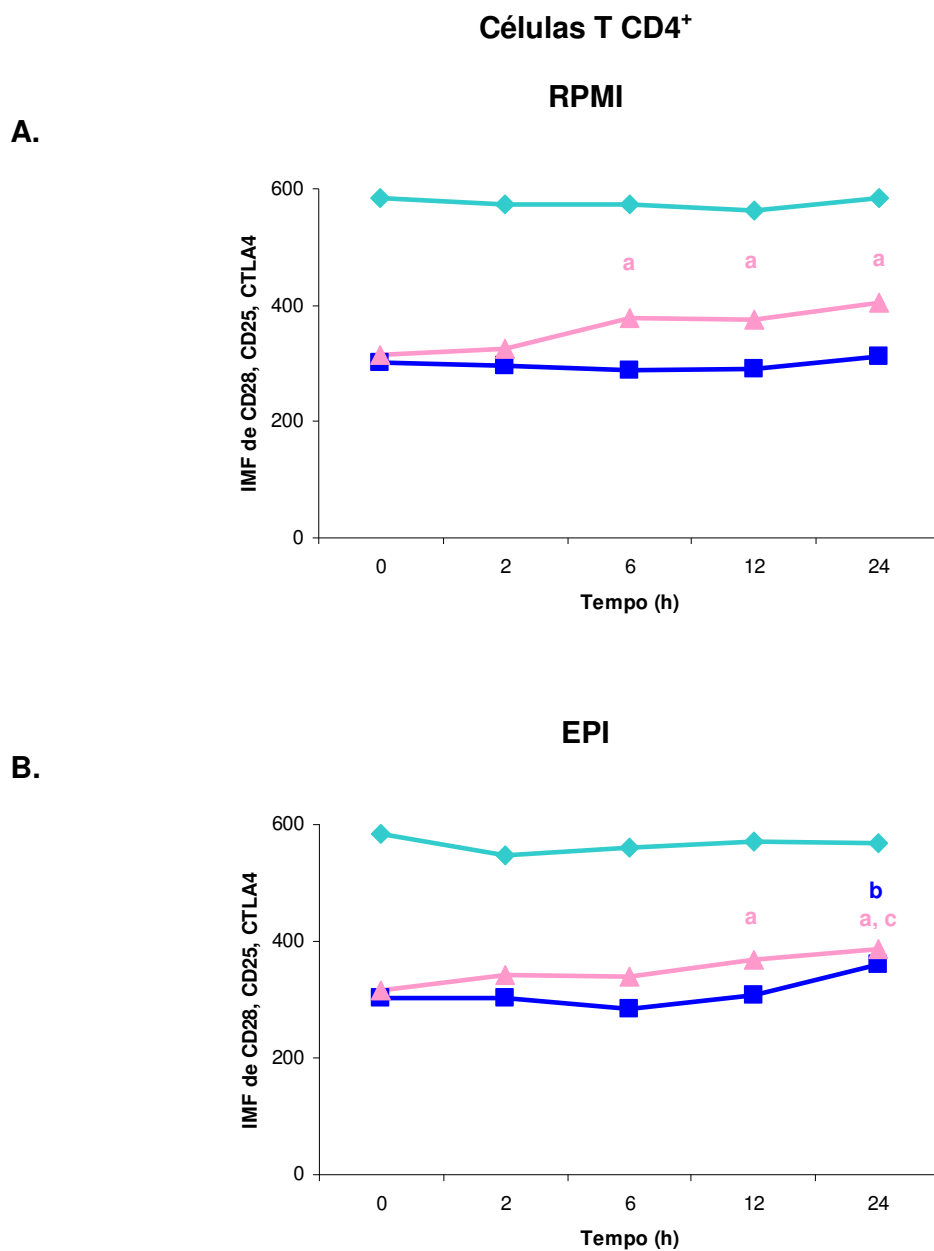
Não se observou diferença significativa na IMF de CD28, CD25 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo IND, na presença de RPMI em todos os tempos estudados. No entanto, evidenciou-se aumento significativo na IMF da molécula CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo IND nos tempos seis ( $p=0,0260$ ), 12 ( $p=0,0411$ ) e 24 horas ( $p=0,0022$ ) em relação ao tempo 0 - sem estímulo (Figura 6A).

Na presença de EPI, não se observou diferença significativa na IMF de CD28 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo IND em todos os tempos estudados. No entanto, evidenciou-se aumento na IMF da molécula CD25 no tempo 24 horas, em relação ao tempo duas horas ( $p=0,0411$ ), e observou-se, também, aumento na expressão da molécula CTLA-4 no tempo 12 horas em relação ao tempo 0 - sem estímulo ( $p=0,0152$ ). No tempo 24 horas, observou-se aumento da IMF de CTLA-4 em relação à cultura sem estímulo ( $p=0,0043$ ) e em relação à cultura de seis horas ( $p=0,0411$ ) - (Figura 6B).

Quanto à análise da expressão das moléculas na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, não houve diferença significativa na IMF das moléculas CD28 e CD25 em presença de RPMI em todos os tempos estudados. Já a molécula CTLA-4 apresentou-se aumentada no tempo 24 horas em relação ao tempo duas horas ( $p=0,0411$ ) - (Figura 7A).

Na presença de EPI, observou-se aumento na expressão da molécula CD25 na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tempo 24 horas em relação às seis horas ( $p=0,0411$ ) enquanto a molécula CTLA-4 apresentou-se aumentada na superfície destas células no tempo 12 horas em relação às duas horas ( $p=0,026$ ) - (Figura 7B).





**FIGURA 6:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas **CD28**(◆), **CD25**(■) e **CTLA-4**(▲) na superfície de **linfócitos T CD4<sup>+</sup>**, na presença de **RPMI** ou **EPI**, de pacientes com a forma clínica **IND**, nos diferentes tempos (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

(A) linfócitos T CD4<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI.

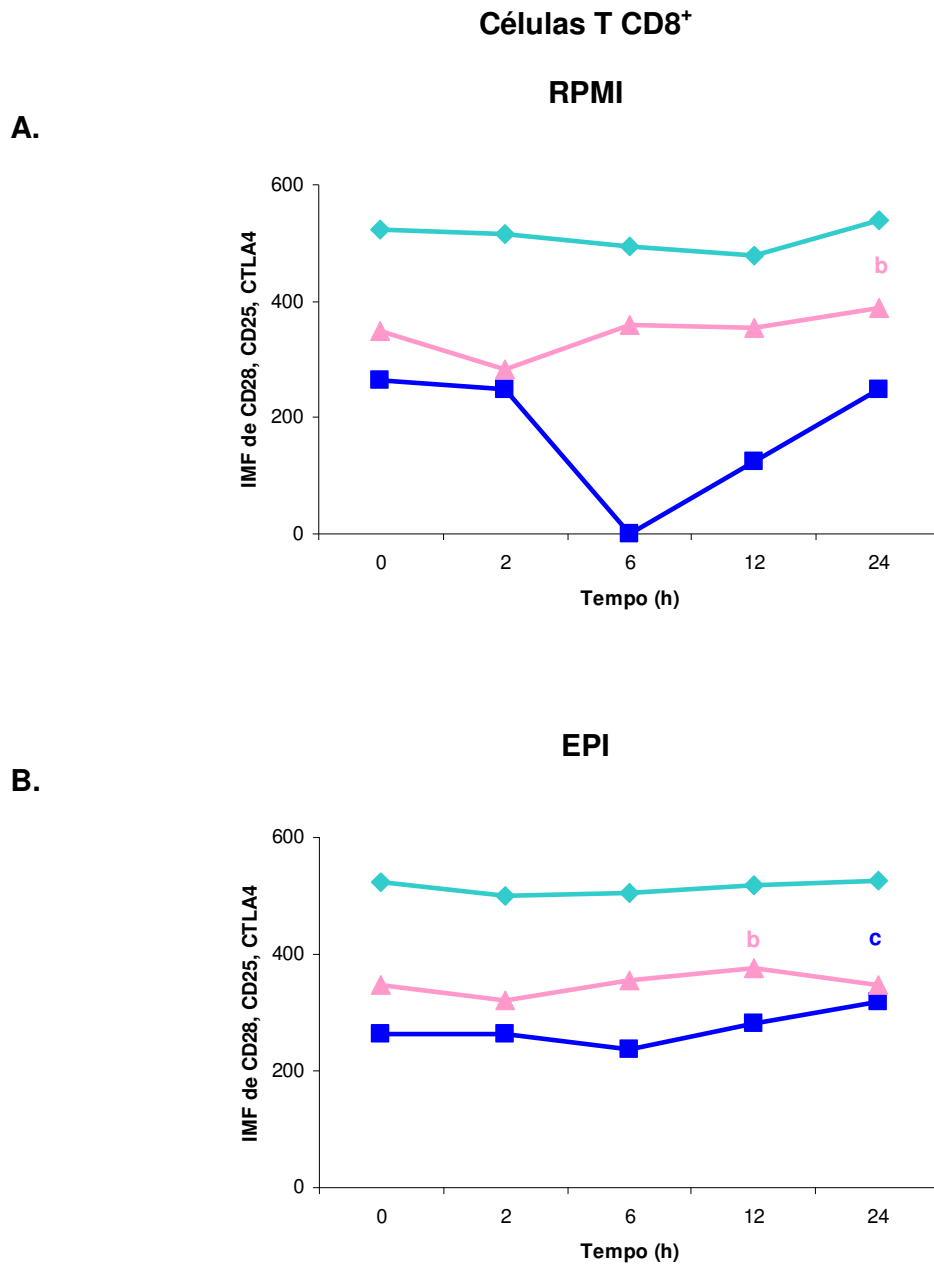
T0 significa, tempo de avaliação das moléculas acessórias nas CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

**a-** Diferença estatística da IMF da molécula CTLA-4 nos tempos seis, 12 e 24 horas em relação ao tempo zero.

**b-** Diferença estatística da IMF da molécula CD25 no tempo 24 horas em relação às duas horas.

**c-** Diferença estatística da IMF da molécula CTLA-4 no tempo 24 horas em relação às seis horas.



**FIGURA 7:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas **CD28** (◆), **CD25** (■) e **CTLA-4** (▲) na superfície de **linfócitos T CD8<sup>+</sup>** obtidas de CMSP, na presença de **RPMI** ou **EPI**, de pacientes com a forma clínica **IND** nos diferentes tempos (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

(A) linfócitos T CD4<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI.

T0 significa, tempo de avaliação das moléculas acessórias nas CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

**b-** Diferença estatística da IMF da molécula CTLA-4 nos tempos 12 e 24 em relação às duas horas.

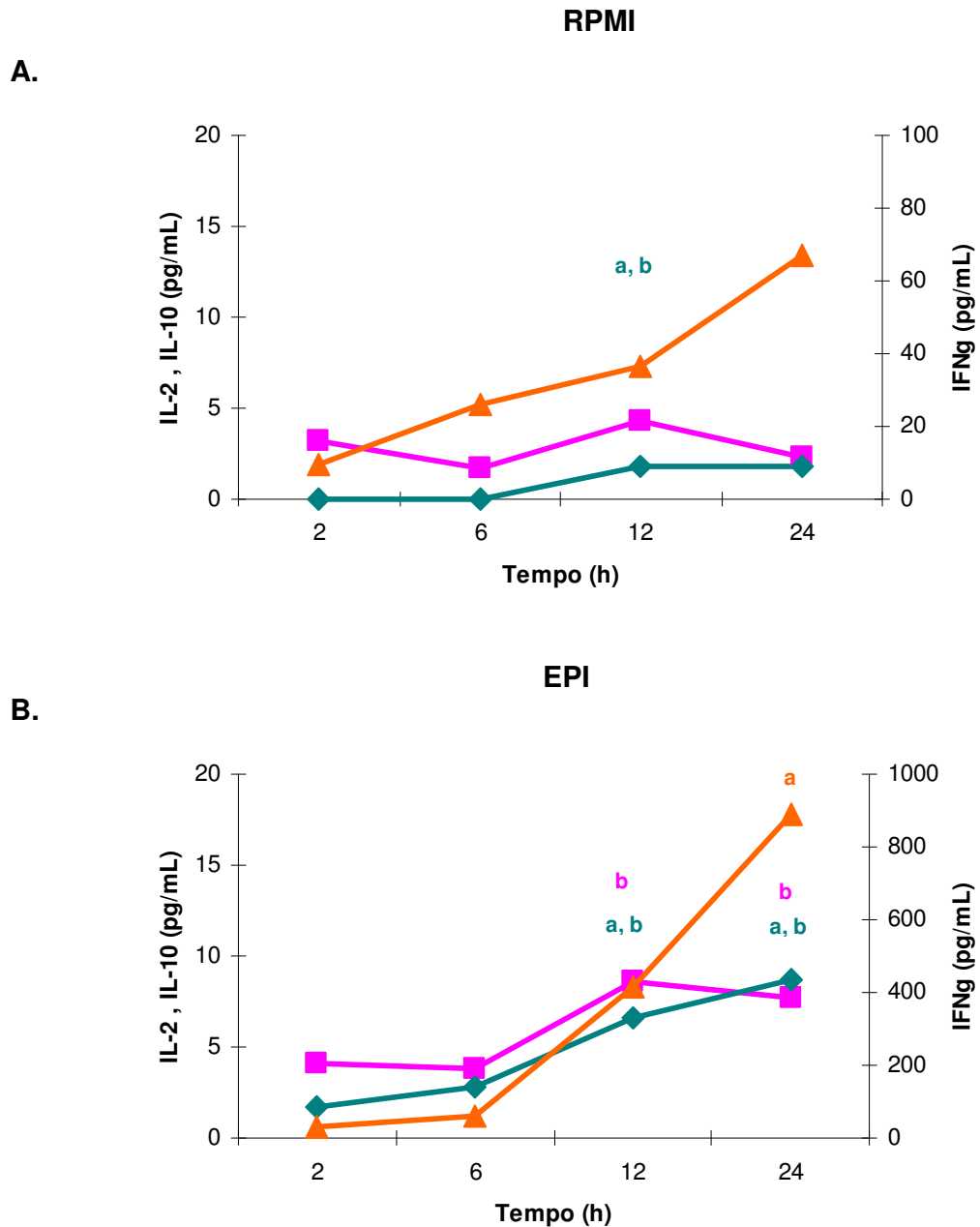
**c-** Diferença estatística da IMF da molécula CD25, no tempo 24 horas em relação às seis horas.

#### **5.4 - Cinética da secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ por Células Mononucleares do Sangue Periférico de pacientes do grupo Cardíaco**

As cinéticas de secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de CMSP dos pacientes do grupo CARD, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas na figura 8. Os dados estão expressos em pg/mL.

Em presença de RPMI, não se observou diferença significativa na secreção das citocinas IL-2 e IFN $\gamma$  por CMSP do grupo CARD em todos os tempos estudados. No entanto observou-se aumento na secreção de IL-10 nos tempos 12/24 horas em relação aos tempos de duas ( $p=0,0152$  /  $p=0,0649$ ) e seis horas ( $p=0,0260$  /  $p=0,0649$ ) - (Figura 8A).

Em presença de EPI, evidenciou-se aumento na secreção de IL-2 nos tempos 12 ( $p=0,0152$ ) e 24 horas ( $p=0,0260$ ) em relação às seis horas. Observou-se, também, aumento na secreção de IL-10 nos tempos 12/24 horas em relação aos tempos de duas ( $p=0,0022$ ) e seis horas ( $p=0,0043$ ), com o mesmo grau de significância. Quanto à secreção do IFN $\gamma$  observou-se aumento no tempo 24 horas em relação às duas horas iniciais ( $p=0,0411$ ) - (Figura 8B).



**FIGURA 8:** Análise das cinéticas de secreção das citocinas IL-2= (■), IL-10= (◆) e IFN $\gamma$ = (▲), nos sobrenadantes das culturas na presença de **RPMI** ou **EPI** nos diferentes tempos de cultura (duas, seis, 12 e 24 horas), por CMSP obtidas de pacientes com a forma clínica **CARD**.

(A) Citocinas obtidas de culturas de CMSP na presença de RPMI, (B) Citocinas obtidas de culturas de CMSP após estimulação *in vitro* por antígenos EPI.

Observação: I - os dados estão em pg/mL.; II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das citocinas.

**a-** Diferença estatística da secreção da citocina IL-10 nos tempos 12 e 24 horas em relação ao tempo duas horas e da citocina IFN $\gamma$  no tempo 24 horas em relação às duas horas

**b-** Diferença estatística da secreção das citocinas IL-2 e IL-10 nos tempos 12 e 24 horas em relação às seis horas.

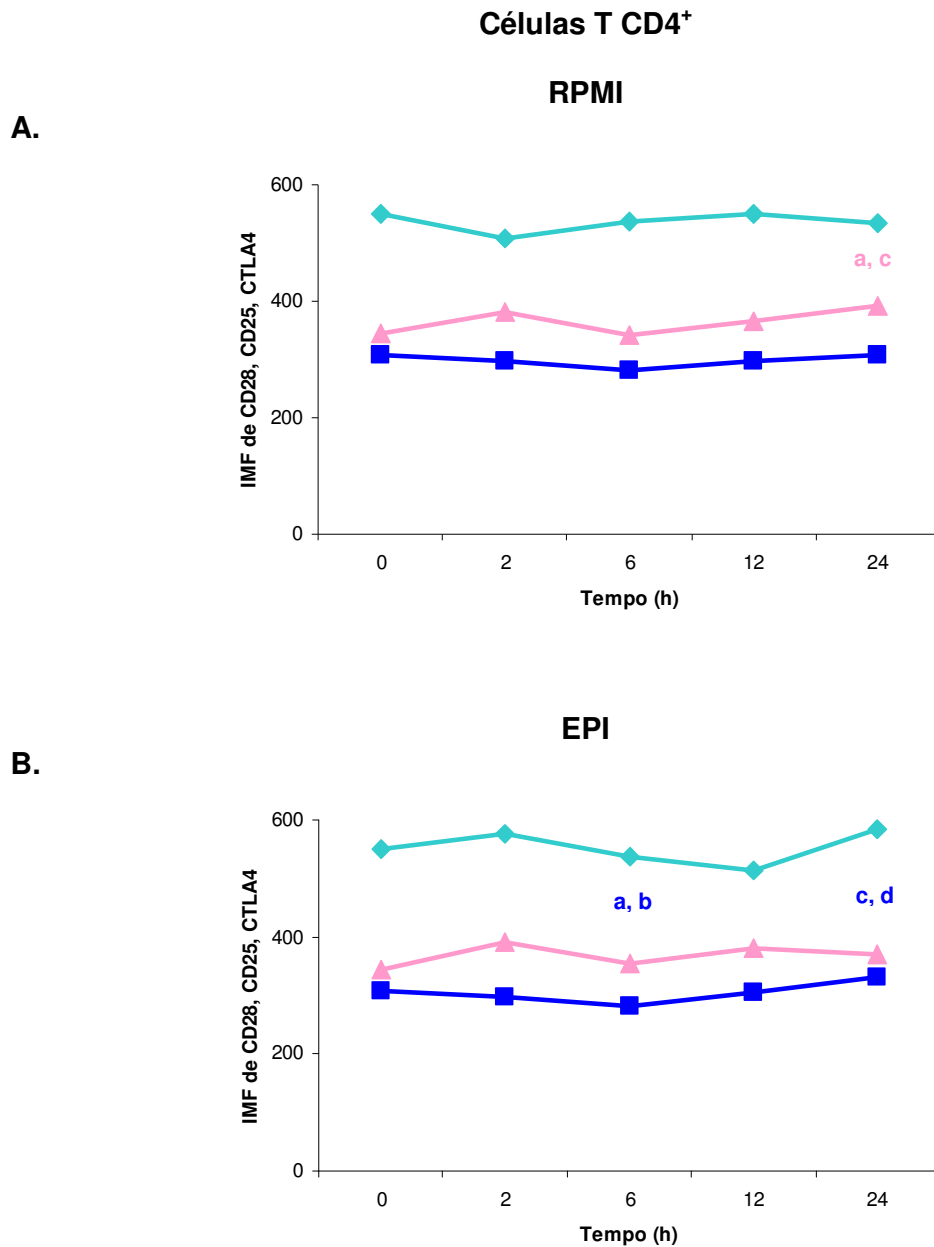
#### 5.4.1 - Cinética de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes do grupo Cardíaco

As cinéticas de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes do grupo CARD, na presença de RPMI ou de EPI, estão representadas na figuras 9 e 10 respectivamente. Os dados estão expressos em IMF.

Não se observou diferença significativa na IMF de CD28 e CD25 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo CARD, na presença de RPMI em todos os tempos estudados. No entanto, foi possível observar aumento significativo na IMF da molécula CTLA-4 no tempo 24 horas em relação ao tempo zero ( $p=0,0043$ ) e ao tempo de seis horas ( $p=0,0087$ ) - (Figuras 9A).

Na presença de EPI, não se evidenciou diferença significativa na IMF de CD28 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo CARD em todos os tempos estudados. Já a molécula CD25 apresentou diminuição significativa no tempo de seis horas em relação à cultura sem estímulo –tempo zero- e à cultura estimulada por duas horas. No entanto, com 24 horas, foi observado um aumento significativo da IMF dessa molécula em LT CD4<sup>+</sup> em relação aos tempos seis ( $p=0,0022$ ) e 12 horas ( $p=0,0043$ ) - (Figura 9B).

Não se observou diferença significativa na IMF das moléculas CD28 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes do grupo CARD, na presença de RPMI ou EPI em todos os tempos estudados (Figuras 10A e 10B). Interessantemente, em presença de EPI, a molécula CD25 apresentou diminuição significativa ( $p=0,0411$ ) no tempo de duas horas em relação ao tempo zero; embora, com 12 e 24 horas ela tenha se apresentado significativamente aumentada em relação às duas horas de cultura ( $p=0,0152$  e  $p=0,0411$ , respectivamente) - (Figura 10B).



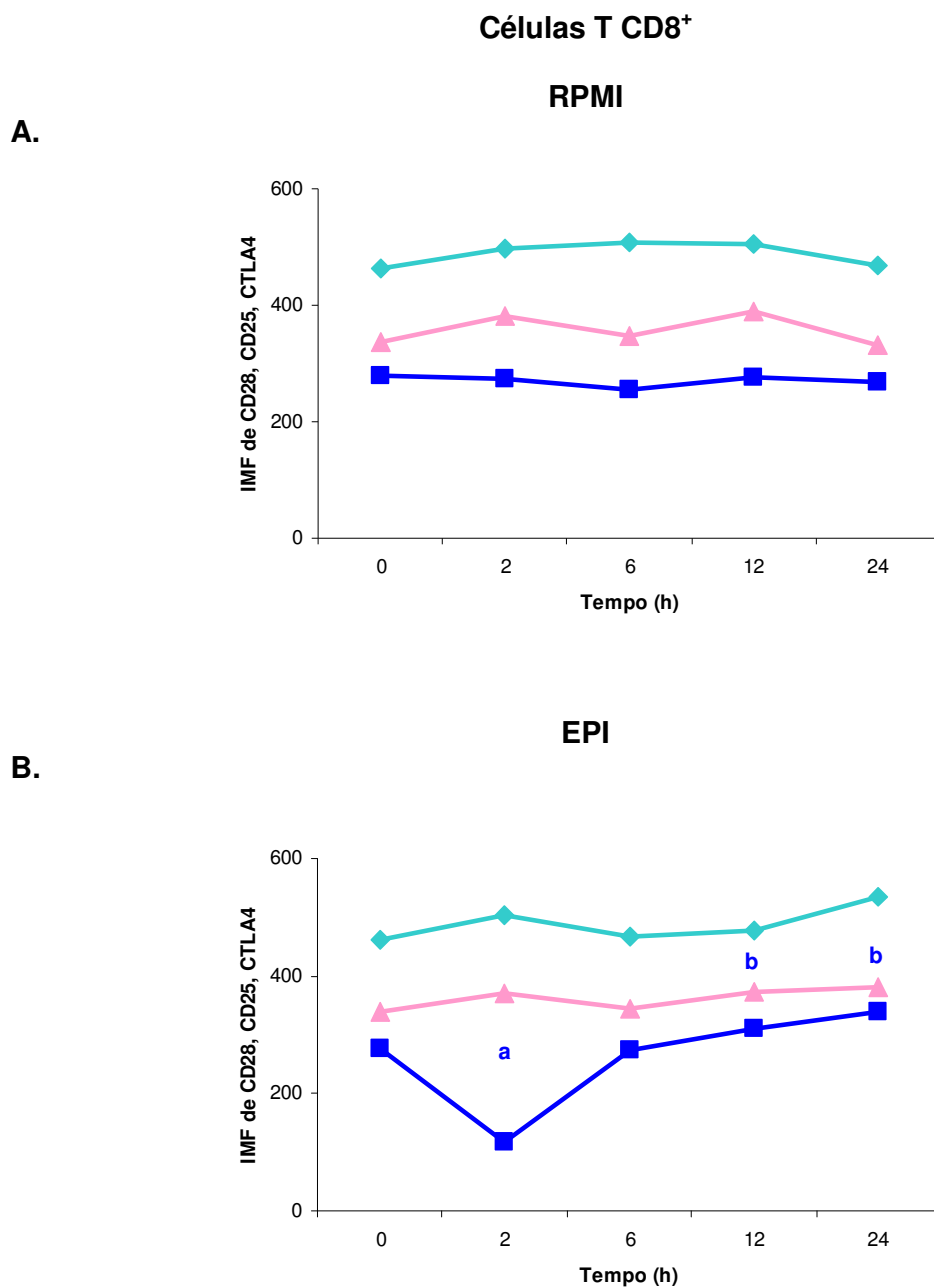
**FIGURA 9:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28(◆), CD25(■) e CTLA-4(▲) na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> obtidas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica CARD nos diferentes tempos de cultura (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

(A) linfócitos T CD4<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI,

T0 significa, tempo de avaliação das moléculas acessórias nas CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

- a- Diferença estatística da expressão da IMF da molécula CD25 no tempo seis horas em relação ao tempo zero e da molécula CTLA-4 no tempo 24 horas em relação ao tempo zero.
- b- Diferença estatística da expressão da IMF da molécula CD25, no tempo seis horas em relação às duas horas.
- c- Diferença estatística da expressão da IMF das moléculas CD25 e CTLA-4 no tempo 24 horas em relação às seis horas.
- d- Diferença estatística da expressão da IMF da molécula CD25, no tempo 24 horas em relação às 12 horas.



**FIGURA10:** Análise das cinéticas da expressão das moléculas CD28=(◆), CD25=(■) e CTLA-4=(▲) na superfície de linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtidas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, de pacientes com a forma clínica CARD nos diferentes tempos de cultura (0, duas, seis, 12 e 24 horas).

(A) linfócitos T CD4<sup>+</sup> cultivados na presença de RPMI, (B) linfócitos T CD8<sup>+</sup> após estimulação *in vitro* com antígenos EPI,

T0 significa, tempo de avaliação das moléculas acessórias nas CMSP, antes de cultura.

Observação: I - os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF); II – a cor utilizadas nas letras é relativa à cor das moléculas acessórias.

**a-** Diferença estatística da expressão da IMF da molécula CD25 no tempo duas horas em relação ao tempo zero.

**b-** Diferença estatística da expressão da IMF da molécula CD25, nos tempo 12 e 24 horas em relação às duas horas.

---

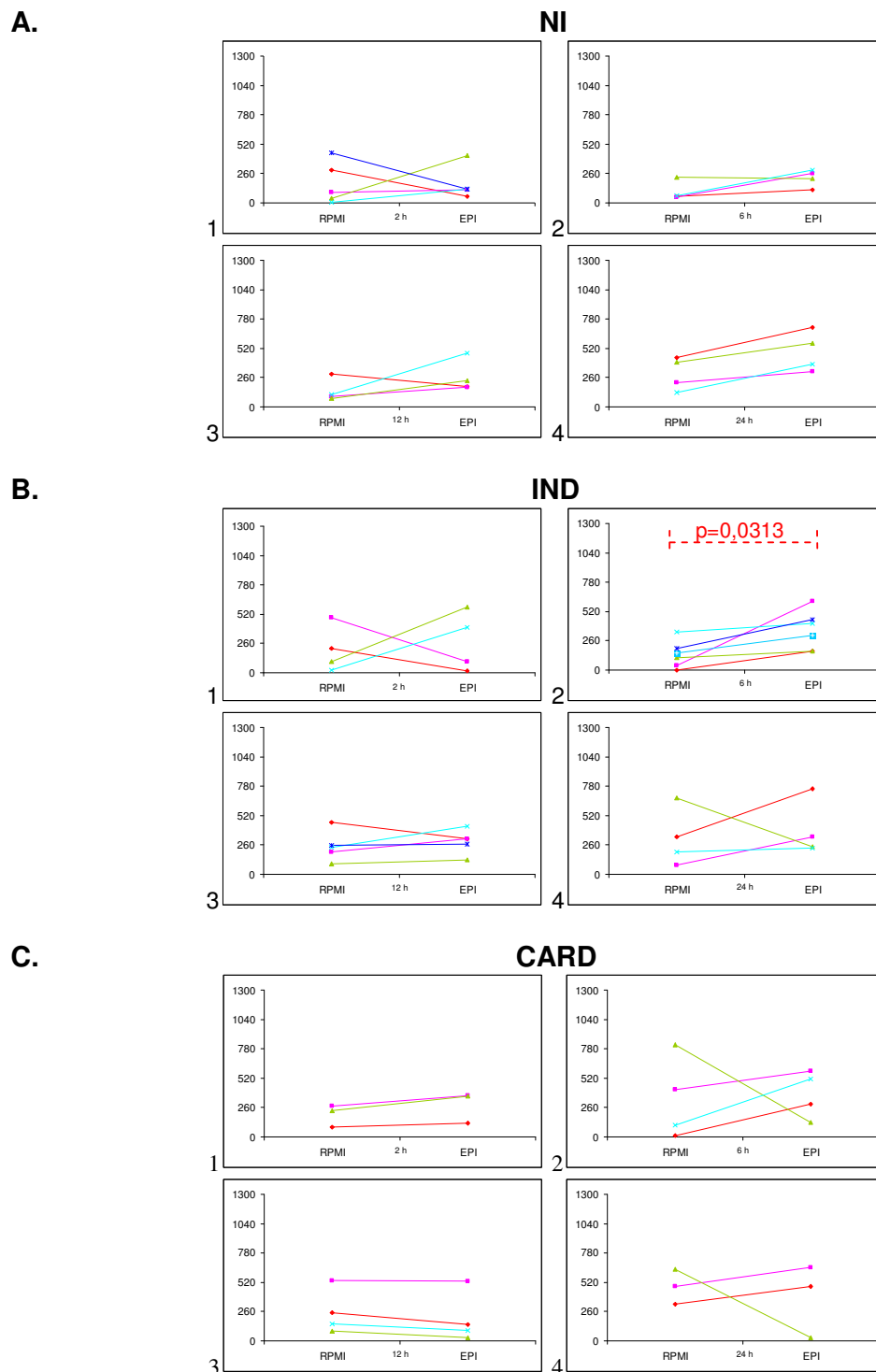
**PARTE B****5.5. – Moléculas produzidas na ausência de estímulo ou na presença de antígenos do *Trypanosoma cruzi***

As figuras 11, 12, 13 e 14 mostram os níveis de secreção dos mediadores PGE<sub>2</sub>, IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ , respectivamente, na presença de RPMI e EPI obtidos do sobrenadante de cada indivíduo dos grupos estudados (NI, IND e CARD) nos tempos duas, seis, 12 e 24 horas.

**5.5.1 – Produção de Prostaglandina-E<sub>2</sub> na presença e ausência de estímulo antigênico**

Os níveis de PGE<sub>2</sub> mostraram-se significativamente elevados, em função do impacto antigênico, apenas às seis horas ( $p=0,0313$ ) nos sobrenadantes do grupo IND (Figura 11-B2).





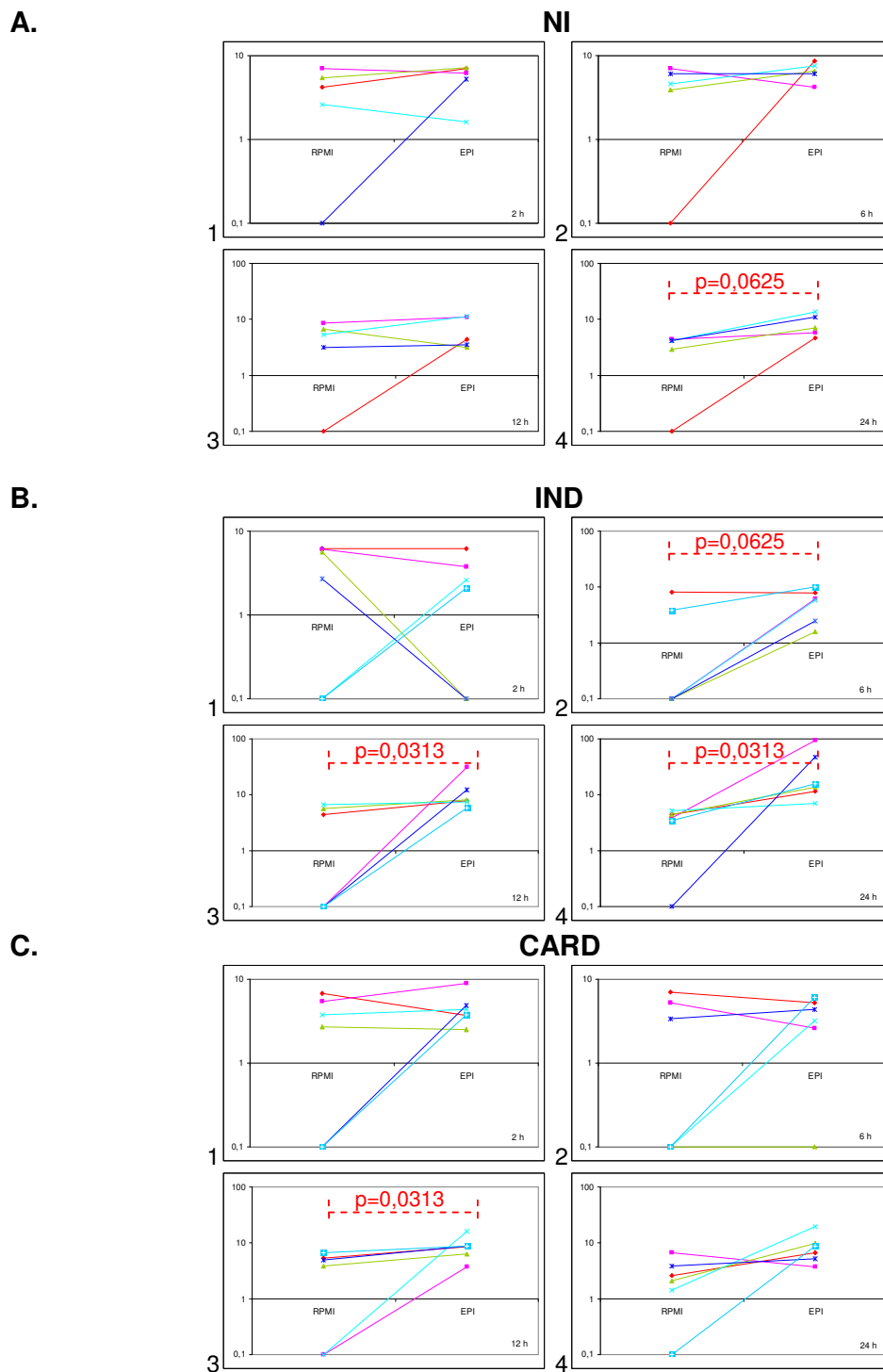
**FIGURA 11:** Análise da secreção de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Observação: os dados estão em pg/mL. Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

### 5.5.2 – Produção de Citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ na presença e ausência de estímulo antigênico

Observou-se que, nos sobrenadantes do grupo NI, a presença do antígeno provocou um aumento nos níveis de IL-10 as seis, 12 e 24 horas ( $p=0,0625$ ) - (Figuras 13 A2, A3 e A4), enquanto os níveis de IL-2 e IFN $\gamma$  foram observados maiores apenas em 24 horas em relação à cultura não estimulada (Figuras 12- A4 e 14- A4, respectivamente). Este perfil foi semelhante ao observado nos sobrenadantes do grupo CARD, no qual a IL-10 em seis, 12 e 24 horas mostrou-se significativamente elevada ( $p=0,0313$ ) - (Figuras 13 C2, C3 e C4), a IL-2 em 12 horas ( $p=0,0313$ ) - (Figura 12-C3). e o IFN $\gamma$  em 24 horas ( $p=0,0625$ ) - (Figura 14-C4). Nos sobrenadantes do grupo IND com duas horas o impacto antigênico promoveu maior secreção de IFN $\gamma$  ( $p=0,0625$ ) - (Figura 14-B1), que se mantém elevado em seis ( $p=0,0625$ ) e 12 horas ( $p=0,0313$ ) - (Figuras 14- B2 e B3, respectivamente). Em contrapartida, os níveis de IL-10 e IL-2 foram maiores em seis, 12 e 24 horas ( $p=0,0313$ ) - (Figuras 13- B2, B3 e B4 e figuras 12- B2, B3 e B4, respectivamente).

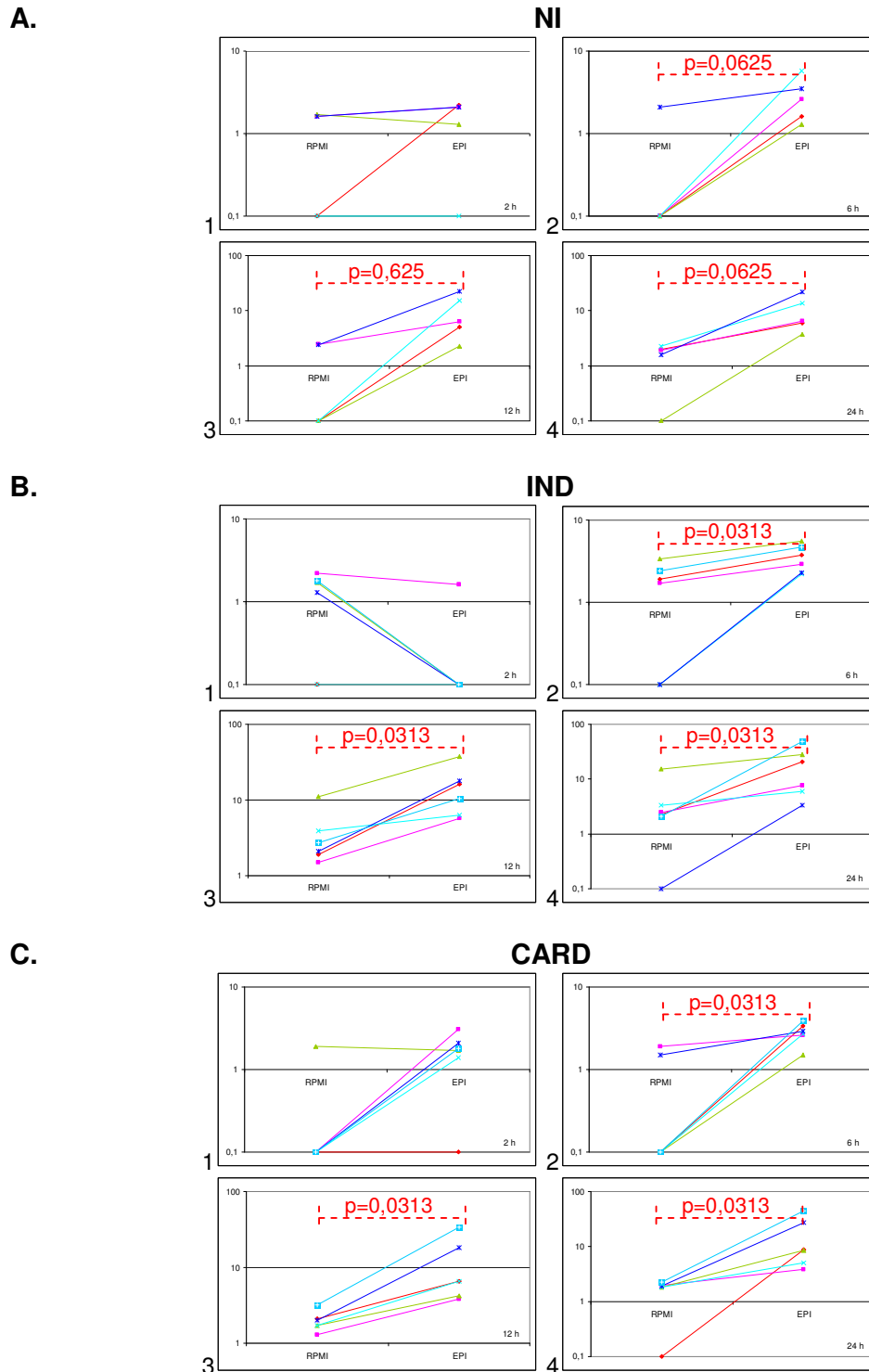


**FIGURA 12:** Análise da secreção de IL-2 nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Observação: os dados estão em pg/mL representados em escala logarítmica.

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

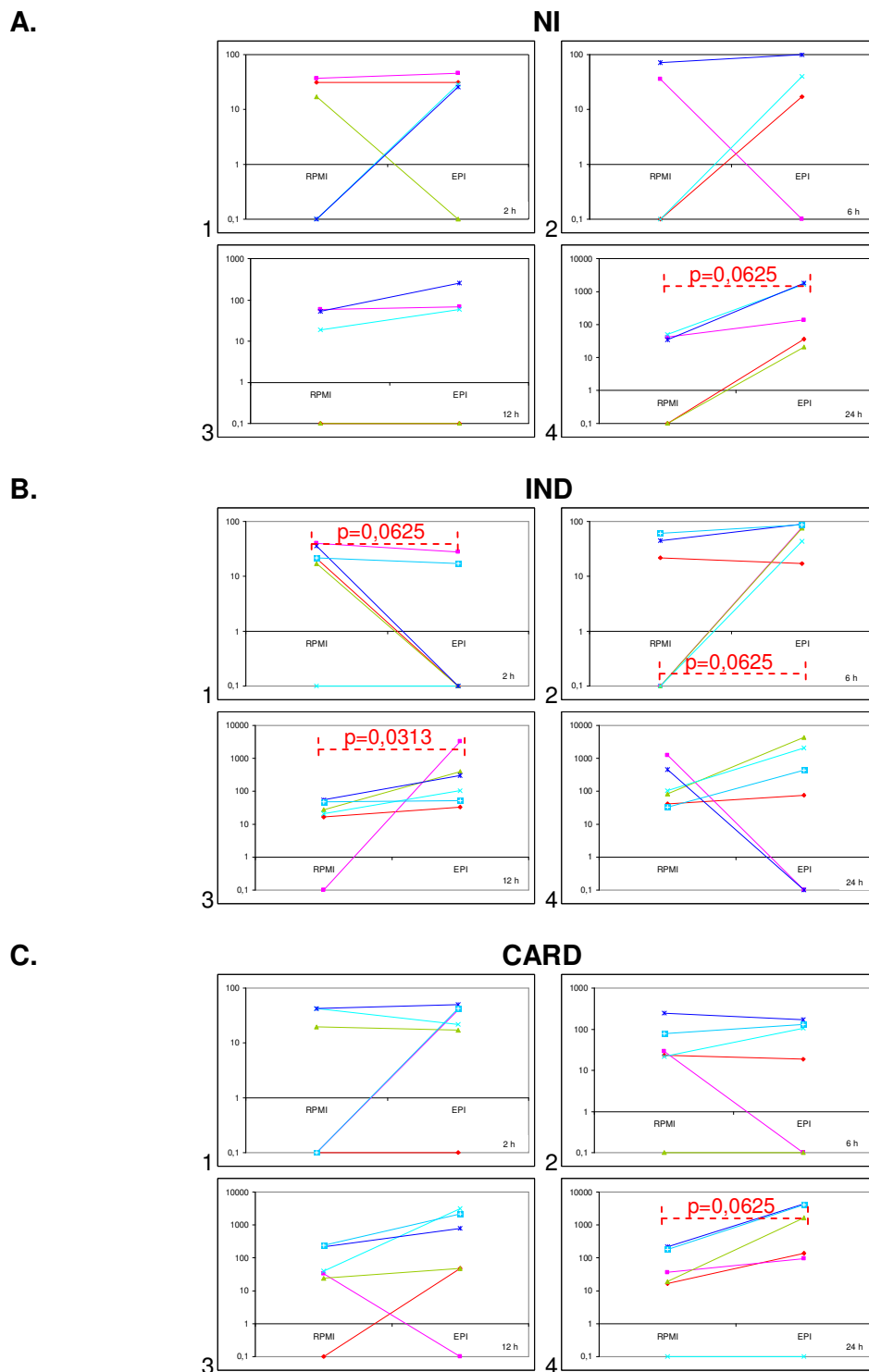


**FIGURA 13:** Análise da secreção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de **RPMI ou EPI**, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Observação: os dados estão em pg/mL representados em escala logarítmica.

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.



**FIGURA 14:** Análise da secreção de IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de CMSP, na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Observação: os dados estão em pg/mL representados em escala logarítmica.

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

### **5.6 – Intensidade Média de Fluorescência da expressão dos fenótipos CD28, CD25 e CTLA-4 em Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e Linfócitos TCD8<sup>+</sup>**

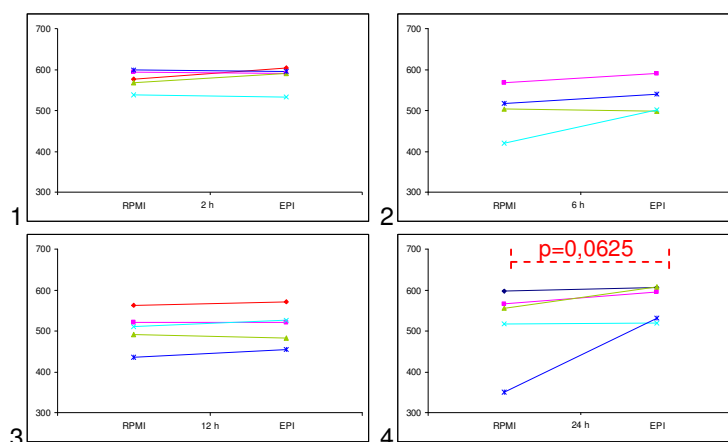
As figuras 15, 16 e 17 mostram a IMF de expressão das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de LTCD4<sup>+</sup>, enquanto que as figuras 18, 19 e 20 mostram a IMF destas moléculas em LTCD8<sup>+</sup>, na presença de RPMI e EPI, obtidos durante as culturas de CMSP de cada indivíduo dos grupos estudados (NI, IND e CARD) nos tempos duas, seis, 12 e 24 horas.

Nos LTCD4<sup>+</sup> do grupo NI, a presença de EPI promoveu aumento na IMF da molécula CD28 com 24 horas de cultivo ( $p=0,0625$ ) - (Figura 15-A4).

Nas células do grupo IND, o impacto antigênico promoveu diminuição na IMF da molécula CD28 nos LTCD4<sup>+</sup> ( $p=0,0625$ ) - (Figura 15-B4) - e da molécula CTLA-4 nos LTCD8<sup>+</sup> ( $p=0,0313$ ) - (Figura 17-B4). Não se observou qualquer alteração significativa na IMF das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 nos LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> dos pacientes do grupo CARD.

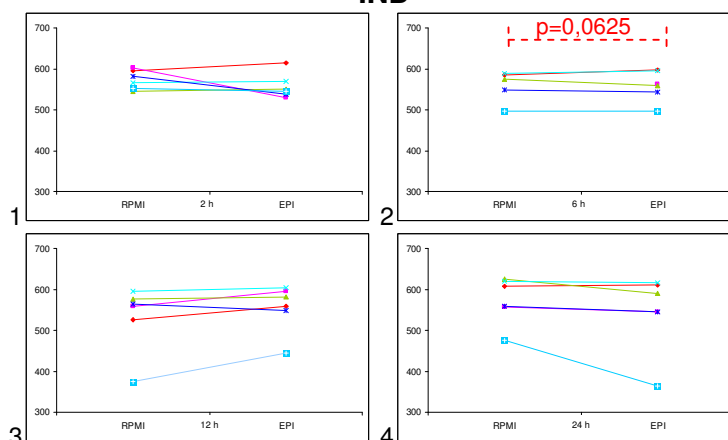
A.

NI



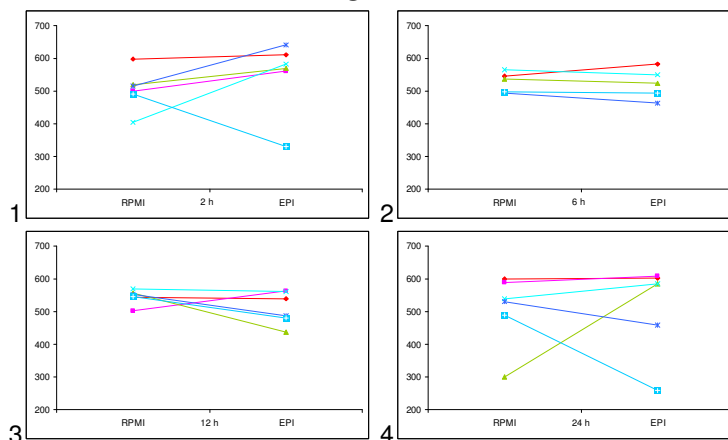
B.

IND



C.

CARD

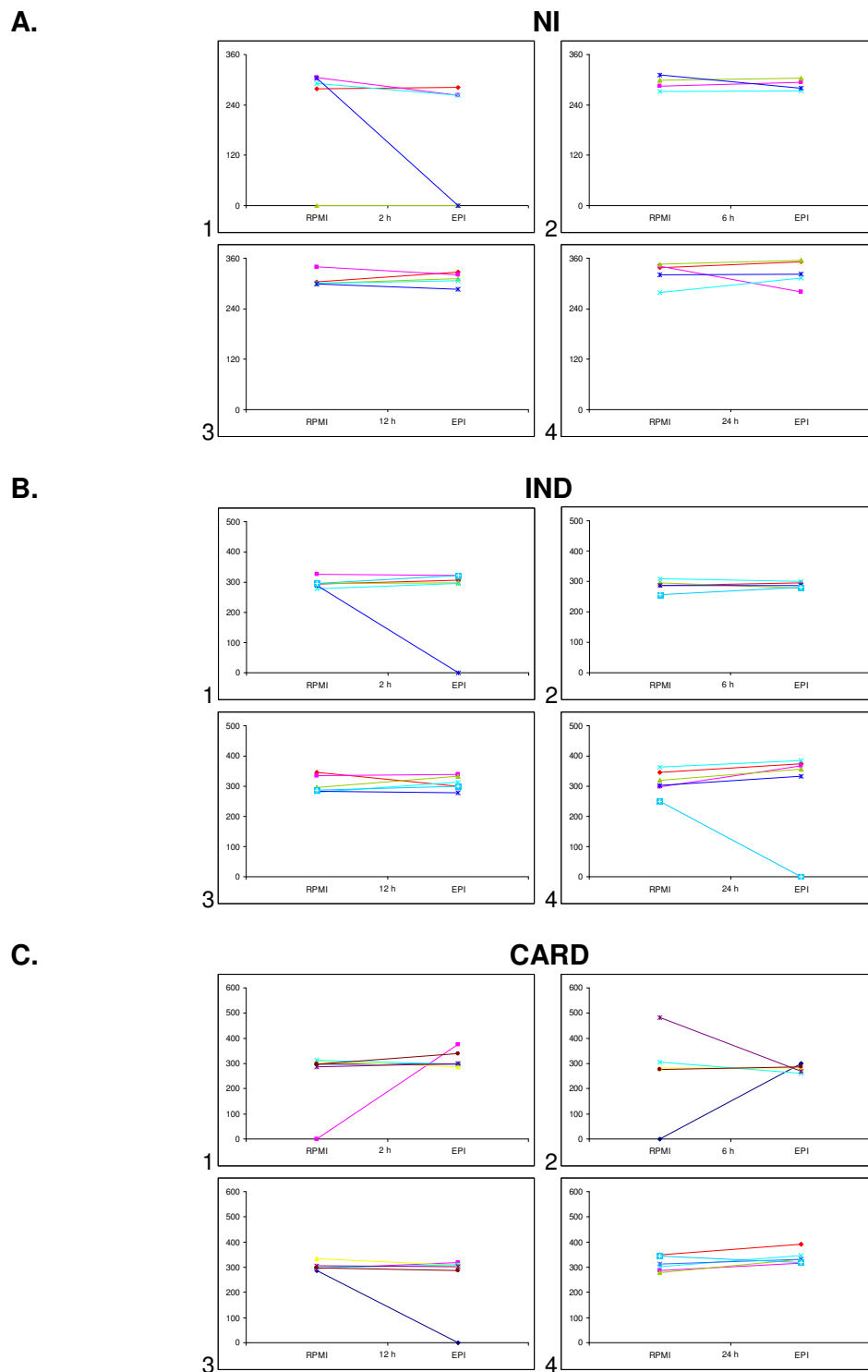


**FIGURA 15:** Análise da IMF da molécula CD28 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.



**FIGURA 16:** Análise da IMF da molécula CD25 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

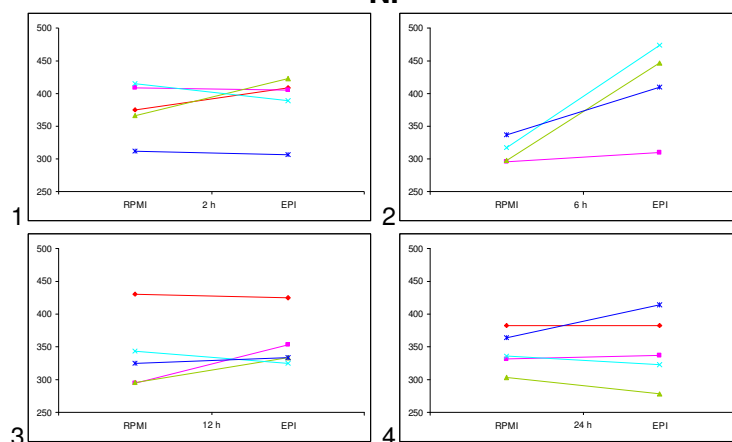
Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.



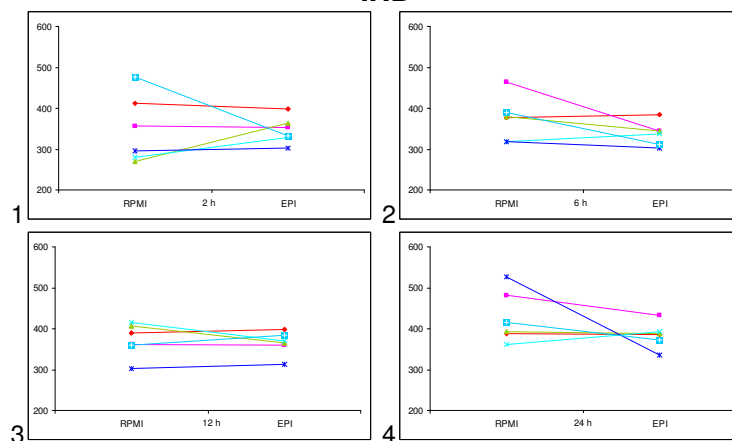
A.

NI



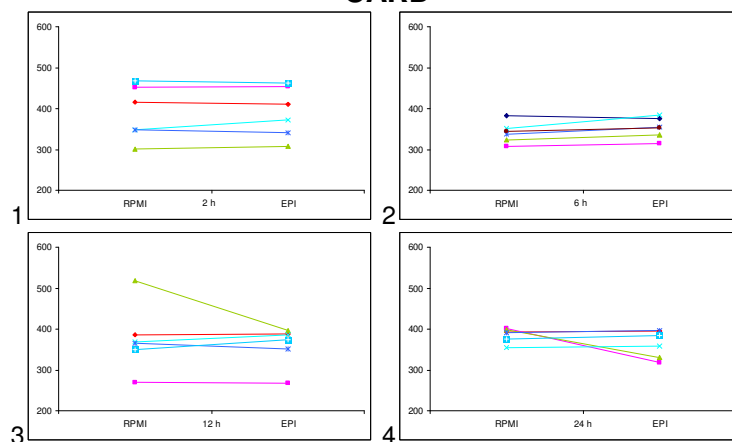
B.

IND



C.

CARD



**FIGURA 17:** Análise da IMF da molécula CTLA-4 em LTCD4<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

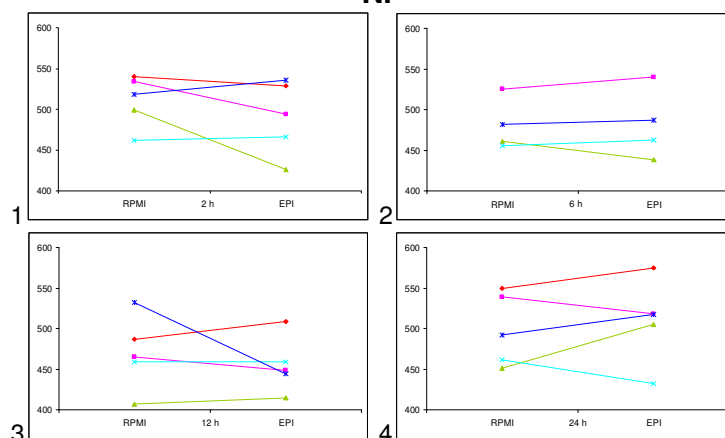
(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

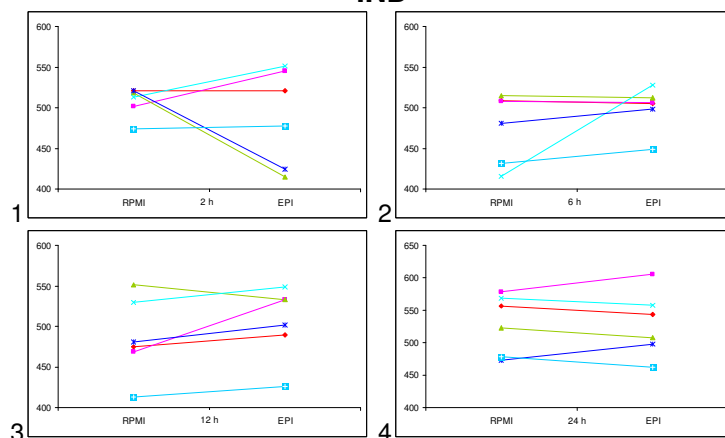
A.

NI



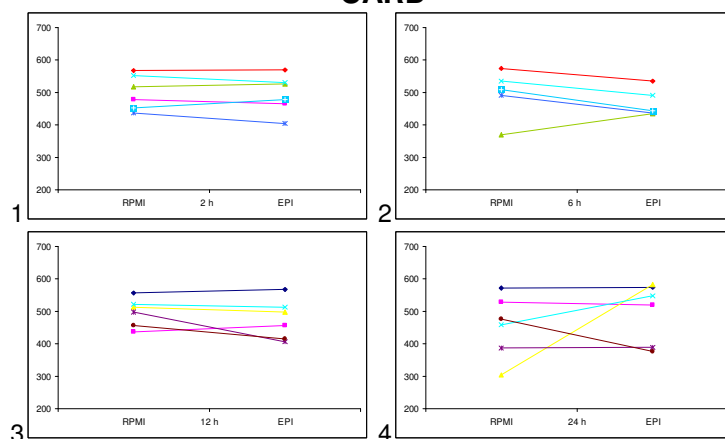
B.

IND



C.

CARD



**FIGURA 18:** Análise da IMF da molécula CD28 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

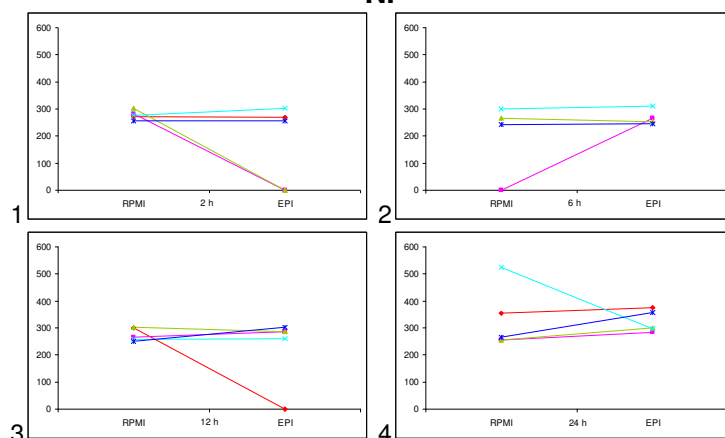
(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

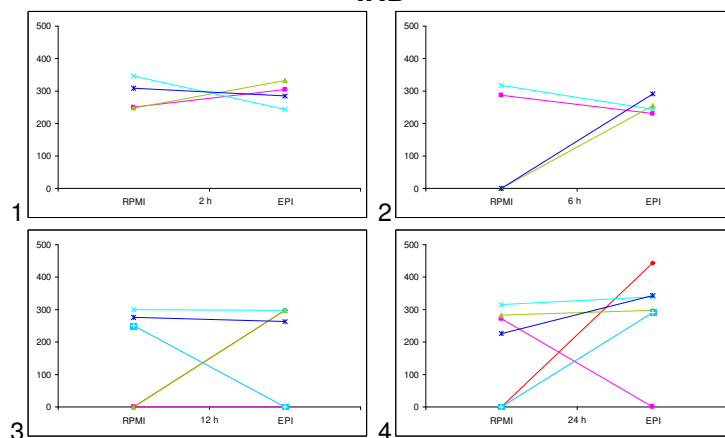
A.

NI



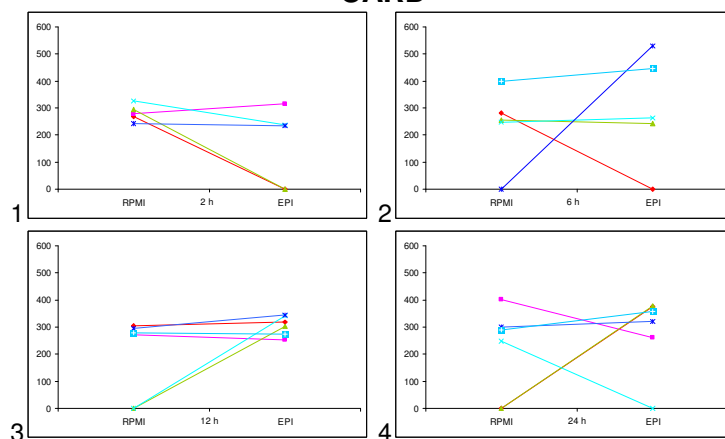
B.

IND



C.

CARD



**FIGURA 19:** Análise da IMF da molécula CD25 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de **RPMI** ou **EPI**, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

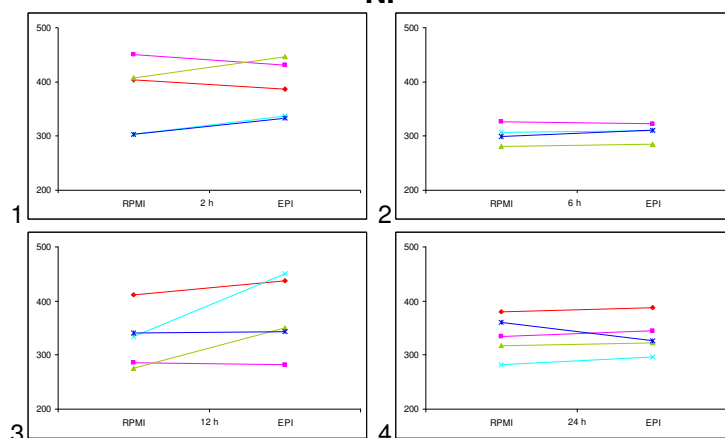
(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

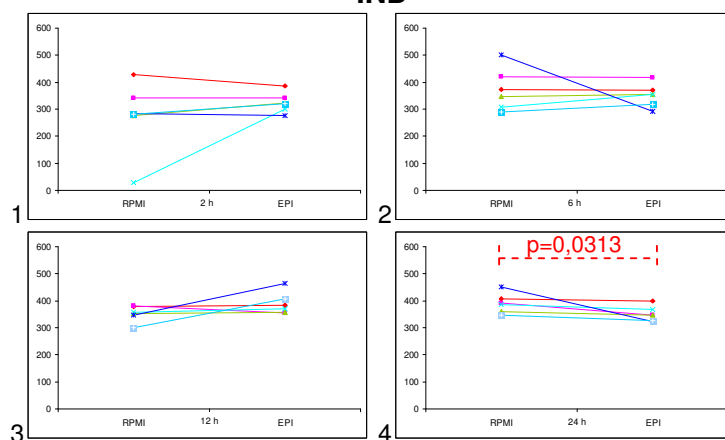
A.

NI



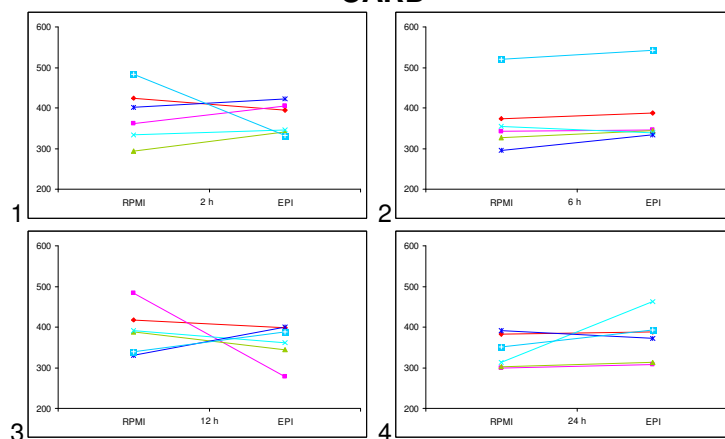
B.

IND



C.

CARD



**FIGURA 20:** Análise da IMF da molécula CTLA-4 em LTCD8<sup>+</sup> na presença de RPMI ou EPI, nos diferentes tempos (duas, seis, 12 e 24 horas) de cada indivíduo/paciente.

(A) Grupo NI, (B) Grupo IND, (C) Grupo CARD.

Obs.: os dados estão em intensidade média de fluorescência (IMF).

Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon.

## PARTE C.

### 5.7 - Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco.

Os resultados das cinéticas, apresentados por cada grupo, da IMF das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 e da produção de PGE<sub>2</sub>, IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  são analisados a seguir, relacionando-os entre os grupos NI, IND e CARD. Sendo assim foram feitos os seguintes pares: NI x IND; NI x CARD e IND x CARD. Tais agrupamentos tiveram como objetivo a análise do grupo de indivíduos NI em relação a cada grupo de pacientes com forma clínica diferenciada (IND ou CARD) e, também, a análise entre os grupos de pacientes.

#### 5.7.1 - Intensidade Média de Fluorescência das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou Linfócitos T CD8<sup>+</sup>

Avaliou-se a intensidade média de fluorescência das moléculas CD28, CD25 e CTLA-4 na superfície de LT CD4<sup>+</sup> ou de LT CD8<sup>+</sup>, dos indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD, no tempo zero (antes de serem cultivadas), e nos tempos de duas, seis, 12 e 24 horas após as células serem cultivadas em presença de RPMI ou de estímulo de EPI. Os resultados comparativos entre os grupos são mostrados nas tabelas 4, 5 e 6.

A IMF das moléculas CD28 nos LT CD4<sup>+</sup> do grupo CARD foi estatisticamente menor em relação ao grupo IND, desde o tempo zero até 24 horas de cultura em RPMI. Esses resultados parecem indicar que as moléculas CD28 são naturalmente expressas em menor quantidade no grupo CARD, quando comparado ao IND, e mesmo ao grupo NI nos tempos zero e duas horas (tabela 4).

Com relação à IMF da molécula CTLA-4 em LT CD4<sup>+</sup>, observou-se que, no tempo de 24 horas de cultura sem estímulo antigênico, ocorreu aumento significativo nos pacientes dos grupos IND e CARD, comparativamente ao grupo NI. Em células CD8<sup>+</sup>, a IMF da molécula CTLA-4 ocorre tardiamente no tempo 24 horas, enquanto

que já se mostra significativamente maior em LT CD4<sup>+</sup> às seis horas. O estímulo antigênico foi capaz de aumentar a IMF em células CD8<sup>+</sup> do grupo CARD às duas e seis horas de cultura (tabela 5).

As moléculas CD25 apresentaram-se estatisticamente aumentadas em células CD4<sup>+</sup>, somente no tempo de duas horas de cultura, estimulada com EPI, nos pacientes dos grupos IND e CARD, quando comparadas com o grupo NI (tabela 6). Não houve qualquer alteração da molécula CD25 em LT CD8<sup>+</sup>.

**Tabela 4: Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco: Expressão da molécula CD28 na superfície de linfócitos TCD4<sup>+</sup> ou linfócitos TCD8<sup>+</sup>.**

Tempo (h)	A. Molécula CD28 em LT CD4 <sup>+</sup>		B. Molécula CD28 em LT CD8 <sup>+</sup>	
	RPMI	EPI	RPMI	EPI
<b>0</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD ↓ (p=0,0095) IND X CARD ↓ (p=0,0022)		NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	
<b>2</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD ↓ (p=0,0043) IND X CARD ↓ (p=0,0022)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>6</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD ↑ (p=0,0095) IND X CARD ↓ (p=0,0043)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>12</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD ↑ (p=0,0303) IND X CARD ↓ (p=0,087)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>24</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD ↓ (p=0,022)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)

n.s. = não significativo. Dados significativos em vermelho.

Tabela 5: Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco: Expressão da molécula CTLA-4 na superfície de linfócitos TCD4<sup>+</sup> ou linfócitos TCD8<sup>+</sup>.

Tempo (h)	A. Molécula CTLA-4 em LT CD4 <sup>+</sup>		B. Molécula CTLA-4 em LT CD8 <sup>+</sup>	
	RPMI	EPI	RPMI	EPI
<b>0</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)		NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	
<b>2</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) <b>IND X CARD ↑ (p=0,0411)</b>
<b>6</b>	<b>NI X IND ↑ (p=0,0381)</b> NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) <b>NI X CARD ↑ (p=0,0095)</b> IND X CARD (n.s.)
<b>12</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>24</b>	<b>NI X IND ↑ (p=0,0173)</b> <b>NI X CARD ↑ (p=0,0303)</b> IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	<b>NI X IND ↑ (p=0,0519)</b> NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)

n.s. = não significativo. Dados significativos em vermelho.



**Tabela 6: Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco: Expressão da molécula CD25 na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou linfócitos TCD8<sup>+</sup>.**

Tempo (h)	A. Molécula CD25 em LT CD4 <sup>+</sup>		B. Molécula CD25 em LT CD8 <sup>+</sup>	
	RPMI	EPI	RPMI	EPI
<b>0</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)		NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	
<b>2</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND ↑ (p=0,0519) NI X CARD ↑ (p=0,0043) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>6</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>12</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)
<b>24</b>	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)	NI X IND (n.s.) NI X CARD (n.s.) IND X CARD (n.s.)

n.s. = não significativo. Dados significativos em vermelho.

### 5.7.2 – Produção de Prostaglandina-E<sub>2</sub> e secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$ .

A produção de PGE<sub>2</sub> e secreção das citocinas IL-2, IL-10 e IFN $\gamma$  por CMSP dos indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD foram avaliadas nos sobrenadantes das células cultivadas em presença de RPMI ou do estímulo de EPI nos tempos duas, 6, 12 e 24 horas. Os resultados comparativos entre os grupos são mostrados nas tabelas 7 e 8.

A produção de PGE<sub>2</sub> entre os grupos, apesar de não ter sido estatisticamente significativa, mostrou-se elevada nos sobrenadantes de CMSP não estimulada dos grupos de indivíduos/pacientes com 24 horas. E durante as 24 horas de cultura, os indivíduos do grupo NI apresentaram cinéticas semelhantes à dos pacientes do grupo IND e CARD. Entretanto, quando as culturas foram estimuladas por homogenato do *T. cruzi* (EPI), as CMSP do grupo NI produziram níveis elevados de PGE<sub>2</sub> com 24 horas, sugerindo um possível mecanismo de controle homeostático nestes indivíduos, os quais não possuem células de memórias para antígenos do *T. cruzi* (Figura 1B).

Quanto à secreção de IL-2, verificou-se secreção crescente no sobrenadante de CMSP estimuladas por EPI dos pacientes do grupo IND, atingindo níveis significativamente maiores em relação aos indivíduos NI em 24 horas, os quais mostraram níveis maiores da citocina em relação ao o grupo CARD com seis horas de cultura (Tabela 7B).

A secreção da IL-10 por CMSP dos indivíduos/pacientes foi crescente ao longo da cultura em presença de EPI. Contudo, os sobrenadantes dos pacientes do grupo IND apresentaram os menores níveis em relação aos grupos NI e CARD nas duas horas iniciais de cultura, embora, com 24 horas o grupo IND apresentasse os maiores níveis da citocina, apesar de não significativos (Tabela 8A).

Os pacientes IND e CARD apresentaram níveis crescentes de secreção de IFN $\gamma$  durante a cultura não estimulada. Com 24 horas, o grupo IND apresentou níveis significativamente maiores em relação os indivíduos NI. Em presença de EPI, os pacientes do grupo CARD apresentam níveis elevados do IFN $\gamma$  com 24 horas, apesar de não significativos (Tabela 8B).

Tabela 7: Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco: Produção de Prostaglandina-E<sub>2</sub> e secreção de IL-2 em sobrenadante de cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico.

Tempo	A. Produção de PGE <sub>2</sub>		B. Secreção de IL-2	
	RPMI	EPI	RPMI	EPI
2	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
6	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD ↓ (p=0,0303)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
12	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
24	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND ↑ (p=0,0519)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)

n.s. = não significativo. Dados significativos em vermelho.

**Tabela 8: Análise dos dados entre os grupos Não Infectado, Indeterminado e Cardíaco: Secreção de IL-10 e IFN $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células Mononucleares do Sangue Periférico**

Tempo (h)	A. Secreção de IL-10		B. Secreção de IFN $\gamma$	
	RPMI	EPI	RPMI	EPI
2	NI X IND (n.s.)	NI X IND ↓ (p=0,0519)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD ↑ (p=0,0260)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
6	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
12	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)
24	NI X IND (n.s.)	NI X IND (n.s.)	NI X IND ↑ (p=0,0519)	NI X IND (n.s.)
	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)	NI X CARD (n.s.)
	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)	IND X CARD (n.s.)

n.s. = não significativo. Dados significativos em vermelho.

## 6 - Discussão

A doença de Chagas é uma enfermidade, na qual os pacientes tendem a desenvolver lesões teciduais que podem desencadear alterações funcionais no coração e no tubo digestivo, em decorrência de multiplicação parasitária e da resposta imune secundária ao parasito. O comprometimento cardíaco constitui grande preocupação médica, pois pode ser responsável pelo surgimento de arritmias complexas, insuficiência ventricular, tromboembolismo e morte súbita em grande parte dos doentes. Em face destas alterações funcionais, a doença tem caráter debilitante, constituindo sério agravante da condição socioeconômica, muitas vezes precária, do paciente com doença de Chagas.

Os processos inflamatórios observados nos pacientes com a doença de Chagas decorrem do reconhecimento de antígenos do parasito por células do sistema imune, envolvidas na liberação de mediadores pro- e antiinflamatórios, como as prostaglandinas e citocinas (MORATO *et al.*, 1986; HIGUCHI *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1993; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; HIGUCHI, 1999; GOMES *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2004).

O foco do presente trabalho foi avaliar a produção de tais mediadores pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos pacientes com as formas clínicas IND e CARD da doença. No entanto, o principal objetivo traçado no foco descrito acima foi analisar o impacto, sofrido pelas CMSP de indivíduos NI, causado tanto pela retirada das células de seu meio natural (*in vivo*) para o meio artificial (*in vitro*), como também para estudo de alterações intrínsecas dessas células, cuja população linfocitária carece de células de memória para o antígeno estudado. Pretendeu-se, com essa abordagem, traçar um paralelo de quais marcadores humorais ou celulares já poderiam ser alterados, por estímulos inespecíficos para as células destes indivíduos; quando comparados com aqueles dos pacientes com doença de Chagas, já portadores de células que reconhecem especificamente o antígeno EPI, proveniente do *T. cruzi* que, por sua vez, seriam as moléculas responsáveis pela indução da produção dos mediadores humorais, capazes de alterar o estado de ativação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, que expressariam diferencialmente os marcadores fenotípicos, no intervalo de tempo estudado.

Os resultados do grupo NI mostraram que os níveis basais de IL-2 são semelhantes nas culturas não estimuladas e estimuladas com EPI.

Já os níveis de IL-10 aumentaram a partir de 12 horas e mantiveram-se elevados ( $p=0,0625$ ) na cultura estimulada. Considerando-se, então, a ausência de linfócitos de memória, nos indivíduos do grupo NI, poder-se-ia admitir que moléculas presentes no homogenato total de EPI foram capazes de ativar células da imunidade inata (II). Também, já foi mostrado pelo nosso grupo que uma outra população de células da II de indivíduos NI, os eosinófilos, são produtores de IL-10, quando são estimulados brevemente com antígenos EPI (CARDOSO *et al.*, 2006). Corroborando com estes resultados, já foi amplamente descrito na literatura que monócitos/macrófagos, além de serem células produtoras de IL-10, secretam também outras moléculas reguladoras do sistema imune (FIORENTINO *et al.*, 1991; RAFIQ *et al.*, 2001; MOORE *et al.*, 2001, CONTI *et al.*, 2003). De fato, esta interpretação é reforçada pela detecção do aumento significativo de  $PGE_2$ , considerada molécula reguladora, no sobrenadante de cultura de 24 horas, estimulada por EPI, de indivíduos NI. É possível que esses mediadores sejam produzidos para o retorno e/ou manutenção da homeostasia, no caso alterada pelo impacto do estímulo dos antígenos EPI, uma vez que, às 24 horas de cultura, os níveis de IL-10 mantiveram-se semelhantes aos de 12 horas.

Quando se compararam os níveis de produção de  $PGE_2$  do grupo NI com os apresentados pelos grupos de pacientes, IND e CARD, verificou-se não haver diferença significativa, sugerindo que a produção de  $PGE_2$  manteve-se em níveis semelhantes em ambientes de CMSP, contendo ou não linfócitos de memória.

Já, a IL-10 produzida por células estimuladas por duas horas teve seus níveis diferenciados entre dois grupos; o grupo CARD produziu níveis semelhantes aos do grupo NI, e mais elevados do que o grupo IND. Pode-se, então, supor que a perda da capacidade de manter níveis de IL-10 mais elevados nas primeiras horas de estímulo antigênico facilitaria a evolução do processo inflamatório nesses pacientes com cardiopatia chagásica, ao contrário dos pacientes do grupo IND, que não desenvolveram (ainda) alterações inflamatórias crônicas. Este fato pode estar relacionado com os fatores genéticos da produção de IL-10. COSTA (2005), analisando a frequência de genes para síntese de IL-10 entre pacientes com a doença de Chagas, observou que os pacientes do grupo IND possuem maior capacidade de produção de IL-10 do que os do grupo CARD. Este autor observou haver maior frequência dos genótipos GG e GA, relacionados com a síntese de IL-10,

no grupo IND caracterizando-os com altos produtores de IL-10, enquanto no grupo CARD há maior frequência do genótipo AA relacionado a baixa produção da citocina.

Na verdade, os níveis de IL-10, observados na cultura estimulada a partir das seis horas, mantiveram-se elevados no grupo IND, em comparação à não estimulada, fato já observado nos sobrenadantes das culturas do grupo NI.

Todavia, o desenvolvimento do processo inflamatório não é somente uma consequência do controle, mediado por IL-10 e/ou PGE<sub>2</sub>, mas é também afetado pelo balanço com a produção de mediadores pró-inflamatórios (REIS *et al.*, 1993; DUTRA *et al.*, 1997; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; ABEL, *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003; HIGUCHI *et al.*, 2003; YNDESTAD *et al.*, 2003).

Neste sentido, a produção do IFN $\gamma$  mostrou seguir uma curva ascendente no período de seis a 24 horas, no grupo NI, que, devido à grande variabilidade entre os indivíduos, não foi significativa. O perfil ascendente da curva mostrou-se mais acentuado nos pacientes dos grupos IND e CARD. Na ausência de estímulo antigênico (RPMI), o nível de IFN $\gamma$  do grupo IND, às 24 horas, já se mostrava maior do que aquele produzido pelas células do grupo NI. Em culturas estimuladas, os níveis de IFN $\gamma$  foram maiores no grupo CARD, comparados aos níveis das não estimuladas. Observação interessante é que às 12 horas, essa citocina já se mostrava estatisticamente mais elevada nas culturas estimuladas dos pacientes dos grupos IND e CARD, enquanto que os indivíduos do grupo NI apresentaram maior produção de IFN $\gamma$  às 24 horas de cultura estimulada. A interpretação destes dados sugere que células de memória da IA, presentes nos grupos IND e CARD, já são capazes de atuar precocemente, facilitando a produção de IFN $\gamma$ , quer seja pelas células da II, quer seja pela IA. BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, (1998) e GOMES *et al.*, (2003) também observaram níveis aumentados de IFN $\gamma$ , produzidos por células dos indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD, e também que as células dos pacientes do grupo CARD produzem maiores quantidades de IFN $\gamma$ . A alta produção de IFN $\gamma$  em pacientes do grupo CARD grau V foi também verificada por TALVANI, (2002) que verificou diferença na produção desta citocina em pacientes manifestando cardiopatia branda ou grave.

A partir destes dados, torna-se possível admitir que a produção, também precoce, de moléculas reguladoras da homeostasia (detectadas no grupo NI) constitui importante mecanismo de fundo (*background*) para cada indivíduo, cuja

evolução/regulação da enfermidade pode estar associada aos demais mecanismos decorrentes de células de memória (resposta imune secundária). Neste microambiente, em que as CMSP estão em contato com moléculas antigênicas, mediadores fisiológicos e imunológicos, foi possível também observar uma variação de marcadores fenotípicos em linfócitos T. Neste estudo, avaliou-se a IMF das moléculas CD25, CD28 e CTLA-4. CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2, o que a implica como um dos fatores responsáveis pela proliferação celular; por outro lado, desde 1995, essa molécula tem sido também caracterizada como marcadora de linfócitos TCD4<sup>+</sup> reguladores (LTreg:TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) de resposta imune (SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

Como parte do IL-2R, a CD25 participa junto com a CD28 da geração do segundo sinal de ativação de LT, que leva à produção de IL-2. Portanto, trata-se de uma molécula com funções de definição ainda controversa.

FURTADO *et al.*, (2002) e SETOGUCHI *et al.*, (2005) relataram importantes funções para a IL-2, no tocante às células Treg, que estaria estimulando fisiologicamente e potencializando as funções destas células, além de atuarem sobre a manutenção da homeostasia de LTreg, atualmente reconhecidas também pelo marcador FoxP3<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Além disto, segundo RAFIQ *et al.*, (2001), a produção de IL-10 é parcialmente dependente da IL-2 e dos sinais co-estimuladores, reforçando as aparentes funções complexas da molécula CD25.

No grupo NI, a IMF de CD25 em LTCD4<sup>+</sup> mostrou-se inalterada na cultura não estimulada, em relação ao tempo zero (células analisadas previamente ao cultivo), enquanto houve uma queda da expressão às duas horas, em presença de EPI, com retorno aos níveis de IMF iniciais. É provável que a associação da queda precoce da expressão de CD25 e a elevação tanto de IL-10 como de PGE<sub>2</sub> possa significar uma adaptação do meio *in vivo* para *in vitro* das células da IA, impedindo ativação a estímulos não conhecidos. Na verdade, segundo VERCAMMEN & CEUPPENS, (1987), a PGE<sub>2</sub> estimula a via cAMP-PKA, tendo efeito inibidor sobre as etapas iniciais da ativação das células T, resultando em diminuição da produção de IL-2 e da expressão do seu receptor CD25 e, como conseqüência, diminuição da proliferação das células T.

Concordantemente com esta interpretação, a análise de CD28 mostrou também queda de expressão, nos tempos seis e 12 horas, com relação ao tempo



duas horas. A tendência da expressão de CD28 é manter-se estável, independentemente do estímulo antigênico.

De fato, com relação à presença de células reguladoras, LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, estudadas no contexto *ex vivo*, foi mostrado pelo nosso grupo que as mesmas compreendem 5% de todas as células T CD4<sup>+</sup>, tanto em indivíduos NI como em pacientes com doença de Chagas (ARAUJO *et al.*, 2007). Demonstrou-se também que o fator de transcrição FoxP3 era expresso igualmente nos indivíduos NI e pacientes dos grupos IND e CARD.

No presente trabalho, foi interessante observar a ausência de alteração dos marcadores fenotípicos CD25 e CD28 em LT CD8<sup>+</sup>, o que reforça serem estas células menos suscetíveis a estímulos por antígenos exógenos (WILLIAMS *et al.*, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2003).

Outra molécula de regulação imunológica estudada foi a CTLA-4, que se apresentou aumentada com seis horas em LT CD4<sup>+</sup>, no grupo NI, embora devido à variabilidade entre os indivíduos não houve significância. Considerando a ausência do segundo sinal de ativação para LT CD4<sup>+</sup> em resposta secundária, e, conseqüentemente, a não necessidade de regulação via CTLA-4, os dados mostraram-se coerentes. Na análise da expressão dessa molécula em LT CD4<sup>+</sup>, em culturas não estimuladas, entre os grupos, observou-se aumento significativo nos grupos IND e CARD, comparado ao grupo NI.

Já a freqüência de LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando CTLA-4 é maior em pacientes do grupo CARD (ARAUJO *et al.*, 2007). Neste trabalho, mostrou-se que houve aumento da IMF de CTLA-4 em LT CD8<sup>+</sup> de pacientes do grupo CARD, em culturas estimuladas por duas e seis horas. É possível que LT CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> esteja contrabalançando a ativação, induzida pelo aumento exacerbado de IFN $\gamma$ , no grupo CARD, apesar de o resultado final ser ineficaz quanto à regulação do processo inflamatório cardíaco.

Por outro lado, segundo SOUZA *et al.*, (2007) a exposição de LT a monócitos infectados com *T. cruzi* por 18 horas, *in vitro*, promoveu maior expressão da molécula CTLA-4 na superfície dos LTCD4<sup>+</sup> dos pacientes do grupo IND em relação às células do grupo NI. Além disso, a freqüência de LTCD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> foi maior no grupo IND, quando comparado aos grupos NI e CARD. Esses autores observaram, também, aumento da expressão intracitoplasmática de CTLA-4 em LTCD4<sup>+</sup> do grupo CARD.

Já a frequência de CTLA-4 intracitoplasmático em LTCD8<sup>+</sup> foi maior no grupo IND, quando comparado aos grupos NI e CARD, ambos em meio e após estimulação antigênica.

É provável que as controvérsias entre os dados de SOUZA *et al.*, (2007) e este trabalho sejam decorrentes do tipo de análise diferente. Enquanto presente trabalho estudou-se a IMF das moléculas em células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, estimuladas ou não por preparações antigênicas, SOUZA *et al.*, (2007) trabalharam com macrófagos infectados *in vitro*, simulando a fase aguda da infecção chagásica, além de terem avaliado a frequência das células duplo-positivas.

## 8 – Conclusão

Após análise dos dados e da literatura é possível concluir que, o impacto do antígeno de *T. cruzi* (EPI) sobre as CMSP induz a produção de moléculas reguladoras em indivíduos do grupo NI, possivelmente como parte da capacidade reguladora do sistema imune a estímulos estranhos. Admitindo-se a possibilidade de que a regulação no grupo IND seja mediada por IL-10 e CTLA-4, a ausência desta no grupo CARD, poderia ser um dos fatores relacionados a uma possível falha na regulação do sistema imune destes pacientes. Isto posto, a consequência da habilidade de adaptação aos estímulos antigênicos externos, no caso, *T. cruzi*, torna-se um importante fator no controle da morbidade em doença de Chagas.

**8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA- NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Autoimmun. 17(1):99-107, 2001.

ABRAHAMSOHN, I.A; COFFMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 15; 155 (8):3955-63, Oct ,1995.

ALEGRE, M.L.; NOEL, P.J.; EISFELDER, B.J.; CHUANG, E.; CLARK, M.R.; REINER, S.L.; THOMPSON, C.B.; Regulation of surface intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cell. J. Immunol. 157: 4762, 1998.

ALEGRE, M.L.; FRAUWIRTH, K.A.; THOMPSON, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat. Rev. Immunol., 3: 220, 2001.

ANDRADE, Z.A. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. Ciba Found. Symp. 99, 214-233, 1983.

ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of Chagas' disease, Res. Immunol. 142, 126-129, 1991.

ANDRADE, Z.A. A forma indeterminada da doença de Chagas em tempos de controle do *Triatoma infestans*. Revista de Patologia Tropical, 34 (2): 105-111, 2005.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V.J.; Myocardial changes in acute acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. Am. J. Pathol. 144, 1403-1411, 1994.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD, R.J.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57(3):328-36, Sep, 1997.

ARAUJO, F.F.; GOMES, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; PINHEIRO, V.M.P.; MORATO, M.J.F.; CORREA-OLIVEIRA, R. Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Frontiers in Bioscience 12, 2797-2806, May 1, 2007

ARAUJO-JORGE, T. Resposta immune inata, inflamatória e de fase aguda na doença de Chagas. In ARAUJO-JORGE, T.; CASTRO, S.L. "Doença de Chagas, manual para experimentação animal" Rio de Janeiro: FIOCRUZ , 2000, cap. 4, p42.

BACHMANN, M.F.; KOPF, M. Balancing protective immunity and immunopathology. Current Opinion in immunology, 14:413-419, 2002.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; GOMES, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; MOREIRA, M.C.V.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.P.; PEREIRA, M.E.S.; COFFMAN, R.L.; DIAS, J.C.P.;

CANÇADO, J.R.; GAZZINELLI, G; CORRÊA-OLIVEIRA, R. IFN $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31 (1): 127-131, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GOMES, J.A.S.; CANÇADO, J.R.; FERRARI, T.C.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.P.; MOREIRA, C.M.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immunological and Clinical Evaluation of chagasic Patients Subjected to Chemotherapy During the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14-30 Years Ago. *The journal of Infectious Diseases*, 182: 634-638, 2000.

BORTHWICK, N.J.; BOFILL, M.; HASSAN, I.; PANAYIOTIDIS, P.; JANOSSY, G.; SALMON, M.; AKBAR, A.N.; Factors that influence activated CD8<sup>+</sup> T cell apoptosis in patients with acute herpesvirus infections: loss of costimulatory molecules CD28, Cd5 and CD6 but relative maintenance of Bax and Bcl expression. *Immunology* 88: 508, 1996.

BOUR-JORDAN, H. BLUESTONE, J. CD28 Function: A balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology*, 22 (1): 1-7, 2002.

BREYER, R.M.; BAGDASSARIAN, C.K.; MYERS, S.A.; BREYER, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:661-90. 2001

BRUNNER, M.C.;CHAMBER, C.A.; CHAN, F.K.; HANKE, J.; WINOTO, A.; ALLISON, J.P. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162: 5813, 1999.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. *Infect. Immun.* 64 (1): 128, 1996.

CARDOSO, G.M.; MORATO, M.J.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O.C; BONFIM, I.P.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; VANDEBERG, J.L.; REIS, M.R.; MAGALHAES, E.F.; CORREA-OLIVEIRA, R. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci.* 1;11:1158-63, Jan., 2006.

CARUSO, A.; LICENZIA, TIS.; CORULLI, M.; CANARIS, AD.; DE FRANCESCO, MA.; FIORENTINI, S.; PERONI, L.; FALLACARA, F.; DIMA, F.; BALSARI, A.; TURANO. A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27:71-76, 1997.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cell down-regulate costimulatory molecules on antigen- presenting cells. *Eur. J. Immunol.*; 30: 1538-43, 2000

CERISOLA, J.A.; NEVES, D.A.; SILVA, N.; PRATA, A.; SCHENONE, H.; ROHWEDDER, R. Evaluation of the efficacy of nifurtimox in chronic human chagasic infection by using xenodiagnosis. *Bol. Chil. Parasitol.* 32:51-62, 1977.

CHAMBERS, C.A.; ALLISON, J.P. Co stimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Immunol.*, 11:203, 1999.

CHAMBERS, C.A.; KUHNS, M.S.; ALLISON, J.P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4<sup>+</sup> T cells responses.

- Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96:8603, 1999.
- CHEN, H.; HENDRICKS, R.L. B7 costimulatory requirements of T cells at an inflammatory site. *J. Immunol.*, 15; 160 (10):5045-52, May, 1998.
- CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7- CD28 family in the control of T cell immunity. *Nature Rev. immunol.*, 4, 336-347, 2004.
- CHEN, W.; JIN, W.; WAHL, S.M.; Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) production by murine CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 188, 1849-1857, 1998.
- CHIKUMA, S.; IMBODEN, JB.; BLUESTONE, JA. Negative regulation of cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 197, 129-135, 2003.
- CHOUDHRY, M.A.; HOCKBERGER, P.E.; SAYEED, M.M. PGE<sub>2</sub> suppresses mitogen-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in T cells. *Am. J. Physiol.* 277 (6 Pt 2):R1741-8, Dec, 1999.
- COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. 1: *Pharmacol. Rev.*, 46 (2) 205-29, Jun, 1994.
- CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005. Secretaria de vigilância em saúde do ministério da saúde. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. 38 (Suplemento III), 2005.
- CONTI, P.; KEMPURAJ, D.; KANDERE, K.; DI GIOACCHINO, M.; BARBACANE, R.C.; CASTELLANI, M.L.; FELACO, M.; BOUCHER, W.; LETOURNEAU, R.; THEOHARIDES, T.C. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol. Lett. Review*, 3, 86 (2)123-9. Apr., 2003.
- CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J.; LEMOS, EM.; CARDOSO, GM.; REIS, DD.; ADAD, S.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, AO.; COSTA, MO.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, LM. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:253-5, 1999.
- COSME, R.; LUBLIN, D.; TAKAFUJI, V.; LYNCH, K.; ROCHE, J.K. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE (2) receptor expression. *Hum. Immunol.* 61 (7):684-96, Jul., 2000.
- COSTA, GC. Associação de polimorfismos nos genes de IL-10 e CTLA-4 em pacientes chagásicos crônicos indeterminados e cardiopatas. Dissertação de Mestrado - UFMG, Belo Horizonte. 61p, 2005.
- COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 27, 469-486.

DAMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; DEOLINDO, P.; ARNHOLDT, A.C.V.; MANHÃES, L.; GOLDENBERG, S.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *Microbiol. Lett.* 266, 29–33, 2007.

DE BARROS-MAZON, S.; GUARIENTO, M.E.; DA SILVA, C.A.; COFFMAN, R.L.; ABRAHAMSOHN, I.A. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin. Immunol.*;111(1):137-45, 2004.

DEUTSCHLÄNDER, N.; VOLLERTHUN, R.; HUNGERER, K.D. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice. A long term study following paw infection. *Tropenmed. Parasitol.*, 29(3):323-9, Sep., 1978.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Epidemiologia. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 3, 33-66.

DIAS J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: A clinical epidemiological, review. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* 22(3):147-56, Jul-Sep, 1989.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. (2ª ed.) Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. Cap. 5, p.48-74, 2000.

DIAS, J.C.P. Chagas disease, environment, participation, and the state. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(Suplemento): 165 -169, 2001.

DOS SANTOS, P.V.A.; ROFFÊ, E.; SANTIAGO, H.C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.M.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES-VIEIRA, J. Prevalence of CD8+  $\alpha$  T-cells in *Trypanosoma cruzi* elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L<sup>Low</sup>LFA-1<sup>High</sup>VLA-4<sup>High</sup> activation phenotype and expression of IFN- $\gamma$ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 3: 971-984, 2001.

DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; PINTO-DIAS, J.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO-PARRA, J.F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scandinavian Journal of Immunology*, 45: 74-80, 1997.

FERENCZI, K.; BURAK, L.; POPE, M.; KRUEGER, J.G.; AUSTIN, L.M. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *J. Autoimmun.* 14, 63, 2000.

FERREIRA, I.L, SILVA, T.P. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(5):507-9 Sep-Oct, 2006

FILION, F.; BOUCHARD, N.; GOFF, A.K.; LUSSIER, J.G.; SIROIS, J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 7;276 (36):34323-30, Sep., 2001.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M, MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146:3444–51, 1991.

FURTADO, GC.; CUROTTO DE LAFAILLE, MA.; KUTCHUKHIDZE, N.; LAFAILLE, JJ. Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4 Regulatory T Cell Function. *J. Exp. Med.* 196:6, 851–857, September, 2002.

GAFFEN, SL.; LAI, SY.; HA, M.; LIU, X.; HENNIGHAUSEN, L.; GREENE, WC.; GOLDSMITH, MA. Distinct tyrosine residues within the interleukin-2 receptor beta chain drive signal transduction specificity, redundancy, and diversity. *J Biol Chem.* 30;271(35):21381-90, Aug., 1996.

GAZZINELLI, G.; KATZ, N.; ROCHA, RS.; COLLEY, DC. Immune responses during human schistosomiasis mansoni X Production and standardization of an antigen-induced mitotic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J. Immunol.* 30:2891-2895, 1983.

GOETZL, E.J.; XIA, M.; INGRAM, D.A.; KISHIYAMA, J.L.; KALTREIDER, H.B.; BYRD, P.K.; ICHIKAWA, S.; SREEDHARAN, S.P. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.*, 9(11):1051-8. Aug., 1995.

GOLDBERG, J.; SHRIKANT, P.; MESCHER, MF. In vivo augmentation of tumor-specific CTL responses by class I/peptide antigen complexes on microspheres (large multivalent immunogen). *J Immunol.* 1;170(1):228-35, Jan., 2003.

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

GOMES, J.A.S.; BAHIA, L.M.G.; ROCHA, M.O.C.; MARTINS-FILHO, OA.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*, 71 (3): 1185-1193, 2003.

GREENWALD, R.J.; BOUSSIOTIS, V.A.; LORSBACH, R.B.; ABBAS, A.K.; SHARPE, A. CTLA-4 regulates induction of anergy *in vivo*. *Immunity* 14, 145-155, 2001.

GREENWALD, R.J.; OOSTERWEGEL, M.A.; VAN DER WOUDE, D.; KUBAL, A.; MANDELROT, D.A.; BOUSSIOTIS, V.A.; SHARPE, A.H. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur. J. Immunol.* 2:366, 2002.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23(3):144-50, Mar., 2002.

HATAKEYAMA, M.; KAWAHARA, A.; MORI, H.; SHIBUYA, H.; TANIGUCHI, T. c-fos gene induction by interleukin 2: identification of the critical cytoplasmic regions within the interleukin 2 receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2022, 1992.

HIGUCHI, M.L.; De BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi*



parsitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, 2, 101-106, 1993<sup>a</sup>.

HIGUCHI, M.L.; De BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C & PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 423: 157-160, 1993<sup>b</sup>.

HIGUCHI M.; BENVENUTI LA.; MARTINS REIS M.; METZGER M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*; 60 (1):96–107, 2003

HIGUCHI, M.L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities *Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.94 s.1 Rio de Janeiro Sept.*, 1999

HIGUCHI, M.D.; REIS, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*, 56:485–9, 1997

HILKENS, C.M.; SNIJDERS, A.; SNIJDEWINT, F.G.; WIERENGA, E.A.; KAPSENBERG, M.L. Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products. *Eur Respir J Suppl.*;22:90s-94s; Aug, 1996<sup>a</sup>.

HILKENS, C.M.; SNIJDERS, A.; VERMEULEN, H.; VAN DER MEIDE, P.H.; WIERENGA, E.A.; KAPSENBERG, M.L. Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN-gamma level of activated human CD4+ T cells. *J Immunol.* 1;156(5):1722-27; Mar, 1996<sup>b</sup>.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* 66:1208, 1998.

JACKSON, A.L.; MATSUMOTO, H.; JANSZEN, M.; MAINO, V.; BLIDY, A.; SHYE, S. Restricted expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 54(1):126-33, Jan., 1990.

JANEWAY, C.A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, MJ. *Imunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença.* 6<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2007<sup>a</sup>. cap. 5, 169-201.

JANEWAY, C.A. JR.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, MJ. *Imunobiologia: O sistema immune na saúde e na doença.* 6<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2007<sup>b</sup>. cap. 2, 37-102.

JOHN, S.; ROBBINS, C.M.; LEONARD, W.J. An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, E1f-1,

- HMG-I(Y) and a GATA family protein. *EMBO J.* 15;15(20):5627-35, Oct, 1996
- JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTE, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; McCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 348-357, 1993.
- KNAPP, W.; DORKEN, B.; RIEBER, P.; SCHMIDT, R.E.; STEIN, H.; VON DEM BORNE, A.E. CD antigens 1989. *Blood.*;74(4):1448-50, Sep, 1989
- KOEBERLE, F. Chagas' disease-its pathogenesis and significance as an epidemic. (Contribution to the 50th anniversary of the discovery of the disease by Carlos Chagas) *Z Tropenmed Parasitol.* ; 10:236-68, Nov 1959.
- LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8<sup>+</sup> T cell mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 299-304, 2003.
- LECINE, P.; ALGARTE, M.; RAMEIL, P.; BEADLING, C.; BUCHER, P.; NABHOLZ, M.; IMBERT, J. Elf-1 and Stat5 bind to a critical element in a new enhancer of the human interleukin-2 receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.*;17(4):2351, Apr.,1997.
- LEE, KM.; CHUANG, E.; GRIFFIN, M.; KHATTRI, R.; HONG, D.K.; ZHANG, W.; STRAUS, D.; SAMELSON, L.E.; THOMPSON, C.B.; BLUESTONE, J.A. Molecular basis of cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282, 2263-2266, 1998.
- LENSCHOW, D.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233-258, 1996.
- LEONARD, W.J.; KRONKE, M.; PEPPER, N.J.; DEPPER, J.M.; GREENE, W.C. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (18) 6281-5, Sep.1985.
- MACEDO, V. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de janeiro: FIOCRUZ, 135, 1997.
- MACEDO, V.; PRATA, A.; D.A SILVA, G.R.; CASTILHO, E. Prevalence of electrocardiographic changes in Chagas' disease patients (preliminary information about the National Electrocardiographic survey *Arq Bras Cardiol.* 38(4):261-4, Apr., 1982.
- MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á.V. L.; Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.*;72(3):247-80, Mar., 1999. .
- MARTINS, A.V. Epidemiologia. In: Doença de Chagas. CANÇADO J.R. Belo Horizonte, Imprensa Oficial, 1968.
- MASTINO, A.; PIACENTINI, M.; GRELLI, S.; FAVALLI, C.; AUTUORI, F.; TENTORI, L.; OLIVERIO, S.; GARACI, E. Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E2 in vivo. *Dev Immunol.*;2(4):263-71. 1992.

MENEZES, C.A.S.; ROCHA, M.O.C.; SOUZA, P.E.A.; CHAVES, A.C.L.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Phenotypic and functional characteristics of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin.Exp.Immunol*, 137:129-138, 2004.

MEYER, F.; RAMANUJAM, K.S.; GOBERT, A.P.; JAMES, S.P.; WILSON, K.T. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J Immunol*. 15;171(8):3913-7, Oct, 2003

MICHAILOWSKY, V.; LUHRS, K.; ROCHA, M.O.C.; FOUTS, D.; GAZZINELLI, R.T.; MANNING, J.E. Humoral and cellular immune responses to Trypanosoma cruzi-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun*. 71(6):3165-71, 2003.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*;19:683-765. 2001.

MORATO, M.J.F.; BRENER, Z.; CANÇADO, J.R.; NUNES, R.M.B.; CHIARI, E.; GAZZINELLI, G. Cellular Immune responses of chagasic patients to antigens derived from different strains and clones. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 35:505-511, 1986.

NAKAMURA, M.; ASAO, H.; TAKESHITA, T.; SUGAMURA, K. Interleukin-2 receptor heterotrimer complex and intracellular signaling. *Semin Immunol.*, 5(5):309-317, 1993.

NAKAMURA, Y.; RUSSEL, S.M.; MESS, S.A.; FRIEDMANN, M.; ERDOS, M.; FRANCOIS, C.; JACQUES, Y.; ADELSTEIN, S.; LEONARD, W.J. Heterodimerization of the IL-2 beta- and gamma chain cytoplasmatic domains is required for signaling. *Nature*, 1994.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 194, 629-644, 2001.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. *Ann N Y Acad Sci.* 15;744:126-38. Nov., 1994.

NATIONAL DIABETES DATA Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28: 1039-1057, Dec., 1979.

NEEPER, M.P.; KUO, L.M.; KIEFER, M.C.; ROBB, R.J. Structure function relationships for the IL 2 receptor system. III. Tac protein missing amino acids 102 to 173 (exon 4) is unable to bind IL 2: detection of spliced protein after L cell transfection. *J Immunol.*, 138(10):3532-3538, 1987.

NISHIMURA, K.; SETOYAMA, T.; TSUMAGARI, H.; MIYATA, N.; HATANO, Y.; XU, L.; JISAKA, M.; NAGAYA, T.; YOKOTA, K. Endogenous prostaglandins E2 and F2-alpha serve as an anti-apoptotic factor against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.*;70(9):2145-53. Sep 7, 2006.

OLSSON, C.; MICHAËLSSON, E.; PARRA, E.; PETTERSSON, U.; LANDO, P.A.; DOHLSTEN, M. Biased dependency of CD80 versus CD86 in the induction of transcription factors regulating the human IL-2 promoter. *Int Immunol.*;10(4):499-506, Apr., 1998

OOSTERWEGEL, M.A.; GREENWALD, R.J.; MANDELBROT, D.A.; LORSBACH, R.B.; SHARPE, A.H. CTLA-4 and T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 11:294, 1999.

PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I.; Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int. J. Cardiol.* 60, 49-54, 1997.

PEREZ, VL., VAN PARIJS, L.; BIUCKIANS, A.; ZHENG, X.X.; STROM, T.B.; ABBAS, A.K. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6, 411-417, 1997.

PHIPPS, R.P.; STEIN, S.H.; ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today.* 12(10):349-52, Oct., 1991.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* 10;193(1):90-8, Apr.,1999.

PORTER, B.O.; MALEK, T.R. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. *Eur J Immunol.*; 29(7):2360-5, Jul.,1999.

RAFIQ, K.; CHARITIDOU, L.; BULLENS, DMA.; KASRAN, A.; LORRE, K.; CEUPPENS, JL.; VAN GOOL, SW. Regulation of the IL-10 Production by Human T Cells. *Scand. J. Immunol.* 53, 139-147, 2001

RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. JR.; RASSI, S.G.; RASSI, A.G. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine International Society of Blood Transfusion, São Paulo, Brazil. 1992.

READ, S.; MALMSTROM, 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.* 192, 295-302, 2000.

REED, S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN $\gamma$  induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 140: 4342, 1988.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, J.R.S.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ + cells and dominance of granzyme A+ CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*; 48(5):637-44, 1993.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; BENVENUTTI, L.A.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S.;

BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *T. cruzi* antigens. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 83: 165-172, 1997.

RELATÓRIO OFICIAL DA 1ª. REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 46, 1985.

RICKERT, M.; WANG, X.; BOULANGER, M.J.; GORIATCHEVA, N.; GARCIA, K.C. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science*. 3;308(5727):1477-80, Jun,2005.

RIESER, C.; BOCK, G.; KLOCKER, H.; BARTSCH, G.; THURNHER, M. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med*. 3;186(9):1603-8, Nov, 1997.

ROCHA, M.O.C.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci*. 1;8:e 44-54, Jan., 2003.

ROCHA, M.O.C.; MOURA, V.T.L. Doença de Chagas. In: *Terapêutica clínica*. Cap. 109: 936-951,1999.

RUGGERI, P.; NICOCIA, G.; VENZA, I.; VENZA, M.; VALENTI, A.; TETI, D. Polyamine metabolism in prostaglandin E2-treated human T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*;22(1):117-29, Feb., 2000.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains. *J. Immunol*. 155, 1151–1164, 1995.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J.A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol*. 19: 225-252, 2001.

SALOMON, B.; LENSCHOW, D.J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A.; BLUESTONE, J.A. B7/CD28 co-stimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12, 431-440, 2000.

SALOMON, B.; RHEE, L.; BOUR-JORDAN, H.; HSIN, H.; MONTAG, A.; SOLIVEN, B.; ARCELLA, J.; GIRVIN, AM.; PADILLA, J.; MILLER, S.D.; BLUESTONE, J.A. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*. 3;194(5):677-84, Sep, 2001.

SAMUDIO, M.; MOTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M.; MARTINEZ, J.; ROJAS DE ARIAS, A.; JAMES, M.A. Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. *Acta Trop*. 69: 89, 1998.

SANCHEZ, J.A.; MILEI, J.; YU, Z.X.; STORINO, R.; WENTHOLD, R. JR.; FERRANS

V,J. Immunohistochemical localization of laminin in the hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: relationship to thickening of basement membranes. *Am Heart J.*;126(6):1392-401, Dec., 1993.

SETOGUCHI, R.; HORI, S.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 7;201 (5): 723-35, Mar., 2005.

SHAHINIAN, A.; PFEFFER, K.; LEE, KP.; KUNDIG, TM.; KISHIHARA, K.; WAKECHAN, A.; KAWAI, K.; OHSHI, PS.; THOMPSON, CB.; MAK, TW. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261: 609, 1993.

SHRIKANT, P.; KHORUTS, A.; MESCHER, MF.; CTLA-4 blockade reverses CD8+ T cell tolerance to tumor by a CD4+- and IL-2 dependent mechanism. *Immunity* 11, 483-493, 1999.

SILVA, J.S.; MORRIESSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S..G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med* 175:169-174, 1992.

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

SKINNER, HA.; HOLT, S.; SCHULLER, R.; ROY, J.; ISRAEL, Y. Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. *Ann Intern Med.* 101(6):847-51, Dec., 1984.

SMITH, WL. MEADE, EA.; DEWITT, DL. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci.* 15, 744: 50-7, Nov., 1994.

SOARES, M.B.; SILVA-MOTA, K.N.; LIMA, R.S.; BELLINTANI, M.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by IL-4: dissociation between inflammatory and tissue parasitism. *Am J. Pathol.* 159:703-9, 2001.

SOTOMAYOR, E.M.; BORRELLO, I.; TUBB, E.; ALLISON, J.P.; LEVITSKY, H.I. *In vivo* blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11476-11481, 1999.

SOUZA, P.E.; ROCHA, M.O.C.; MENEZES, C.A.S.; COELHO, J.S.; CHAVES, A.C.L.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of co-stimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from indeterminate and cardiac Chagas disease patients. *Infect Immun.* 75 (4):1886-94Apr., 2007.

STADECKER, MJ. The regulatory role of the antigen-presenting cell in the development of hepatic immunopathology during infection with *Schistosoma*

mansoni. Pathobiology. 67(5-6):269-72, 1999.

STAUBER, D.J.; DEBLER, E.W.; HORTON, P.A.; SMITH, K.A.; WILSON, I.A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 21;103(8):2788-93, Feb., 2006.

TAKAHASHI, T., TAGAMI T, YAMAZAKI S, UEDE T, SHIMIZU J, SAKAGUCHI N, MAK TW, SAKAGUCHI S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J. Exp. Med. 192, 303-310, 2000.

TAKEDA, K. Kaisho, T.; Akira, S. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21, 335–376 14, 2003.

TAKESHIDA, T.; ASAO, H.; OHTANI, K.; ISHII, N.; KUMAKI, S.; TANAKA, N.; MUNAKATA, H.; NAKAMURA, M.; SUGAMURA, K. Cloning of the g chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257: 379,1992.

TALVANI,A.; RIBEIRO, CS.; ALIBERTI, JCS.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, PVA.; MURTA, SMF.; ROMANHA, AJ.; ALMEIDA, IC.; FARBER J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, JS.; GAZZINELLI, RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes and Infection 2: (8): 851-866, July 2000.

THEZE, J.; ALZARI, P.M.; BERTOGLIO, J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. Immunol Today.17(10):481-6. Oct. 1996.

TUOSTO, L.; ACUTO, O. CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement. Eur J Immunol.; 28(7):2131-42, Jul. 1998.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; REIS, D.D.; CORREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet 348, 891-892, 1996.

VERCAMMEN, C.; CEUPPENS, JL. Prostaglandin E2 inhibits human T-cell proliferation after crosslinking of the CD3-Ti complex by directly affecting T cells at an early step of the activation process. Cell Immunol. 104(1):24-36, Jan., 1987.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.R. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62: 5177, 1994.

VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J.C.P.; PASCOAL, V.P.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, A.P.S.; ELOI-SANTOS, S.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease have High Frequencies of Circulating CD3<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Natural Killer T Cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> Regulatory T Lymphocytes. Scandinavian Journal of Immunology 62, 297–308, 2005.

WENDEL, S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. Curr Opin Hematol. 5(6):406-

11, Nov 1998

WILLIAMS, A.; PEH, CA.; ELLIOTT, T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens*. 59(1):3-17, Jan., 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease, p. 112–123. In: UNDP/ World bank/W. H. O. Special programme for research and training in tropical disease research: progress 1995–96. Thirteenth programme report of the UNPD/World bank/W. H. O. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. WHO; Technical Report Series 905, 109; 2002.

WU, C.Y.; WANG, K.; MCDYER, J.F.; SEDER, R.A. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol*. 15;161(6):2723-30, Sep., 1998.

YNDESTAD, A.; HOLM, A.M.; MÜLLER, F.; SIMONSEN, S.; FROLAND, S.S.; GULLESTAD, L.; AUKRUST P. Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T cell from patients with chronic heart failure. *Cardiovascular research*, 60: 141-146, 2003.



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo COEP-UFMG.



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-  
GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 7003  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3248.9641 FAX: (31)  
3248.9939



**Ministério da Saúde- Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto  
39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL  
Tel.: (31) 3295-3566 – FAX: (31) 3295-3115**

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ recebi informações sobre o projeto de pesquisa chamado: “Avaliação da cinética de aparecimento de moléculas co-estimuladoras em células mononucleares do sangue periférico de pacientes chagásicos após estimulação *in vitro* por antígenos do *Trypanosoma cruzi*.”

Fui informado (a) que, para a execução deste projeto, será utilizado, apenas, o sangue de pacientes portadores da doença de Chagas e que os experimentos serão feitos, em laboratório, sem a participação direta dos pacientes envolvidos nestes experimentos.

Fui informado (a) que a infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, causador da doença, pode se manifestar de diversas maneiras e gravidade, dependendo, entre outros fatores, do tipo e da qualidade de minha resposta imunológica contra a infecção.

As células mononucleares são importantes na montagem da resposta imunológica e no tipo de substâncias produzidas pelas células de defesa do organismo. Estas substâncias tanto podem proteger a pessoa infectada contra o parasito, quanto causar lesão a diversos órgãos.

Ciente de que as informações obtidas por este tipo de investigação podem auxiliar na compreensão dos mecanismos do surgimento das lesões e de evolução da doença e no manejo clínico dos pacientes, concordo em ceder amostra de sangue (50mL) que será colhido em tubos estéreis, para a realização dessa pesquisa. Fui informado (a) sobre os possíveis riscos associados com a coleta de sangue, como a formação de um pequeno hematoma no local da punção venosa, através do sistema de coleta a “vácutainer”, e que este processo é pouco freqüente e não trará problemas clínicos importantes.

A minha participação é voluntária e envolverá apenas a doação das amostras de sangue. Nada mais, além disto.

O restante da avaliação clínica e laboratorial a ser realizada faz parte da rotina de atendimento do ambulatório. Tenho consciência que a minha participação como voluntário (a) não me trará benefício direto ou privilégio.

Também fui informado (a) de que não devo esperar resultados imediatos ou pessoais e que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso prejudique meu acompanhamento médico.

Em caso de dúvida, sei que poderei dirigir-me ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizado à Avenida Presidente Antonio Carlos nº6627, unidade administrativa-II, 2º andar, sala 2005 - Belo Horizonte- MG, CEP 31270-910, Telefone: 3499-4592 ou aos pesquisadores envolvidos referidos abaixo:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha. \_\_\_\_\_ Telefone: 3248-9547

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira. \_\_\_\_\_ Telefone: 3349-7775

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes. \_\_\_\_\_ Telefone: 3349-7779

Vladimir Martins Pinheiro. \_\_\_\_\_ Telefone: 3349-7748

**Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2006.**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do voluntário**