

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação do perfil fenotípico das células B
reguladoras nas diferentes formas clínicas da doença
de Chagas**

por

Rafaelle Christine Gomes Fares

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2010

DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR

R.C.G. FARES

2010

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação do perfil fenotípico das células B
reguladoras nas diferentes formas clínicas da doença
de Chagas**

por

Rafaelle Christine Gomes Fares

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração de Biologia Celular
e Molecular**

Orientação: Dr. Rodrigo Correa Oliveira

**Co-orientação: Dra. Juliana de Assis Silva
Gomes**

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2010

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F222a Fares, Rafaelle Christine Gomes.
2010

Avaliação do perfil fenotípico das células B reguladoras nas diferentes formas clínicas da Doença de Chagas / Rafaelle Christine Gomes Fares. – Belo Horizonte, 2010.

xviii, 77 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 76 - 95

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Doença de Chagas/imunologia 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. Linfócitos B/imunologia I. Título. II. Oliveira, Rodrigo Correa (Orientação). III. Gomes, Juliana de Assis Silva (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Avaliação do perfil fenotípico das células B reguladoras nas
diferentes formas clínicas da doença de Chagas**

por

Rafaelle Christine Gomes Fares

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Presidente)

Prof. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Prof. Dra. Cristiane Alves Silva Menezes

Suplente: Prof. Dra. Mariléia Chaves Andrade

Dissertação defendida e aprovada em: 19/02/2010.

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte

Dra. Ana Thereza Chaves

Dra. Fernanda Fortes de Araújo

Karine Silvestre Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq –
nº 474887/2004-9)

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – nº CBB-1322/05)

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES IV – nº 400266/2006-7)

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

“Os sonhos são como vento, você os sente, mas não sabe de onde eles vieram e nem para onde vão. Eles inspiram o poeta, animam o escritor, arrebatam o estudante, abrem a inteligência do cientista, dão ousadia ao líder. Eles nascem como flores nos terrenos da inteligência e crescem nos vales secretos da mente humana...”

Augusto Cury

Dedico este trabalho ao meu esposo, aos meus pais e irmãos por tanto carinho, pela compreensão, constante incentivo e por me proporcionarem tantos momentos de alegria e refrigério.

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida e Senhor da criação, entrego mais uma conquista. É Ele que me fortalece, me inspira e me capacita.

Ao Dr. Rodrigo pela grande oportunidade ao abrir as portas do laboratório para que eu pudesse conhecer a pesquisa. Por confiar no meu potencial e me apoiar desde a iniciação científica. Obrigada pelo exemplo profissional, pelo incentivo e ensinamentos que contribuem para a minha formação científica.

À Dra. Juliana agradeço imensamente por me ajudar a trilhar meu caminho na pesquisa. Obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho, por tantos ensinamentos científicos e de vida, pela amizade e disposição. Obrigada por muitas vezes abrir mão do seu tempo para me ajudar e até mesmo abrir as portas da sua casa para que pudéssemos discutir ciência.

Ao Dr. Manoel Otávio pela atenção e por todos os ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento científico. Obrigada por me proporcionar a oportunidade de conviver com os pacientes portadores da doença de Chagas e pela disponibilidade na obtenção do sangue dos pacientes utilizados neste estudo.

Aos doadores de sangue, cuja participação foi essencial para a execução desse trabalho, pela convivência que me trouxe ricos conhecimentos práticos sobre a doença de Chagas.

À Clari, Renata e Wallison pelo agradável convívio e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À Lorena e Luciana pela amizade, alegria e auxílio, principalmente durante a fase experimental desse trabalho.

À Tiza pelo auxílio e paciência na parte de Citometria de Fluxo.

À estudante de iniciação científica Karine pelo auxílio e companhia durante a realização dos experimentos e principalmente pela amizade.

À Dra. Fernanda pelo exemplo de dedicação, por me ajudar em momentos de desespero, e pela tão especial amizade.

Aos grandes amigos do Laboratório de Imunologia, Roberta, Anna Carolina, Marcos, Karine, Fernanda, Jack Maria, Lorena, Ana Thereza e Jack Fiúza.

À todos os funcionários e estudantes do Laboratório de Imunologia pela convivência e aprendizagem.

Aos amigos do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração pelo agradável convívio e auxílio em todos os momentos.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela infra-estrutura técnica.

Ao meu esposo por tanto amor e compreensão. Obrigada por ser meu maior incentivador, por juntos construirmos sonhos, pelos momentos de alegria que tanto me trouxeram conforto.

Aos meus pais pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos que levarei sempre comigo. Obrigada pela dedicação e por sempre me apoiarem. Aos meus irmãos pelo carinho e pelos muitos momentos de diversão.

À minha família, amigos de longos anos e amigos de faculdade, sempre torcendo pelo meu sucesso.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse trilhar esses caminhos.

Sumário

| | |
|---|--------------|
| Lista de Figuras..... | XII |
| Lista de Tabelas..... | XIV |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos..... | XV |
| Resumo..... | XVII |
| Abstract..... | XVIII |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 22 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 23 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1 Caracterização da população estudada..... | 34 |
| 4.1.1 Critérios de exclusão..... | 35 |
| 4.2 Obtenção do antígeno solúvel de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TRIPO)..... | 36 |
| 4.3 Análise <i>ex vivo</i> do fenótipo celular de linfócitos B reguladores no sangue periférico..... | 36 |
| 4.4 Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos B reguladores após estimulação <i>in vitro</i> | 37 |
| 4.5 Detecção de apoptose através da marcação por Caspase-3 ativa..... | 38 |
| 4.6 Aquisição e análise dos dados no Citômetro de Fluxo..... | 39 |
| 4.7 Análise Estatística..... | 43 |
| 5 RESULTADOS..... | 44 |
| 5.1 Determinação do percentual de células B convencionais no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 45 |
| 5.2 Caracterização das células B reguladoras no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3 Avaliação da expressão de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de linfócitos B reguladores no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 54 |
| 5.4 Análise da expressão de moléculas de ativação na superfície de linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 59 |
| 5.5 Avaliação da expressão de marcadores de apoptose intracelulares em linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 63 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 67 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 74 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 76 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Análise do percentual de linfócitos B convencionais do sangue periférico por citometria de fluxo..... | 41 |
| Figura 2: Análise de linfócitos B reguladores do sangue periférico e da expressão intracitoplasmática de citocinas por linfócitos B reguladores, por citometria de fluxo..... | 42 |
| Figura 3: Análise da expressão de CD19 por linfócitos B convencionais do sangue periférico..... | 46 |
| Figura 4: Análise da expressão de CD1d por linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 48 |
| Figura 5: Análise da expressão de CD21 por linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 49 |
| Figura 6: Análise da expressão de CD21 e CD1d por linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 50 |
| Figura 7: Análise do percentual de linfócitos B CD19 ⁺ CD43 ⁻ do sangue periférico..... | 52 |
| Figura 8: Análise do percentual de linfócitos B CD19 ⁺ CD43 ⁻ CD1d ⁺ do sangue periférico..... | 53 |
| Figura 9: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática IL-10 por linfócitos B CD19 ⁺ CD21 ⁺ do sangue periférico..... | 55 |
| Figura 10: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática TGF-β por linfócitos B CD19 ⁺ CD21 ⁺ do sangue periférico..... | 56 |
| Figura 11: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática IL-10 por linfócitos B CD19 ⁺ CD43 ⁻ do sangue periférico..... | 57 |
| Figura 12: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática TGF-β por linfócitos B CD19 ⁺ CD43 ⁻ do sangue periférico..... | 58 |
| Figura 13: Análise da expressão de CD80 na superfície de linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 60 |
| Figura 14: Análise da expressão de CD86 na superfície de linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 61 |
| Figura 15: Análise da co-expressão de CD80 e CD86 na superfície de linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 16: Análise da expressão da molécula Granzima B por linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 64 |
| Figura 17: Análise da expressão da Caspase 3 por linfócitos B CD19 ⁺ do sangue periférico..... | 66 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Características da população estudada..... | 34 |
| Tabela 2: Relação dos anticorpos usados para caracterização das células B reguladoras..... | 38 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- APC** – Aloficocianina
- APCs** – Células apresentadoras de antígenos
- BCR** – Receptor de célula B
- Breg** – Células B reguladoras
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CARD** – Indivíduos portadores da forma clínica cardíaca
- CCL** – Quimiocina [Chemokine (C-C motif) ligand]
- CD** – Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CD1d** – Molécula envolvida na apresentação de antígenos à células T
- CD3** – Marcador de superfície celular de linfócitos T
- CD4** – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD5** – Marcador de superfície celular de linfócitos B1
- CD8** – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD19** – Marcador de superfície celular de linfócitos B
- CD21** – Receptor dos fragmentos C3 do complemento
- CD25** – Cadeia α do receptor para a citocina IL-2
- CD40** – Molécula de ativação de linfócitos B
- CD43** – Molécula de ativação de leucócitos
- CD80 (B7.1)** – Molécula que fornece sinal coestimulatório às células T. Ligante de CD28
- CD86 (B7.2)** – Molécula que fornece sinal coestimulatório às células T. Ligante de CD28.
- CDG** – Indivíduos portadores da forma clínica cardiodigestiva
- CO₂** – Gás carbônico ou Dióxido de carbono
- C3** – Fragmentos do complemento
- CTLA-4** – Molécula de superfície inibidora de ativação celular presente em linfócitos T
- CTR-DIP** – Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
- CXCL10** – Quimiocina [Chemokine (C-X-C motif) ligand]
- DIG** – Indivíduos portadores da forma clínica digestiva
- EAE** – Encefalomielite auto-imune experimental
- EKG** – Eletrocardiograma
- EDTA** – Etilenodiaminotetracético
- EPI** – Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*
- EUA** – Estados Unidos da América
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FL – Fluorescência
FLS – Facs Lysing Solution (Solução de lise comercial)
Foxp3 – Repressor de transcrição
FSC – Forward Scatter/ Tamanho celular
HAS – Hipertensão arterial sistêmica
IFN- γ – Interferon gamma
Ig – Imunoglobulina
IL- Interleucina
IND – Indivíduos portadores da forma clínica indeterminada
LPS – Lipopolissacarídeos
MFF – Solução fixadora
mRNA – RNA mensageiro
NI – Indivíduos não infectados
NK – Natural Killer
NO – Óxido nítrico
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Tampão Fosfato Salínico
PBS-P – PBS-W a 0,5% de saponina
PBS-W – PBS a 0,5% de albumina sérica bovina
PE – Ficoeritrina
PerCP – Proteína Clorofila Piridinina
RPMI – Meio de cultura (Rosweel Park Memorial Institute)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
SSC – Side Scatter/ Granulosidade e complexidade interna de uma célula
TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th1 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg – Células T reguladoras
TRIPO – Formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Resumo

Vários mecanismos imunorreguladores têm sido propostos na infecção causada pelo protozoário *T. cruzi* como imunossupressão, apoptose e citocinas reguladoras. Recentemente, foi identificada uma nova subpopulação de células B com características reguladoras, capazes de suprimir a progressão e/ou melhorar a recuperação de inflamações mediadas pela imunidade adquirida, principalmente pela produção de IL-10 e TGF- β . Apesar de existirem relatos sobre alguns marcadores para Bregs em camundongos, não há uma definição clara de uma combinação específica de marcadores para determinar a população das células B reguladoras humana. Atualmente, ainda não existem relatos sobre o papel ou mesmo a presença de células B reguladoras em pacientes portadores da doença de Chagas. Diante disso, nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar o perfil fenotípico das células B reguladoras em indivíduos portadores das formas clínicas indeterminada (IND) ou cardíaca (CARD) da doença de Chagas. Nossos resultados mostraram que pacientes apresentando a forma clínica IND possuem maior percentual de células B CD19⁺CD21⁺CD1d⁺, uma das subpopulação de células B reguladoras descrita em modelo murino, no sangue periférico. Adicionalmente, nossos dados mostraram que os pacientes do grupo IND também possuem maior percentual de células B CD19⁺CD43⁻CD1d⁺, outra subpopulação de células B reguladoras, assim como os pacientes do grupo CARD, após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram ainda que as subpopulações de células B CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻ dos pacientes com a forma clínica CARD apresentaram maior expressão intracitoplasmática de IL-10. Por outro lado, a expressão intracitoplasmática de TGF- β foi maior nos linfócitos B reguladores dos indivíduos do grupo NI. Além disso, as células B CD19⁺ dos pacientes portadores da doença de Chagas apresentam maior expressão de marcadores de ativação e de apoptose. De fato, ainda são necessários estudos adicionais para melhor compreender a atividade funcional das células B reguladoras durante a infecção por *T. cruzi*. No entanto, nossos dados reforçam a importância dos mecanismos de imunorregulação no desenvolvimento da doença de Chagas, sugerindo que a resposta imune contra o *T. cruzi* pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro e que os mecanismos reguladores desenvolvidos pelos indivíduos portadores das diferentes formas clínicas são distintos.

Abstract

Many immunoregulatory mechanisms have been proposed for the infection caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, including those that involve immunosuppression, apoptosis and regulatory cytokines. Recently, a new subset of B cells, the regulatory B cells, has been identified. The immune regulatory role of B cell includes suppressing adaptive immune responses, mainly by mechanisms IL-10 and TGF- β -dependent. Several studies have reported potential markers identifying regulatory B cells, in mice. However, little is known regarding the possible phenotypic profile to identify regulatory B cells in humans. Currently, there are no reports of the role or even the presence of regulatory B cells in patients with Chagas disease. In this study we evaluate the phenotypic profile of regulatory B cells in patients with the indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. Our results showed that patients with the IND clinical form present an increase on the percentage of CD19⁺CD21⁺CD1d⁺ B cells, in the peripheral blood. Further, the data show that patients from the IND group also present an increase on the percentage of CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ B cells, as well as in patients from the CARD group, after *in vitro* stimulation with antigens of *T. cruzi*. Our results also revealed that subsets of regulatory B cells CD19⁺CD21⁺ and CD19⁺CD43⁻ in patients with the CARD clinical form showed higher expression of intracytoplasmic IL-10. On the other hand, the expression of intracytoplasmic TGF- β was higher in B lymphocytes of subjects from the NI group. Moreover, CD19⁺ B cells from patients with Chagas disease presented higher expression of activation and apoptosis markers. In fact, additional studies are needed to better understand the functional activity of regulatory B cells during infection with *T. cruzi*. However, our data emphasizes the importance of immunoregulatory mechanisms for the development of Chagas disease, suggesting that the immune response against *T. cruzi* can be regulated by several suppressive mechanisms from the host and that these regulatory mechanisms are distinct in the different clinical forms of Chagas disease.

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas, em 1909, que descreveu pela primeira vez seu agente etiológico, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, e o inseto que o transmitia, triatomíneo conhecido como “barbeiro”. O “feito” de Chagas é considerado único na história da medicina e constitui um marco decisivo na história da ciência e da saúde brasileira. Segundo a Organização Mundial de Saúde existem aproximadamente 15 milhões de indivíduos infectados na América Latina, apresentando o Brasil cerca de 5 milhões de pacientes portadores da doença de Chagas (WHO, 2003).

Estima-se que durante a fase crônica da doença cerca de 60% dos indivíduos infectados apresentam a forma clínica indeterminada, com ausência de sinais e sintomas. Entretanto, 30% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca, resultante de danos progressivos do miocárdio levando a cardiopatia chagásica (Dias, 1989). Apesar da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* já ter sido controlada no Brasil, os casos de indivíduos crônicos remanescentes ainda representam um sério problema de saúde pública e econômico em muitos países da América Latina.

Vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle e/ou desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas na tentativa de encontrar marcador(es) de prognóstico de evolução da morbidade, permitindo, assim, a identificação de pacientes que possam ser acompanhados mais intensamente, e que deverão receber tratamentos alternativos, quando disponíveis.

A participação de componentes imunológicos na instalação, desenvolvimento ou manutenção da patogênese chagásica constitui, ainda, um ponto de grande importância a ser investigado. Com relação às formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, não existem trabalhos que correlacionam o papel das células B reguladoras com o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica. Nesse sentido, estudamos e analisamos o fenótipo celular das células B reguladoras no sangue total de pacientes portadores da doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Determinar o perfil fenotípico das células B reguladoras no sangue periférico de pacientes crônicos portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos:

Caracterizar o fenótipo das células B reguladoras através da expressão das moléculas de superfície (CD1d, CD21, CD43) no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos da forma tripomastigota (TRIPO) do *T. cruzi*;

Caracterizar o perfil de secreção de citocinas intracitoplasmáticas (IL-10 e TGF- β) das células B reguladoras no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas antes e após estimulação *in vitro* com TRIPO;

Avaliar a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) nas células B no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com TRIPO;

Caracterizar a presença de marcadores de apoptose (Granzima B e Caspase 3) nas células B no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com TRIPO.

A doença de Chagas foi primeiramente descrita em 1909 por Carlos Chagas, que reportou seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, transmitido por inseto da ordem Hemiptera (Chagas, 1909). Após um século de sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um sério problema de saúde e econômico em muitos países da América Latina. Além disso, devido o crescimento da migração populacional, um maior número de casos de doença de Chagas, importados da América Latina, tem sido detectado em áreas não-endêmicas, tais como América do Norte e muitas partes da Europa, Ásia e Oceania (Schmunis, 2007; Schmunis & Yadon, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde existem aproximadamente 15 milhões de indivíduos infectados na América Latina, dos quais, 5 milhões estão no Brasil (WHO, 2003). Apesar dos grandes avanços obtidos no controle da transmissão natural, cerca de 50.000 novos casos ocorrem a cada ano (Dias *et al.*, 2008).

A principal forma de transmissão da doença ao homem é a transmissão vetorial, considerada, ainda hoje, responsável por mais de 70% dos casos em países em que não existe controle vetorial sistemático (Coura & Dias, 2009). A transmissão se dá pelo contato do hospedeiro vertebrado com as fezes e/ou urina do inseto vetor, contaminadas com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Barreto, 1979). A infecção dos insetos ocorre durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, quando os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos e, uma vez no intestino do inseto, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em formas epimastigotas e, posteriormente, em tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são expelidos com as fezes e/ou urina do inseto vetor no local da picada, após o repasto sanguíneo, e penetram no hospedeiro através da pele lesada ou da mucosa. As formas tripomastigotas se desenvolvem no interior de diferentes tipos de células do hospedeiro vertebrado, onde se transformam em formas amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias, evoluindo, posteriormente, para as formas tripomastigotas. As células infectadas rompem-se e os parasitos livres invadem células próximas ou alcançam a corrente sanguínea disseminando a infecção para os diferentes órgãos e sistemas (Dias, 2000).

Outras formas de transmissão também já foram descritas, como transfusional, congênita, por transplante de órgãos ou acidentes laboratoriais (Bittencourt, 1976; Brener, 1987; Schmunis, 1991; Dias, 2000). Recentemente, ocorreram surtos da doença de Chagas aguda e morte após ingestão de bebidas, como suco de cana e açaí, contaminados com as formas tripomastigotas. Essa contaminação ocorreu, provavelmente, no momento do preparo dos sucos quando os insetos vetores silvestres infectados foram triturados ou suas fezes

contaminaram o alimento, conforme divulgado no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (Brasil, 2005).

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda é muitas vezes assintomática ou pode se limitar a uma doença febril que dura de 4 a 8 semanas (Coura, 2007; Moncayo & Silveira, 2009). Após um período mínimo de incubação de uma ou duas semanas, alguns indivíduos recentemente infectados podem desenvolver sinais e sintomas graves, tais como febre, calafrios, náusea e vômito, diarreia, erupção cutânea e irritação da meninge. Podem apresentar ainda, uma lesão inflamatória no local da entrada do parasito (chagoma), edema periorbital unilateral (sinal de Romana), conjuntivite, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Anormalidades laboratoriais não são específicas e podem incluir anemia, trombocitopenia e elevação das enzimas hepáticas e cardíacas (Tanowitz *et al.*, 2009).

Em muitos pacientes, com o desenvolvimento da resposta imune específica tanto celular como humoral, a parasitemia diminui e os sinais e sintomas são resolvidos completamente em cerca de 2 a 4 meses, ocorrendo a recuperação de um estado aparentemente saudável (Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009). Esses indivíduos entram, então, na fase crônica da doença de Chagas que perdura por toda a vida do indivíduo infectado.

Do ponto de vista clínico, as manifestações desenvolvidas durante a fase crônica permitem a classificação dos pacientes em diferentes formas clínicas: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardiodigestiva (CDG). A forma clínica IND é observada na maioria dos pacientes infectados (50-60%). Esses pacientes apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi* e exames clínicos como eletrocardiográficos e radiológicos (silhueta cardíaca, esôfago e cólon) normais (Dias, 1989; Macedo, 1997; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009). No entanto, exames adicionais mais sofisticados podem demonstrar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto uma evolução no curso da infecção como resquícios do processo inflamatório agudo ou crônico inicial, já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica evidente (Dias, 2000).

Os pacientes portadores da forma clínica indeterminada podem permanecer sem manifestações clínicas graves atribuídas à persistência do parasito. Entretanto, cerca de 2 a 5% desses indivíduos irão desenvolver a forma CARD a cada ano, enquanto uma menor porcentagem irá apresentar a forma DIG (Macedo, 1980; Dias, 1989).

O envolvimento cardíaco é a manifestação mais séria e mais frequente da fase crônica da doença, afetando 20-40% de indivíduos, variando de alguns anos a décadas após a infecção

inicial (Rassi Jr *et al.*, 2000; Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz *et al.*, 2009). Pacientes portadores da forma clínica CARD podem apresentar alterações eletrocardiográficas decorrentes da infecção chagásica, levando ao surgimento de arritmias e insuficiência cardíaca (Brener, 1987). A cardiomiopatia chagásica crônica caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, levando ao aparecimento de fibrose no tecido cardíaco (Andrade, 2000). Tais características podem desencadear três grandes sinais, que podem coexistir no mesmo paciente: disritmia cardíaca, falência cardíaca e tromboembolismo (sistêmica e pulmonar) (Rassi Jr *et al.*, 2000).

O quadro clínico varia muito de acordo com a extensão e localização das lesões cardíacas. Nos estágios iniciais, o paciente pode apresentar sintomas leves, relacionados a distúrbios de ritmo. Nos estágios intermediários, as manifestações clínicas persistem ou se intensificam, podendo ser detectado aumento do coração, de grau leve a moderado. Nos estágios finais, há acentuado aumento do coração com grave insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves (Mady *et al.*, 1994).

A forma clínica DIG apresenta uma prevalência de 6-9% em indivíduos acometidos pela doença de Chagas e tem como principais manifestações clínicas as dilatações do cólon e esôfago, também chamadas de megacólon e megaesôfago, respectivamente. A denominação de forma clínica DIG foi inicialmente proposta por Rezende (1959) para os casos de pacientes que apresentavam a doença de Chagas, sem a presença de alterações cardíacas, mas com megacólon e/ou megaesôfago bem caracterizados (Dias, 1989).

Embora já se tenha um grande conhecimento sobre a doença de Chagas e suas consequências, ainda não é possível explicar como alguns indivíduos infectados desenvolvem formas graves da doença e nem o fato das manifestações clínicas serem tão heterogêneas. Baseado na complexidade dos mecanismos envolvidos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, muitos grupos de pesquisa concentram seus estudos na busca de marcadores de prognóstico de evolução dessas manifestações clínicas graves. Elementos ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, estado nutricional, genética, perfil da resposta imune) são apontados como possíveis fatores que ditariam as consequências finais da infecção, mas parâmetros específicos preditivos ainda não foram identificados (Rassi Jr *et al.*, 2006; Costa & Lorenzo, 2009).

O prolongado período de latência e a escassez no número de parasitos, contrapostos à intensidade e à extensão das lesões, têm levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores auto-imunes na patogênese da lesão chagásica (Wood *et al.*, 1982; Acosta &

Santos-Buch, 1985; Kierszenbaum, 1986; Van Voorhis & Eisen, 1989; Levitus *et al.*, 1991; Cunha-Neto *et al.*, 1995; Kalil & Cunha-Neto, 1996; Al-Sabbagh *et al.*, 1998; Ribeiro dos Santos *et al.*, 2001; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2007). Entretanto, outros trabalhos sugerem que o parasitismo intracelular pode ser mais freqüente do que previamente demonstrado por microscopia ótica, sugerindo haver, na patologia chagásica, uma participação direta da reatividade imunológica contra células parasitadas (Jones *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Añez *et al.*, 1999; Palomino *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 1993,1997, 2003; Gutierrez *et al.*, 2009).

A resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa e representa um importante fator na determinação do destino da infecção. Já tem sido bem aceito que a ausência de patologia chagásica está principalmente associada com a habilidade do hospedeiro infectado para regular a resposta imune anti-*T. cruzi*. Entretanto, essa resposta, que controla a parasitemia persistente, também pode contribuir para o dano inflamatório que causa a morbidade da doença de Chagas (Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

Durante a infecção aguda, existe uma intensa reação inflamatória. Citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, TNF- α e IFN- γ , são prontamente liberadas, por células imunes ativadas e ativam ainda mais outras células inflamatórias (Huang *et al.*, 1999; Michailowsky *et al.*, 2001, Bilate & Cunha-Neto, 2008; Machado *et al.*, 2008). Vários estudos têm mostrado uma associação entre IFN- γ e a resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *T. cruzi* (Reed, 1988; McCabe *et al.*, 1988, 1991; Nabors & Tarleton, 1991; Torrico *et al.*, 1991; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995; Cardillo *et al.*, 1996; Holscher *et al.*, 1998; Sardinha *et al.*, 2006). Acredita-se que o IFN- γ ative macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO) que, por sua vez, inibe a replicação intracelular do parasito (Reed, 1988; Gazzinelli *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994; Bergeron *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Guiñazú *et al.*, 2007). Por outro lado, a IL-10 é capaz de inibir a ativação de macrófagos induzida por IFN- γ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células Th1 (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994; Abrahamsohn & Coffman, 1996; Abbas *et al.*, 2000). Macrófagos e células dendríticas que endocitaram o parasito, subsequentemente promovem uma forte resposta de células T e de anticorpos contra o *T. cruzi*. Células T específicas são, então, geradas e migram juntamente com outros leucócitos sanguíneos para o local da inflamação em resposta a quimiocinas, tais como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, participando da resposta imune contra o parasito. Essa resposta inflamatória leva a um controle, mas não a uma completa eliminação do parasitismo tecidual (Teixeira *et al.*, 2002; Golgher & Gazzinelli, 2004; Savino *et al.*, 2007).

A forte estimulação imune e o intenso processo inflamatório suscitado durante a infecção aguda pode não ser o único determinante da imunopatologia associada com a fase crônica da doença, mas pode ser um fator crucial para o confinamento do agente etiológico em locais intracelulares, e deste modo limitando a infecção ao longo da vida e prevenindo o dano tecidual (Hontebeyrie-Joskowicz & Minoprio, 1991; Samudio *et al.*, 1998; Marinho *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2002).

Devido a limitações éticas de se estudar o perfil fenotípico do infiltrado inflamatório e lesões decorrentes da infecção crônica da doença de Chagas, vários pesquisadores tem utilizado o sangue periférico como estratégia para avaliar a resposta imunológica desencadeada durante a fase crônica da doença. A avaliação de células do sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos demonstrou um grande número de células T e B circulantes (Dutra *et al.*, 1994; Sathler-Avelar *et al.*, 2003). Além disso, células T de pacientes, incluindo todas as formas clínicas da doença crônica, apresentam características de ativação e são capazes de produzir citocinas em resposta a antígenos do parasito (De Titto *et al.*, 1983; Morato *et al.*, 1986; Michailowsky *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003; Barros-Mazon *et al.*, 2004; Dutra *et al.*, 2009). Ademais, na doença de Chagas também foi observado que monócitos derivados de pacientes do grupo IND apresentam características moduladoras, como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10, enquanto monócitos derivados de pacientes do grupo CARD parecem estar comprometidos com intensa resposta inflamatória devido à alta expressão de TNF- α (Souza *et al.*, 2004), sugerindo uma participação crítica dessas células na infecção.

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência a infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas. A avaliação do papel imunorregulador das citocinas na doença de Chagas humana ainda é escassa. Dutra *et al.* (1997), utilizando RT-PCR, analisaram os níveis de expressão de mRNA para várias citocinas em Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados (NI). A análise de PBMC antes de estimulação antigênica mostrou que os níveis de expressão de mRNA para IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ encontravam-se aumentados nos pacientes quando comparados aos indivíduos NI. A estimulação de PBMCs de pacientes por antígenos parasitários (EPI e TRIPO) mostraram um aumento na expressão de mRNA para IFN- γ e baixa para IL-10. O inverso foi observado após estimulação por anticorpos anti-epimastigota. Já foi demonstrado que pacientes apresentando a forma clínica CARD apresentam alterações nos níveis de secreção de IFN- γ e IL-10 e que estes níveis correlacionam diretamente com o desenvolvimento das formas mais graves da doença (Abel

et al., 2001; Gomes *et al.*, 2003). Esses autores mostraram que pacientes CARD e IND secretam IFN- γ diferencialmente ao estímulo induzido pelo *T. cruzi*, sugerindo que um perfil do Tipo 1 pode ter papel no desenvolvimento da cardiopatia. Adicionalmente, foi observado que a razão entre as citocinas IFN- γ /IL-10 está aumentada nos pacientes CARD quando comparada aos pacientes IND, entretanto, a razão IL-10/IFN- γ nos pacientes IND era maior quando comparado aos pacientes CARD (Gomes *et al.*, 2003). Interessantemente, quando foi re-avaliada a produção destas citocinas após 2 anos de estudo foi verificado que os pacientes IND, que evoluíram para a forma clínica CARD, apresentavam uma diminuição ou inversão significativa da razão IL-10/IFN- γ e um aumento significativo da razão IFN- γ /IL-10 (Gomes *et al.*, 2003).

Os mecanismos utilizados para a regulação da resposta imune nas diferentes infecções ainda não estão totalmente esclarecidos. As células T reguladoras (Treg), que são tipicamente identificadas em humanos como células T CD4⁺CD25^{high}, estão entre os mais recentes mecanismos imunorreguladores descritos (Baecher-Allan *et al.*, 2001). Células Treg têm emergido como um central ponto de controle na modulação de várias respostas imunes, incluindo respostas auto-imunes e imunidade a micróbios infecciosos (Piccirillo, 2008).

Aumentados níveis de células Treg CD4⁺CD25^{high} pode ser observado no sangue periférico de pacientes IND (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005), correlacionados negativamente com os altos níveis de células T CD8⁺ ativadas. Esses dados sugerem que a expansão de células Treg CD4⁺CD25^{high} durante a doença de Chagas poderia ser um mecanismo regulatório, limitando o dano tecidual e causando a persistência por longo período da clínica indeterminada da doença de Chagas. Por outro lado, a ausência de eventos regulatórios em pacientes CARD pode colaborar para uma resposta imune exagerada que culmina em forte resposta citotóxica pelas células T CD8⁺ e subsequente dano tecidual (Gomes *et al.*, 2003; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008).

Araújo *et al* (2007) demonstraram que pacientes apresentando a forma clínica IND possuem maior percentual de células Treg CD4⁺CD25^{high} no sangue periférico e que essas células mantêm a expressão de Foxp3 por períodos de tempo semelhantes aos dos indivíduos NI. Por outro lado, os pacientes do grupo CARD apresentam um aumento de células CD4⁺CD25^{high} CTLA-4⁺, Granzima B⁺ e apresentam uma queda na expressão de Foxp3 após alguns dias de cultura. Foi observado também que as células Treg dos pacientes portadores da doença de Chagas apresentam perfil de ativação e de migração, e atuam de forma específica, possuindo uma tendência a regular a atividade de células efetoras (Araújo, 2009). Células Treg podem ser importantes no controle da resposta inflamatória para *T. cruzi* em pacientes IND pela expressão de IL-10, que contribui para um eficiente controle do parasito por células

efetoras sem o desenvolvimento da imunopatologia tecidual (Araújo *et al.*, 2007; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Todavia, distintas vias regulatórias envolvendo outras células imunes também existem.

Atualmente, o conceito de células B reguladoras (Breg) tem emergido, trazendo novos caminhos de investigação no campo da imunorregulação. As células B podem desempenhar um papel patogênico em respostas imunes adaptativas pela produção de auto-anticorpos, que contribuem para o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Todavia, além das células B patogênicas, existem subclasses distintas de células B que suprimem a progressão e/ou melhoram a recuperação de inflamações mediadas pela imunidade adquirida, por mecanismos que incluem a produção de IL-10 e TGF- β , apresentação secundária de antígenos e interação com outras células imunes diretamente ou através de anticorpos secretados (Mizoguchi & Bhan, 2006).

Em meados dos anos 70, Morris & Moller investigaram a hipótese de células B exercerem papel supressor por meio da produção de anticorpos inibidores ou neutralizantes (Morris & Moller, 1968). Entretanto, a existência de uma subpopulação de linfócitos B com capacidade imunorreguladora foi primeiramente descrita por Janeway e colaboradores (1996), no contexto patológico da encefalomielite auto-imune experimental (EAE). Apenas em 1997, Bhan e Mizoguchi introduziram pela primeira vez o termo células B reguladoras (Mizoguchi *et al.*, 1997).

Posteriormente, Mizoguchi *et al* (2002) demonstraram, em modelo murino, uma subpopulação de linfócitos B no tecido linfóide associado à mucosa caracterizada pela alta expressão de CD1d. Essa subpopulação apareceu apenas quando o tecido estava cronicamente inflamado, e foi responsável pela produção de IL-10 e pela supressão da progressão da inflamação intestinal. Indicando que células B, por meio da produção de IL-10, podem atuar como células reguladoras em reações inflamatórias mediadas por respostas imunes. Além disso, células B reguladoras produtoras de IL-10 apareceram apenas sob condições inflamatórias e não foram detectadas em estados normais (Mizoguchi *et al.*, 2002). Assim, o ambiente inflamatório parece ser requerido para a diferenciação e/ou ativação de Bregs. Ademais, as células Bregs são assim classificadas independentemente das imunoglobulinas secretadas.

Ainda não há um consenso sobre os marcadores fenotípicos das Bregs. Em camundongos, existem diversas subpopulações de Bregs bem caracterizadas no contexto de doenças auto-imunes. Dentre essas subpopulações destacam-se os marcadores CD19, CD1d, CD43, CD21 e as citocinas IL-10 e TGF- β (Bouaziz *et al.*, 2008; Yanaba *et al.*, 2009). Todos esses marcadores são expressos em sua maioria nas células B e a expressão conjunta dos

mesmos tem caracterizado as Bregs, em camundongos. De fato, a maior parte da IL-10 é expressa por uma subpopulação de células B exibindo altos níveis de CD21, IgM (receptor de célula B - BCR) e CD1d (Mauri & Ehrenstein, 2007). A identificação e caracterização de Bregs em humanos ainda é escassa.

A diferenciação das Bregs parece ser independente do balanço Th1/Th2 (Dalwadi *et al.*, 2003). Alguns autores afirmam que CD40 é essencial para a geração de Bregs (Fillatreau *et al.*, 2002). Entretanto, outros estudos sugerem que a interação de CD40 em células B depende do estágio de maturação e da duração e força dos sinais entre células T e B, os quais ditam a diferenciação de linfócitos B em Bregs, células de memória ou células plasmáticas (Saeland *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002).

Além das Bregs produtoras de IL-10, existe uma subclasse de Breg capaz de produzir TGF- β após estimulação *in vitro* com LPS. Essa subclasse participa na indução da tolerância oral de baixa-dose. Ao contrário das Bregs produtoras de IL-10, Bregs produzindo TGF- β não desenvolvem *in vivo* (Parekh *et al.*, 2003; Duddy *et al.*, 2004).

As Bregs suprimem a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células NKT, primariamente, por meio da produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β . São capazes de reduzir a imunidade patogênica das células Th1 promovendo a apoptose destas células e/ou inibindo a apresentação de antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) por meio da secreção de TGF- β . Podem também regular negativamente a inflamação, favorecendo a geração de células T reguladoras ou células NKT (Mauri & Ehrenstein, 2007; Bouaziz *et al.*, 2008). Além disso, promovem a remoção de corpos apoptóticos, evitando que estes desencadeiem respostas inflamatórias (Mauri & Ehrenstein, 2007).

Como Bregs suprimem a auto-imunidade por meio da inibição de células T auto-reativas, poderiam também regular a resposta protetora de linfócitos T citotóxicos contra células T tumorais. Uma imunidade anti-tumor intensificada, com atividade de linfócitos T e células NK aumentada, pode ser observada em camundongos deficientes em células B (Terabe *et al.*, 2005). Assim, a depleção de células B poderia terapeuticamente intensificar respostas imunes a alguns tumores.

O papel das Bregs em infecções tem sido documentado apenas em algumas doenças infecto-parasitárias. Harris e colaboradores (2000, 2005) demonstraram que, assim como as células TCD4⁺, linfócitos B podem também produzir um largo espectro de citocinas sob condições inflamatórias induzidas pela infecção por *Toxoplasma gondii* ou *Heligmosomides polygyrus*. Notavelmente, células B produzem IL-10, a citocina reguladora que pode suprimir respostas imunes nocivas, regulando o balanço Th1/Th2 e diminuindo diretamente respostas

imunológicas mediadas por células da imunidade inata (Fiorentino *et al.*, 1991; Grunig *et al.*, 1997; Pestka *et al.*, 2004). As células B que produzem IL-10 devido à inflamação inibem a progressão da inflamação e/ou aceleram a recuperação de condições de inflamação experimental tais como na doença inflamatória intestinal, EAE, artrite e lúpus (Mizoguchi *et al.*, 2002; Fillatreau *et al.*, 2002; Mauri *et al.*, 2003; Lenert *et al.*, 2005), doenças nas quais células B produzindo anticorpos têm um papel patogênico. Tais células B produtoras de IL-10 também têm sido identificadas em humanos (Duddy *et al.*, 2004).

Camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* e deficientes em células B apresentaram uma redução significativa da sobrevivência (Majlessi *et al.*, 2008). Outros estudos sugerem que a IL-10 produzida por linfócitos B participaria na limitação da patologia causada pelo *Schistosoma mansoni* (Velupillai *et al.*, 1994, 1997). Além disso, Hernandez e colaboradores (1997) demonstraram que camundongos deficientes em células B montaram uma forte resposta Th1 contra o antígeno de ovo, enquanto que no grupo controle a resposta Th2 predominou.

Na infecção por *Leishmania*, a transferência de células B para camundongos infectados deficientes em células B converteu resistência à infecção em susceptibilidade, sugerindo que células B são capazes de promover a doença (Hoerauf *et al.*, 1996).

Na doença de Chagas, Sathler-Avelar e colaboradores (2003) mostraram que os níveis de linfócitos B estavam aumentados na fase aguda tardia, bem como nos estágios iniciais da infecção crônica. Posteriormente, em 2006, apontaram uma produção evidente de IL-10 por linfócitos T na infecção por *T. cruzi*, principalmente CD4⁺, bem como por linfócitos B, tanto no contexto *ex vivo* quanto após estimulação antigênica. Esse perfil permaneceu mesmo após o tratamento com benzonidazol (Sathler-Avelar *et al.*, 2008).

A participação de componentes imunológicos na instalação, desenvolvimento ou manutenção da patogênese chagásica constitui, ainda, um ponto de grande importância a ser investigado. Com relação às formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas, não existem trabalhos que correlacionam o papel das células B reguladoras com o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica. Nesse sentido, estudamos e analisamos o fenótipo celular das Bregs de sangue total de pacientes portadores da doença de Chagas, no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos da forma tripomastigota (TRIPO) do *T. cruzi*, nas diferentes formas clínicas.

4.1 Caracterização da população estudada

A população estudada neste trabalho constou de 27 pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas, sendo 13 pacientes com a forma clínica IND e 14 pacientes com forma clínica CARD, e 11 indivíduos não-infectados, com a idade variando entre 30-69 anos (Tabela 1). Estes pacientes foram recrutados do Ambulatório de referência em doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente pelo Professor Manoel Otávio da Costa Rocha.

Tabela 1: Características da população estudada

| <i>Forma Clínica</i> | <i>Sigla</i> | <i>Total de indivíduos</i> | <i>Sexo M/F</i> | <i>Idade</i> |
|----------------------|--------------|----------------------------|-----------------|--------------|
| Não Infectados | NI | 11 | 5/6 | 30-59 |
| Indeterminada | IND | 13 | 7/6 | 35-69 |
| Cardíaca | CARD | 14 | 8/6 | 45-62 |

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; idade compreendida entre 30 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 (sistólica < 160 mmHg e diastólica < 90 mmHg); ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas, e ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória; conclusão dos exames propostos; assentimento voluntário de participação na pesquisa.

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram divididos nos seguintes grupos:

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

Grupo 2: Constituído por pacientes portadores da forma clínica cardíaca grau V, caracterizada por cardiomegalia com ou sem sinais de insuficiência cardíaca.

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

4.1.1 Critérios de exclusão

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

- *Impossibilidade ou ausência de disponibilidade para a realização dos exames propostos;
- *Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade, ou pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a: 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou; 2) quarta bulha ao exame físico, ou; 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou; 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax;
- *Evidências clínicas ou laboratoriais de hipo ou hipertireoidismo;
- *Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e se necessário, prova de tolerância oral à glicose (National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance);
- * Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
- * Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
- * Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol);
- * Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- * Outras cardiopatias;
- * Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- * Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos;
- * Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menos que 10g/dl;
- * Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;

* Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

Os pacientes avaliados neste estudo foram voluntários e assinaram um Termo de Consentimento. Todas as dúvidas referentes à pesquisa foram esclarecidas, inclusive quanto à doação de sangue. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto René Rachou / FIOCRUZ (14/2006 – CEPESH-IRR) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (COEP- ETIC 37204).

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

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

4.3 Análise *ex vivo* do fenótipo celular de linfócitos B reguladores no sangue periférico

Alíquotas de 100ul das amostras de células sanguíneas foram coletadas a vácuo em tubos de 5ml contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer - BD, E.U.A), transferidos para tubos de poliestireno 5ml (Falcon - Becton Dickinson - BD, E.U.A) e incubadas com anticorpos monoclonais de superfície marcados com Ficoeritrina (PE), com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alofocianina (APC) ou Cloreto de Peridina Clorofila (PerCP). Os anticorpos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 2. As células e anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras de células foram lisadas e fixadas em 2ml de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - BD, E.U.A), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada às amostras 1ml de PBS-W (PBS pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e estas foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C (Centrifuga Beckman Modelo j-6b, E.U.A). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 2ml de PBS W. Em seguida, as amostras foram fixadas com 300ul de solução fixadora - MFF (10g/l de

paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2 - reagentes SIGMA, E.U.A). A análise dos parâmetros fenotípicos foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur - BD, E.U.A).

4.4 Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos B reguladores após estimulação *in vitro*

As células sanguíneas dos pacientes que participaram deste estudo foram coletadas em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. Alíquotas de 1ml de sangue total foram adicionadas em tubos de polipropileno de 12ml (Falcon, E.U.A). As células do sangue periférico foram incubadas na presença de meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A), recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença de antígenos solúveis tripomastigotas (TRIPO) do *T. cruzi*, apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação de cultura com estímulo (TRIPO).

Os tubos foram previamente incubados durante 18 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C (Forma Scientific E.U.A). Em seguida, foram adicionados a todos os tubos de cultura 20ul de Brefeldina A (SIGMA, E.U.A), 1mg/ml (concentração final de 10ug/ml). As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições acima. A utilização da Brefeldina assegura a retenção da citocina no interior da célula, uma vez que essa substância mantém a citocina no complexo de Golgi. Após a incubação, 200ul de EDTA (SIGMA, E.U.A) 20mM, obtidos de uma solução estoque de 200mM, diluída 1/10 (concentração final de 2mM) foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foram adicionados as amostras de sangue 3ml de PBS-W e estas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 2ml. Foram transferidos 200ul deste sangue para tubos de poliestireno de 5ml (FALCON, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes (Tabela 2), e em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2ml de solução de lise comercial (FLS - BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1ml de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos à 18°C. O conteúdo foi emborcado e 300ul de solução fixadora - MFF adicionada aos tubos.

Para a detecção de citocinas intracitoplasmáticas foram acrescentados aos tubos 2,5ml de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina)

por 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20ul de anticorpos anti-citocina marcados com PE, diluídos 1:20 em PBS-P aos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1ml de PBS-P e em seguida, com 1ml de PBS-W. No final, foram adicionados 300ul de solução fixadora MFF. As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FAScalibur - BD, E.U.A). Foram coletados em torno de 70.000 eventos totais.

Tabela 2- Relação dos anticorpos usados para caracterização das células B reguladoras

| Nome | Fabricante | Clone | uL/Tubo |
|-----------------|------------|----------|--------------------|
| CD19-PerCP | BD | SJ25C1 | 3 |
| CD1d-PE | BD | CD1d42 | 2 |
| CD21-APC | BD | B-ly4 | 1 |
| CD43-APC | BD | 1G10 | 0,5 |
| CD80-PE | BD | L307.4 | 2 |
| CD86-FITC | BD | 2331 | 4,5 |
| Caspase3-PE | BD | C92-605 | 10 |
| GranzimaB-PE | | 2C5/F5 | 20 (diluição 1/30) |
| IL-10 PE | BD | JES3-9D7 | 20 (diluição 1/20) |
| TGF- β PE | | IQP-169R | 20 (diluição 1/20) |

4.5 Detecção de apoptose através da marcação por Caspase-3 ativa

Alíquotas de 1mL (ajustado através da global de leucócitos/ indivíduo para 1×10^6 células/mL) das amostras de leucócitos do sangue periférico foram incubadas na presença de meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO, E.U.A), recebendo a denominação de cultura controle (C) ou na presença de antígenos solúveis tripomastigotas (TRIPO) do *T. cruzi* (25 ug/mL concentração final), recebendo a denominação de cultura com estímulo (TRIPO). As células foram incubadas por aproximadamente 24 horas, em estufa de CO2 com 5% de umidade, a 37°C. Após a incubação, foi adicionado 2 mL de PBS-W gelado (PBS contendo 0,5% de albumina sérica bovina), e então, os tubos de cultura foram centrifugados (Centrífuga

Beckman Modelo J-6B, E.U.A.) a 1300 rpm, por 7 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado. O sangue foi transferido para tubos de poliestireno de 5ml (FALCON, E.U.A) previamente identificados e com o anticorpo anti-CD19 – Cloreto de Peridina Clorofila (PerCP). Os tubos foram homogeneizados e incubados, por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram tratadas com 3 mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – FLS – BD, E.U.A.) para que os eritrócitos fossem lisados. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente, protegidos da luz. Findo este tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS-W gelado (PBS contendo 0,5% de albumina sérica bovina) e os tubos centrifugados (Centrifuga Beckman Modelo J-6B, E.U.A.) a 1300 rpm, por 7 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as células foram permeabilizadas com tampão contendo saponina PBS-P (PBS pH 7,4 contendo 0.5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 15 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Ao final desta etapa, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-caspase-3 PE (C92-605 - BD Pharmingem) usando 10 uL/1x10⁶ células, por 30 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram lavadas e fixadas com solução de fixação – MFF (10g/L paraformaldeído, 1% cacodilato de sódio, 6,65g/L cloreto de sódio, 0,01% azida sódica).

As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD, E.U.A.). Foram coletados em torno de 70.000 eventos totais.

4.6 Aquisição e análise dos dados no Citômetro de Fluxo

O citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 6 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP e APC. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foram feitas através de um sistema de computador e do software "FlowJo". Foram coletados 70.000 eventos para análise de todas as amostras.

A análise das células B convencionais foi feita através de gráficos de distribuição por densidade de pontos de FL3 (CD19) versus SSC (Figura 1A). Para os marcadores de ativação

(CD80 e CD86) e de apoptose (Granzima B e Caspase 3) foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada *Lymphocytes*, baseada em gráficos de distribuição por densidade de pontos de FSC versus SSC (Figura 1B). Em seguida, gráficos de FL3 (CD19) versus FL1 (CD86) ou FL2 (CD80, Granzima B e Caspase 3) foram construídos (Figura 1C).

A análise de células B reguladoras foi feita a partir dos marcadores CD1d, CD21, CD43. Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada *Lymphocytes*, baseada em gráficos de distribuição por densidade de pontos de FSC versus SSC (Figura 2A). Em seguida, gráficos de FL3 (CD19) versus FL4 (CD21 ou CD43) ou versus FL2 (CD1d) foram construídos (Figura 2B,C). O próximo passo consistiu da avaliação de citocinas intracitoplasmáticas (IL-10 e TGF- β) a partir dos gráficos citados acima (Figura 2D).

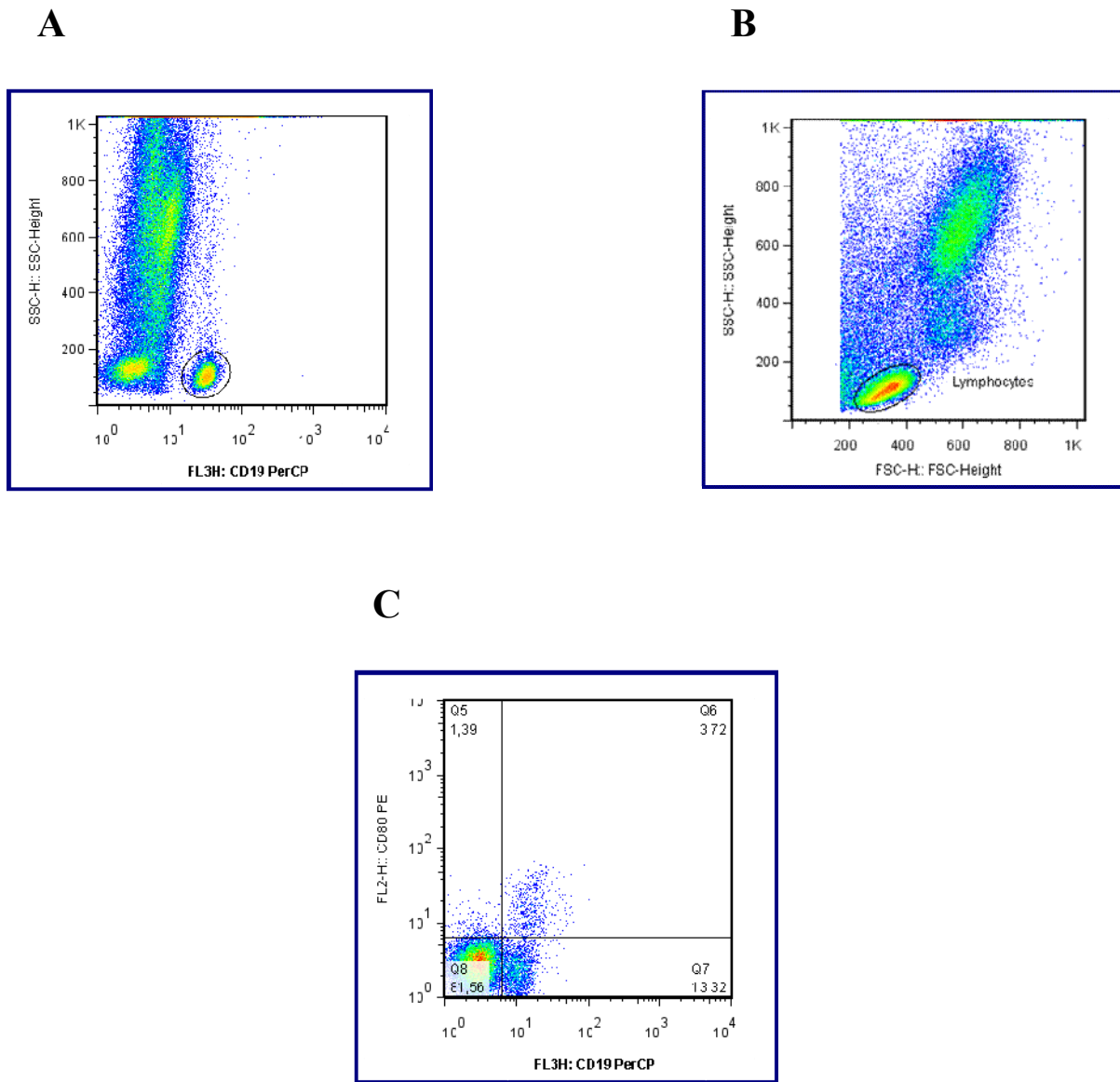


Figura 1: Análise do percentual de linfócitos B convencionais do sangue periférico por citometria de fluxo.

(A) representa o perfil celular após cultura de 22h, obtido a partir de gráficos de distribuição por densidade de pontos de FL3 (CD19) versus granulosidade (SSC, coloridos artificialmente pelo software FlowJo.

(B) representa o perfil celular característico de gráficos de tamanho versus granulosidade.

(C) representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 3 (anti-CD19 PerCP) versus fluorescência 2 (anti-CD80 PE).

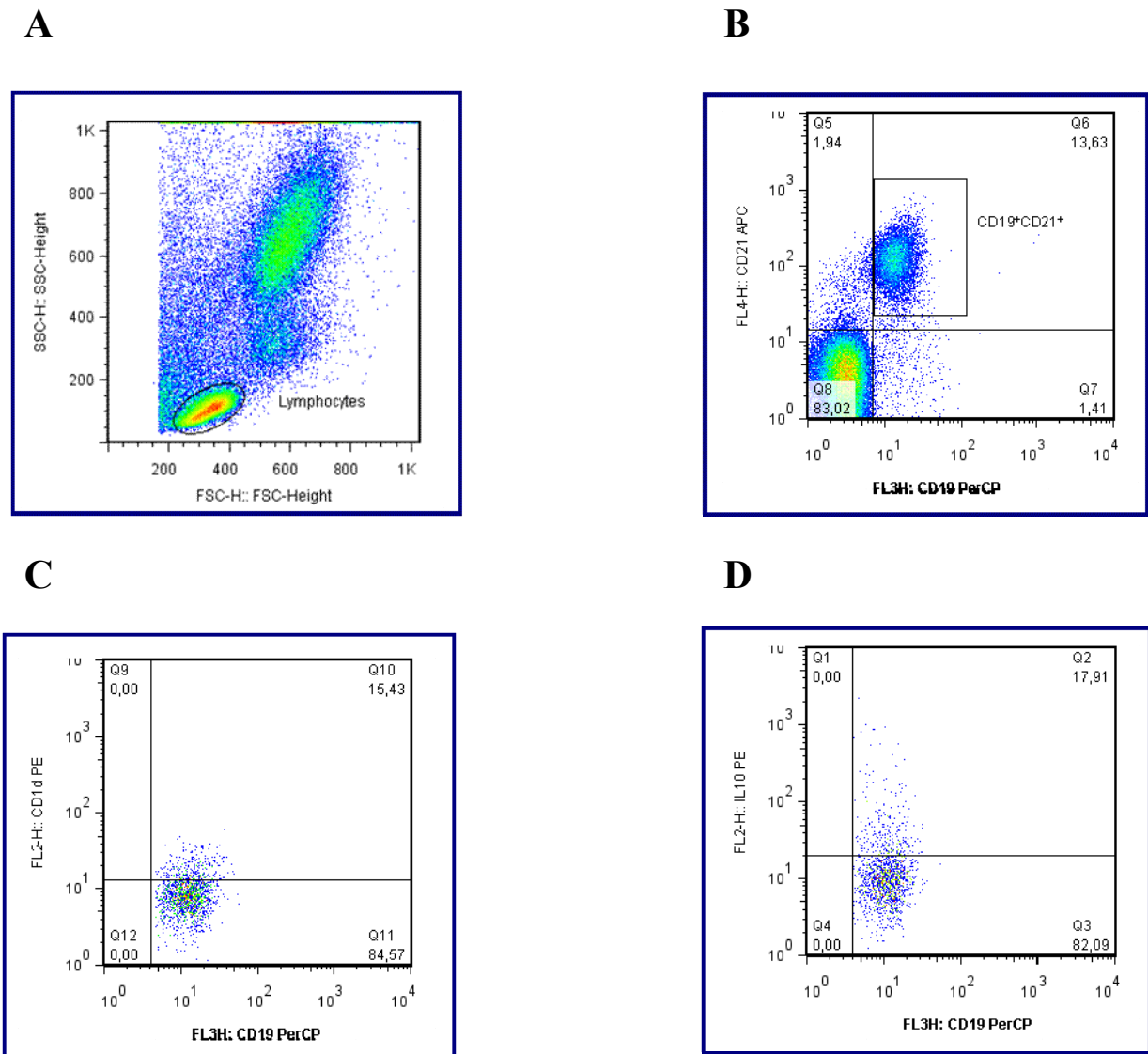


Figura 2: Análise de linfócitos B reguladores do sangue periférico e da expressão intracitoplasmática de citocinas por linfócitos B reguladores, por citometria de fluxo.

(A) representa o perfil celular obtido após cultura de 22h, característico de gráficos de tamanho versus granulosidade.

(B) representa um gráfico de fluorescência 3 (anti-CD19 PerCP) versus fluorescência 4 (anti-CD21 APC).

(C) representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 3 (anti-CD19 PerCP) versus fluorescência 2 (anti-CD1d PE), a partir da população duplo positiva do gráfico anterior.

(D) representa a análise da citocina IL-10 a partir da população CD19⁺CD21⁺. A mesma análise foi realizada para a citocina TGF- β .

4.7 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados, primeiramente foi utilizado o software Minitab, versão 10.1 (E.U.A) com o intuito de verificar se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos a partir da avaliação de três hipóteses, que são independência, variância e normalidade. Em seguida, a análise estatística referente aos dados não-paramétricos foi realizada a partir do teste Kruskal Wallis seguido de Dunns, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos estudados, e do teste de Wilcoxon, para análises pareadas, verificando diferenças entre contexto *ex vivo* e culturas estimuladas com TRIPO, ou entre culturas estimuladas ou não com TRIPO. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$ e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prim 5.0 (San Diego, CA).

5.1 Determinação do percentual de células B convencionais no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

As células B são subdivididas em duas grandes linhagens: células B1 e células B2. As células B1 estão presentes em maior quantidade nas mucosas e nas cavidades peritoneais; já as células B2 ocupam, em sua maioria, os órgãos linfóides secundários. As células B1 podem, ainda, ser subdivididas em células B1a (CD11⁺CD5⁺) e células B1b (CD11⁺CD5⁻), e, juntamente com as células B2, são capazes de responder rapidamente a estímulos antigênicos (Tung *et al.*, 2006; Tung & Herzenberg, 2007; Lund, 2008). Outro marcador utilizado para a identificação dos linfócitos B é o CD19. A expressão da molécula CD19 é restrita aos linfócitos B e aumenta gradualmente durante o desenvolvimento dessa linhagem celular, mas não é afetada pelo estado de ativação da célula (Fujimoto & Sato, 2007).

A avaliação do percentual de linfócitos CD19⁺ revelou um aumento significativo dessa população nos pacientes com a forma clínica IND em relação aos indivíduos NI, no contexto *ex vivo* e após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 3).

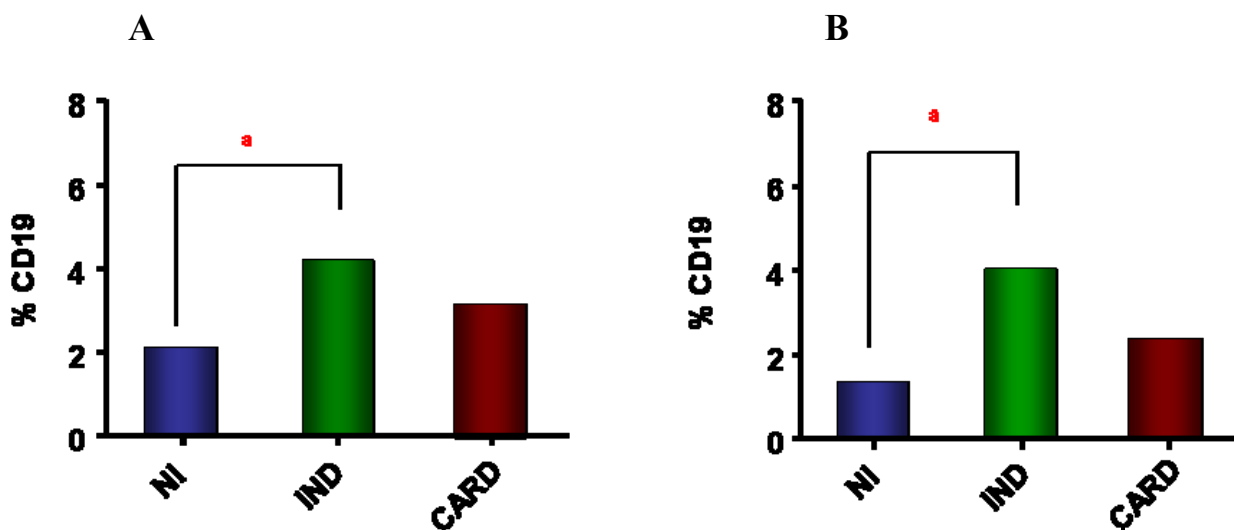


Figura 3: Análise da expressão de CD19 por linfócitos B convencionais do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD19. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺ entre os grupos NI e IND.

5.2 Caracterização das células B reguladoras no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

Atualmente, ainda não existem relatos sobre o papel ou mesmo a presença de células B reguladoras em pacientes portadores da doença de Chagas. Logo, devido a sua importância no controle da resposta imune, torna-se necessária a investigação do provável papel destas células na resposta imune de pacientes do grupo IND e CARD. Apesar de existirem relatos sobre alguns marcadores para Bregs em camundongos, não há uma definição clara de uma combinação específica de marcadores para determinar a população das células B reguladoras humana.

Uma das subpopulações de células B reguladoras apresenta a expressão das moléculas CD1d e CD21 (Mizoguchi *et al.*, 2002; Sonoda & Stein-Streilein, 2002; Dalwadi *et al.*, 2003; Brummel & Lenert, 2005; Wei *et al.*, 2005). Nossa estratégia de análise foi avaliar a expressão dessas moléculas separadamente e em conjunto na superfície de linfócitos B CD19⁺.

A expressão da molécula CD1d em linfócitos B do sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica IND ou CARD e indivíduos NI, no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO está representada na figura 4. A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células B CD19⁺CD1d⁺ nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI, tanto no contexto *ex vivo*, como na presença de antígenos de TRIPO (Figura 4).

Quanto a análise da expressão da molécula CD21 na superfície de linfócitos B CD19⁺, observou-se um aumento significativo no percentual de linfócitos B CD19⁺CD21⁺ de pacientes com a forma clínica IND em relação aos indivíduos NI, no contexto *ex vivo*, bem como após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 5).

A análise dos dados mostrou, também, um aumento significativo no percentual de células CD19⁺ co-expressando CD21 e CD1d nos pacientes IND em relação ao grupo NI, no contexto *ex vivo* e após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 6).

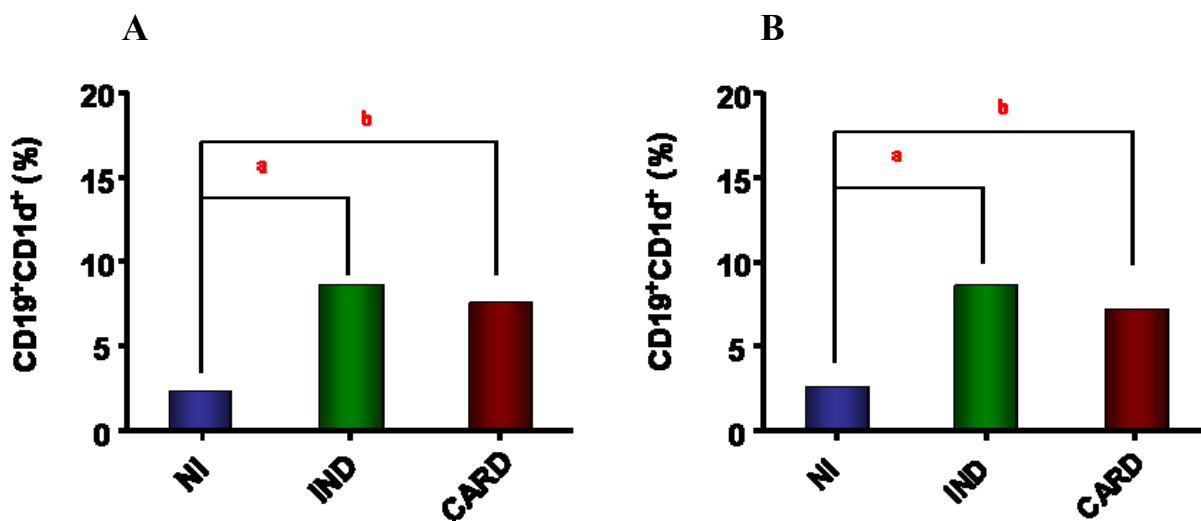


Figura 4: Análise da expressão de CD1d por linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD1d. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD1d⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD1d⁺ entre os grupos NI e CARD.

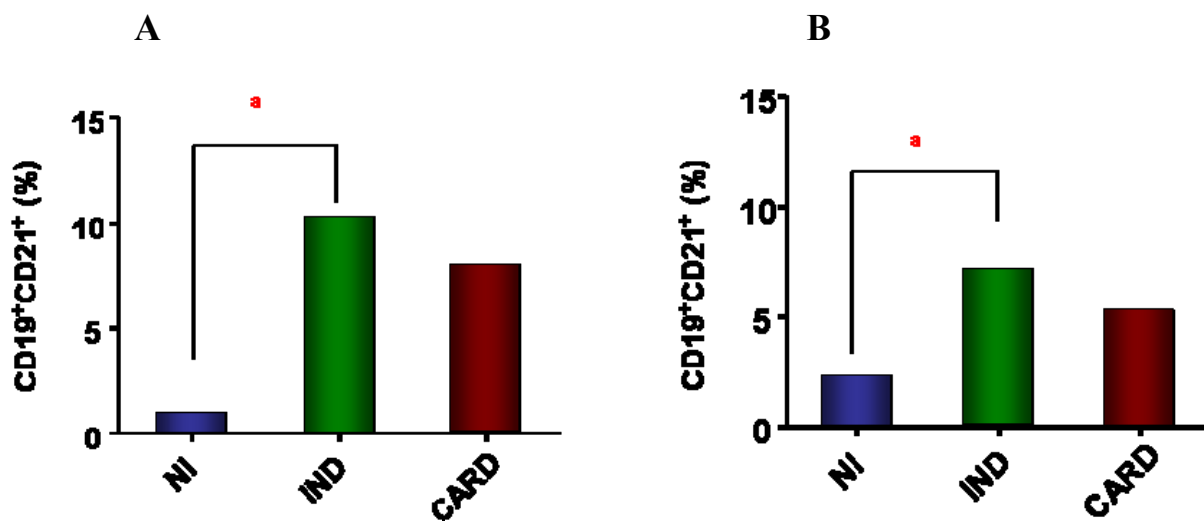


Figura 5: Análise da expressão de CD21 por linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células negativas para o marcador CD21. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD21⁺ entre os grupos NI e IND.

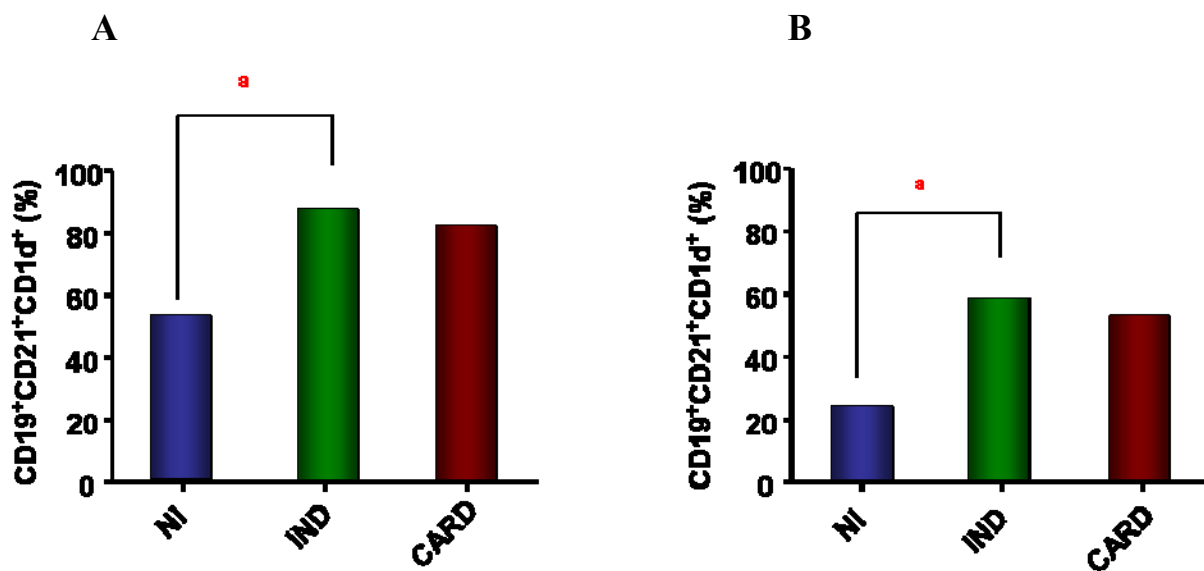


Figura 6: Análise da expressão de CD21 e CD1d por linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD21 e CD1d. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD21⁺CD1d⁺ entre os grupos NI e IND.

Outra subpopulação de linfócitos B reguladores já descrita na literatura é CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ (Hernandez *et al.*, 1997; Fillatreau *et al.*, 2002; Dalwadi *et al.*, 2003; Mauri *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2007). Seguindo a mesma estratégia anterior, primeiramente avaliamos o percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻ e, posteriormente, avaliamos a expressão de CD1d por essa população.

A análise dos resultados revelou um aumento significativo no percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻ nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI, tanto no contexto *ex vivo*, como após estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO (Figura 7).

Os dados mostraram, também, que o percentual da subpopulação de linfócitos B reguladores CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ foi significativamente maior no grupo NI em relação aos pacientes IND e CARD, no contexto *ex vivo*. Por outro lado, após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, o percentual da subpopulação de linfócitos B reguladores CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ foi significativamente maior nos pacientes IND e CARD quando comparados ao grupo NI (Figura 8).

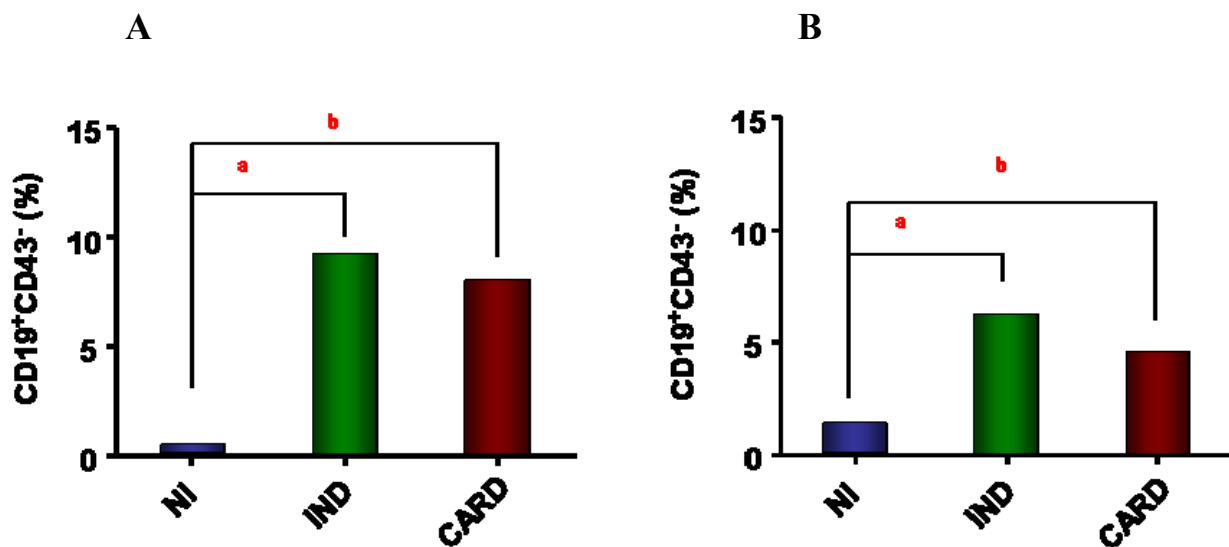


Figura 7: Análise do percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células B CD19⁺CD43⁻. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻ entre os grupos NI e CARD.

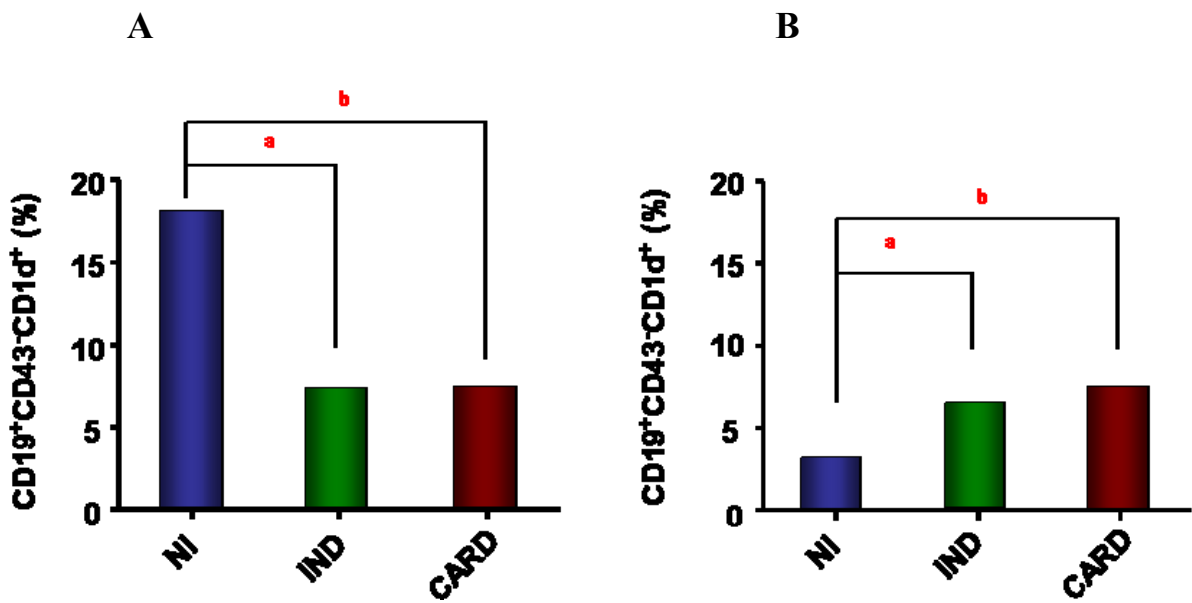


Figura 8: Análise do percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas B CD19⁺CD43⁻CD1d⁺. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ entre os grupos NI e CARD.

5.3 Avaliação da expressão de citocinas intracitoplasmáticas por subpopulações de linfócitos B reguladores no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência à infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas.

As citocinas imunorreguladoras, IL-10 e TGF- β , foram avaliadas nas subpopulações de células B reguladoras, CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻, na presença e ausência de estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO. A análise dos dados mostrou um aumento na expressão intracitoplasmática de IL-10 pela subpopulação CD19⁺CD21⁺ no grupo CARD quando comparado ao grupo NI, na presença e ausência de estimulação antigênica (Figura 9).

Quanto à análise da expressão intracitoplasmática de TGF- β pela subpopulação CD19⁺CD21⁺, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos estudados, na ausência de estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO. Entretanto, na presença de estímulo, houve uma redução na expressão intracitoplasmática de TGF- β por essa mesma população celular no grupo IND em relação ao grupo NI (Figura 10).

Avaliando as mesmas citocinas, agora na subpopulação CD19⁺CD43⁻, não houve diferença significativa na expressão intracitoplasmática de IL-10 entre os grupos estudados, na ausência de estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO. Por outro lado, foi observado um aumento na expressão intracitoplasmática de IL-10 pela subpopulação CD19⁺CD43⁻ no grupo CARD quando comparado ao grupo IND, na presença de estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO.

A expressão intracitoplasmática de TGF- β pela subpopulação CD19⁺CD43⁻ está representada na Figura 12. A análise dos dados mostrou uma redução na expressão intracitoplasmática de TGF- β nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI, na ausência e na presença de estimulação com TRIPO (Figura 12).

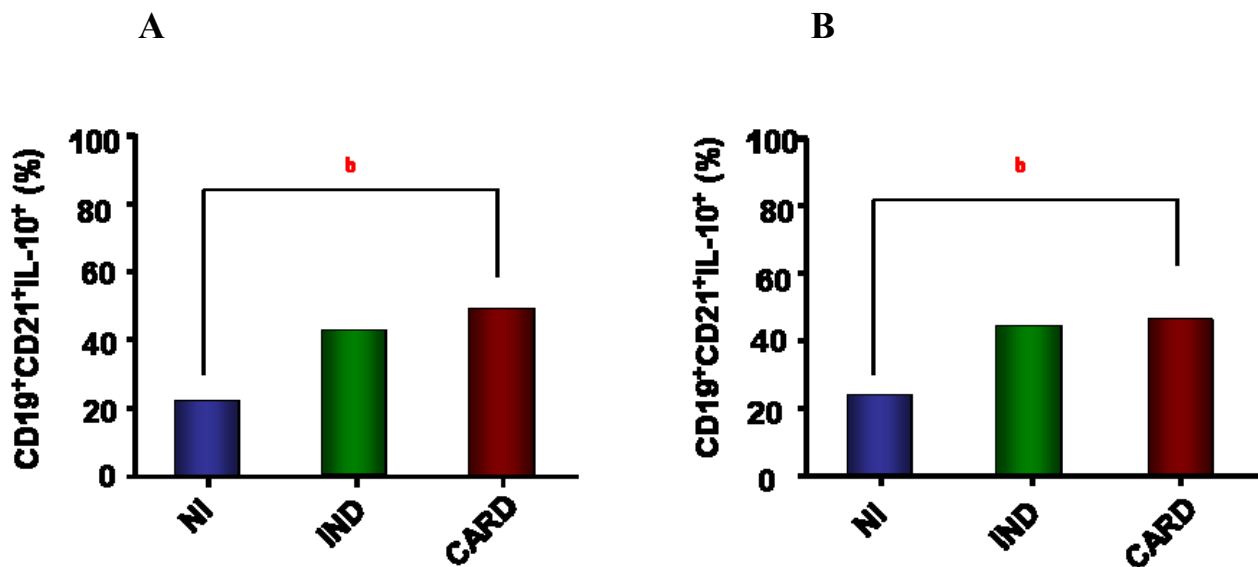


Figura 9: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática IL-10 por linfócitos B CD19⁺CD21⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados na ausência (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD19, CD21 e para a citocina IL-10. A letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD21⁺IL-10⁺ entre os grupos NI e CARD.

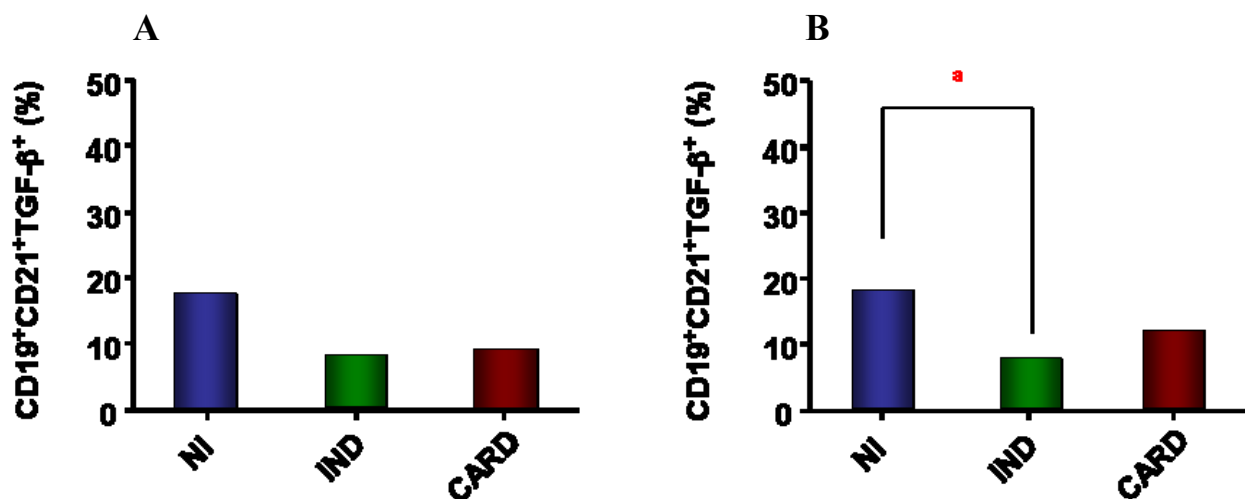


Figura 10: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática TGF- β por linfócitos B CD19⁺CD21⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados na ausência (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD19 e CD21 e para a citocina TGF- β . A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD21⁺TGF- β ⁺ entre os grupos NI e IND.

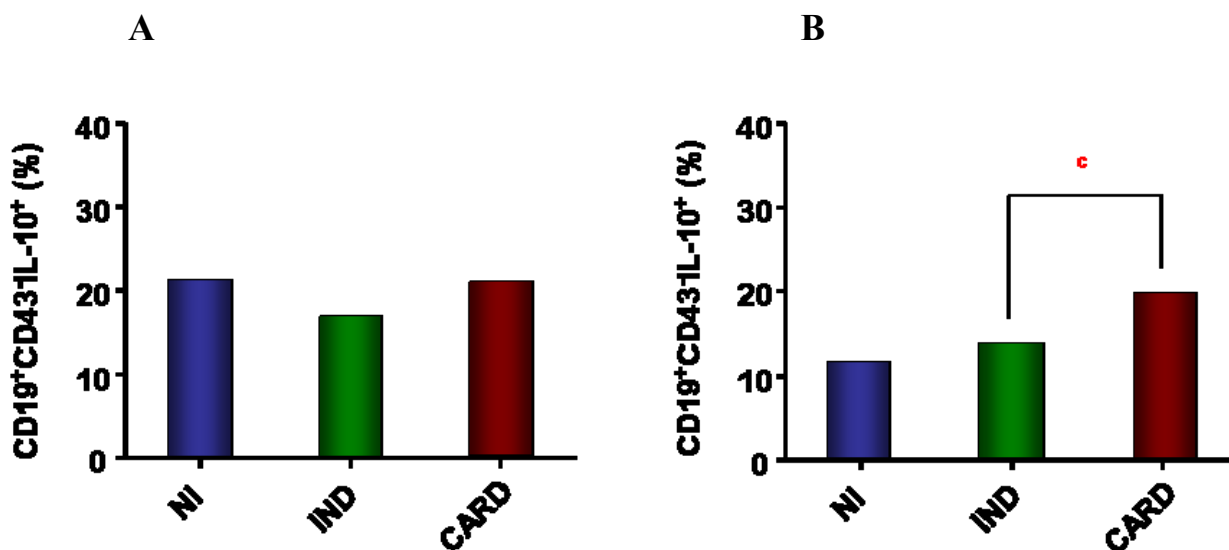


Figura 11: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática IL-10 por linfócitos B CD19⁺CD43⁻ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados na ausência (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻IL-10⁺. A letra c representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻IL-10⁺ entre os grupos IND e CARD.

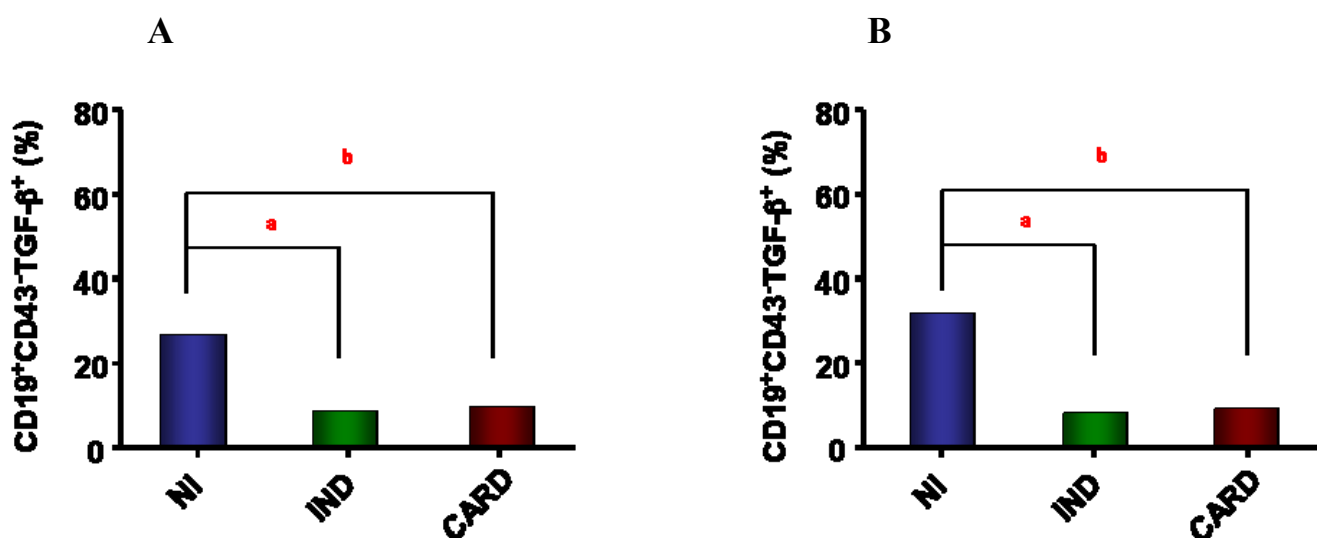


Figura 12: Análise da expressão da citocina intracitoplasmática TGF-β por linfócitos B CD19⁺CD43⁻ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados na ausência (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de linfócitos B CD19⁺CD43⁻TGF-β⁺. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻TGF-β⁺ entre os grupos NI e IND e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD43⁻TGF-β⁺ entre os grupos NI e CARD.

5.4 Análise da expressão de moléculas de ativação na superfície de linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

As moléculas de superfície CD80 e CD86 fazem parte da família de imunoglobulinas e são expressas em muitos tipos de células, incluindo células T, macrófagos e células dendríticas. Hoje, já se tem o conhecimento que células B virgens expressam baixos níveis de CD86, enquanto a expressão de CD80 nessas células é mínima ou até mesmo nula. O aumento da expressão de CD86 em células B ocorre a partir do estímulo por BCR. Por outro lado, a expressão de CD80 é desencadeada por uma variedade de estímulos, tais como, lipopolissacarídeos (LPS), CD40-ligante e uma variedade de citocinas (Sahoo *et al.*, 2002; Vasu *et al.*, 2003).

A expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície dos linfócitos B de indivíduos NI e de pacientes IND e CARD, no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos de TRIPO, está representada nas figuras 13 e 14, respectivamente. A análise dos dados mostrou um aumento significativo da expressão da molécula CD80 por linfócitos B CD19⁺ de pacientes com as formas clínicas IND e CARD quando comparados aos indivíduos NI, no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (Figura 13).

Quanto à análise da expressão de CD86, observou-se um aumento significativo no percentual de linfócitos B CD19⁺CD86⁺ dos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI, tanto no contexto *ex vivo*, como após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (Figura 14).

Foi realizada, também, a análise da expressão conjunta de CD80 e CD86 na superfície de linfócitos B CD19⁺. A análise dos dados revelou que o percentual de linfócitos B CD19⁺CD80⁺CD86⁺, no contexto *ex vivo*, não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Todavia, o percentual de linfócitos B CD19⁺CD80⁺CD86⁺, após estímulo com TRIPO, foi significativamente maior nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI (Figura 15).

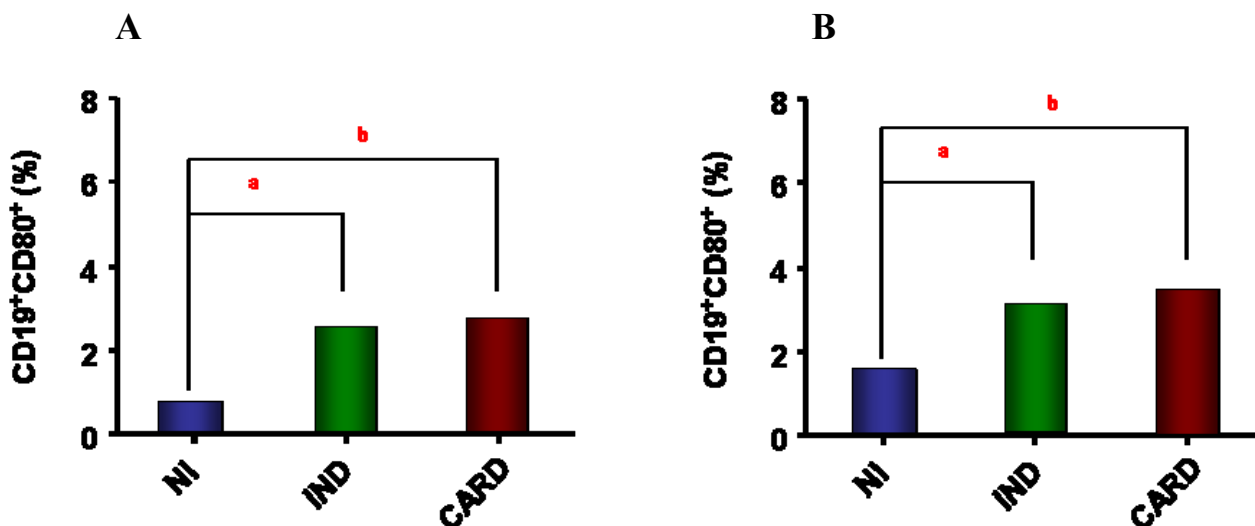


Figura 13: Análise da expressão de CD80 na superfície de linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico. Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD19 e CD80. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD80⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD80⁺ entre os grupos NI e CARD.

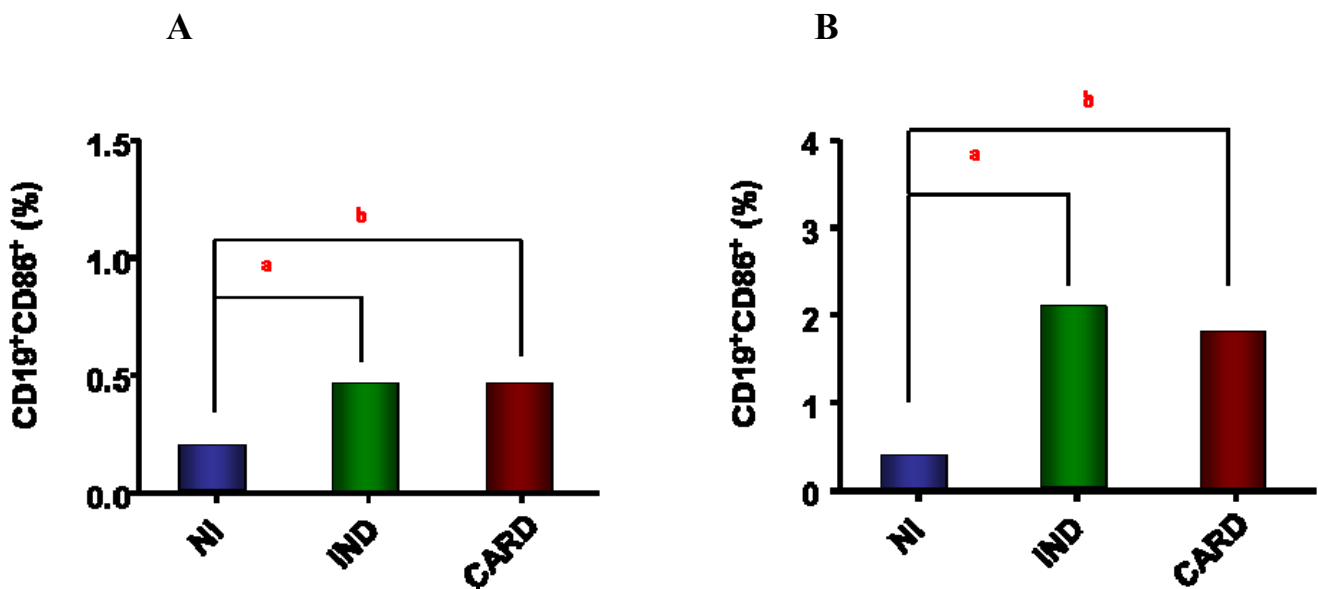


Figura 14: Análise da expressão de CD86 na superfície de linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico. Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD19 e CD86. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD86⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD86⁺ entre os grupos NI e CARD.

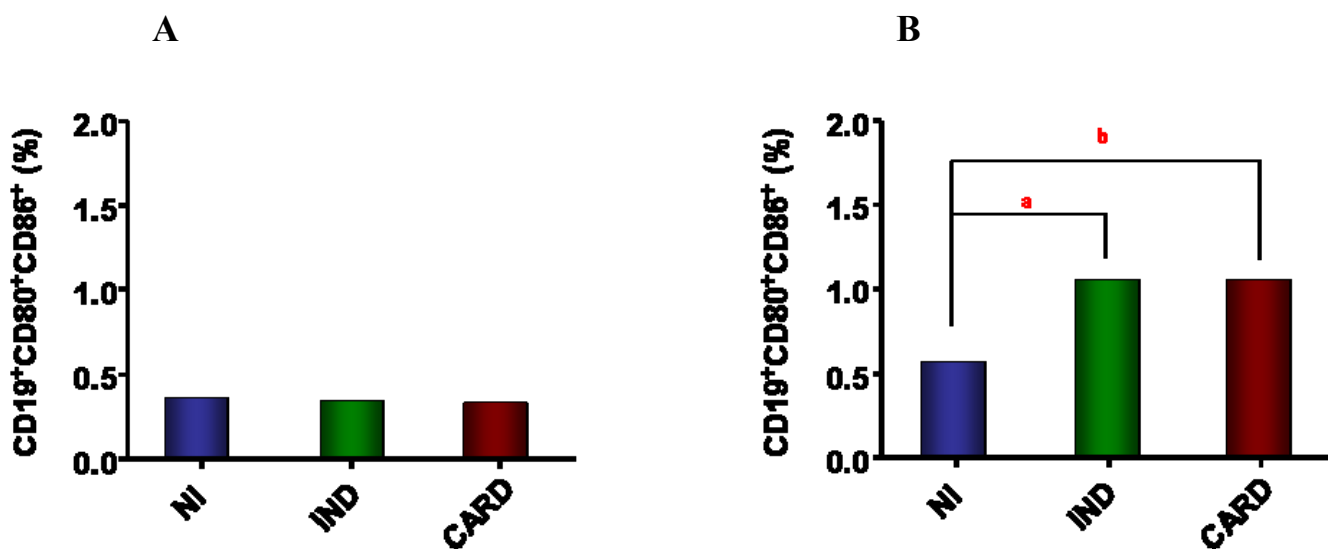


Figura 15: Análise da co-expressão de CD80 e CD86 na superfície de linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para os marcadores CD19, CD80 e CD86. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD80⁺CD86⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺CD80⁺CD86⁺ entre os grupos NI e CARD.

5.5 Avaliação da expressão de marcadores de apoptose intracelulares em linfócitos B no sangue periférico de indivíduos não infectados e de pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

A apoptose é um processo ordenado de morte celular, iniciado por sinais pró-apoptóticos, que culminam na clivagem de uma série de proteínas, promovendo ativação de algumas e desativação de outras (Krammer *et al.*, 2007). Dentre as moléculas envolvidas na iniciação da apoptose, as principais a serem destacadas são as granzimas e as caspases.

As granzimas são enzimas que compreendem cerca de 90% dos grânulos citolíticos. A principal função dessas enzimas é induzir a morte de células-alvo prejudiciais à homeostase do organismo. Dentre todas as granzimas, a granzima B é a que possui uma atividade apoptótica mais eficiente, tendo habilidades semelhantes às caspases. A granzima B pode clivar diretamente, e assim ativar, várias pro-caspases, podendo também clivar substratos das caspases e, conseqüentemente, iniciar vias apoptóticas (Trapani, 2001).

A análise dos dados não mostrou nenhuma diferença significativa na expressão da molécula Granzima B em linfócitos BCD19⁺ entre os grupos estudados, no contexto *ex vivo*. Por outro lado, a análise dos dados mostrou um aumento significativo na expressão da molécula Granzima B por linfócitos B CD19⁺ nos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI, após estimulação *in vitro* com TRIPO (Figura 16).

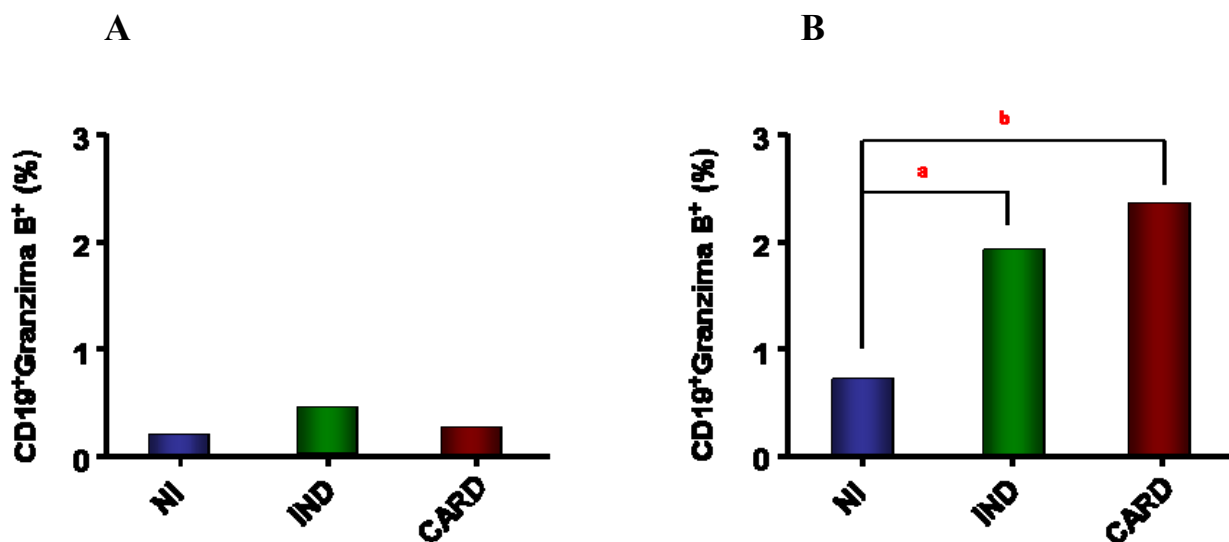


Figura 16: Análise da expressão da molécula Granzima B por linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD19 e para a molécula Granzima B. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺Granzima B⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺Granzima B⁺ entre os grupos NI e CARD.

As enzimas caspases pertencem à família de proteases cisteínas e são consideradas sensores centrais e executores da apoptose celular. A caspase 3, uma das caspases, está implicada diretamente nos mecanismos denominados executores de apoptose, sendo conhecida como protease efetora dos processos apoptóticos (Krammer *et al.*, 2007).

A análise dos dados não mostrou nenhuma diferença significativa na expressão da molécula Caspase 3 em linfócitos BCD19⁺ entre os grupos estudados, no contexto *ex vivo*. No entanto, a análise dos dados mostrou um aumento significativo na expressão da molécula Caspase 3 por linfócitos B CD19⁺ de pacientes IND e CARD em relação aos indivíduos NI, após estimulação *in vitro* com TRIPO (Figura 17).

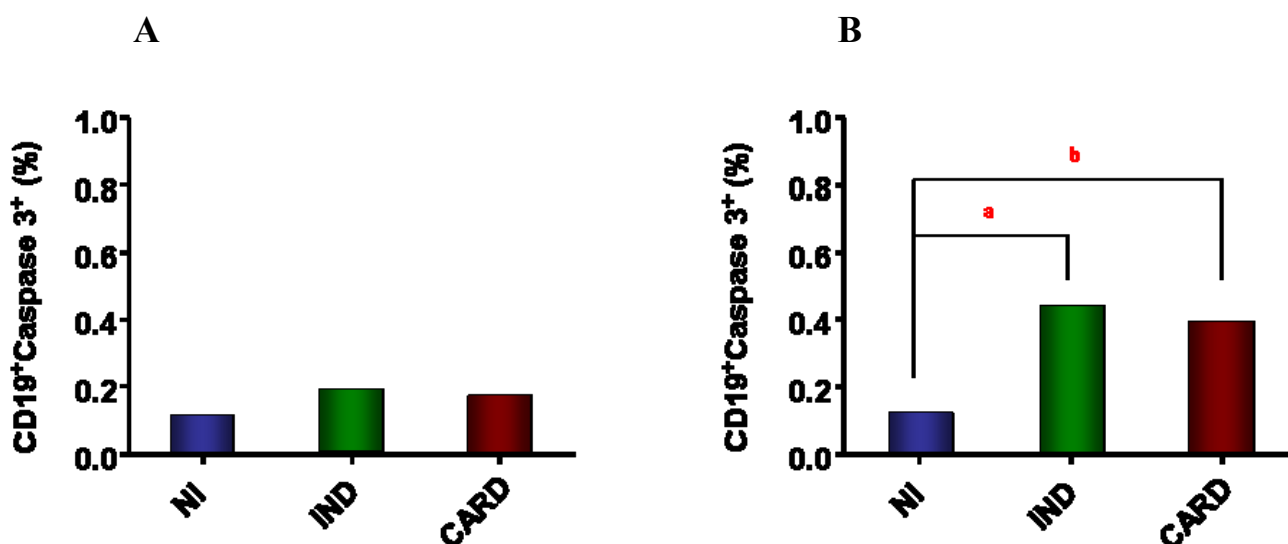


Figura 17: Análise da expressão da Caspase 3 por linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI (■), IND (■) e CARD (■) foram avaliados no contexto *ex vivo* (A) e após estimulação *in vitro* por TRIPO (B), como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD19 e para a molécula Caspase 3. A letra a representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺Caspase 3⁺ entre os grupos NI e IND, e a letra b representa diferença significativa no percentual de células B CD19⁺ Caspase 3⁺ entre os grupos NI e CARD.

Sobreviver a uma infecção requer no hospedeiro a geração de uma resposta imune controlada, que reconhece e elimina o patógeno invasor enquanto limita o dano colateral dos próprios tecidos, que pode resultar de uma resposta imune exagerada. A imunorregulação pode aparecer como resultado de um processo de resposta do hospedeiro à infecção para manter ou restaurar um ambiente homeostático e/ou pode ser ativamente induzida pelo patógeno para garantir sua sobrevivência (Belkaid, 2007; Dutra *et al.*, 2009; Sathler-Avelar *et al.*, 2009; Scharfstein *et al.*, 2009).

A infecção do hospedeiro pelo *Trypanosoma cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos que levam ao reconhecimento do parasito e ao desenvolvimento da resposta imune inata e específica. A lesão tecidual induzida pelo parasito tem continuidade ao longo do desenvolvimento da resposta imune que também aciona os mecanismos imunorreguladores. Esse quadro pode levar à persistência do patógeno e à destruição dos tecidos do organismo. No entanto, as evidências em modelo experimental e no homem mostram que os mecanismos são ainda pouco definidos apresentando inclusive controvérsias quanto à natureza dos mecanismos de agressão tecidual.

A geração de respostas protetoras ou patogênicas na doença de Chagas humana é altamente influenciada por uma resposta imune complexa gerada durante a infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, a resposta imune inicial durante a infecção humana pelo *T. cruzi* não é completamente entendida. Estudos demonstram que o *T. cruzi* induz uma forte ativação do sistema imune durante a infecção aguda e que os diferentes mecanismos imunes induzidos durante os estágios iniciais da fase crônica da infecção representam componentes essenciais da atividade imune presente na fase crônica tardia (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005).

Na fase crônica, a resposta imune montada contra *T. cruzi* pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas por células da imunidade inata (Gomes *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2005). Entretanto, recentes evidências indicam que a imunidade adaptativa também pode auxiliar no controle da patogênese induzida pelo parasito através da geração de células T reguladoras (Menezes *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007).

Embora inúmeros trabalhos em modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1992; Rottenberg *et al.*, 1993; Brener & Gazzinelli, 1997; Soares & Ribeiro dos Santos, 1999), estes parâmetros não se encontram totalmente esclarecidos na infecção humana.

Com o objetivo de compreender os mecanismos imunorreguladores existentes no controle da miocardiopatia na doença de Chagas, em nosso trabalho avaliamos as características fenotípicas de células B, descritas como reguladoras, presentes no sangue periférico de pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas, no contexto *ex vivo* e após estímulo específico por antígenos derivados do *T. cruzi*.

As células B desempenham papéis centrais no estabelecimento e manutenção da imunidade protetora, incluindo a geração de anticorpos protetores, apresentação de antígenos, e mais recentemente, funções reguladoras (Cancro *et al.*, 2009).

Durante a infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* observa-se uma ativação policlonal de células B com uma produção inespecífica de imunoglobulinas (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980; Minoprio *et al.*, 1988a, 1988b, 2001). Verifica-se ainda nessa fase que linfócitos B CD5⁺ seriam responsáveis pela secreção de anticorpos auto-reativos e que poderiam estar envolvidos com a progressão da doença (Minoprio *et al.*, 1991; El Cheikh *et al.*, 1992). Já na fase crônica, níveis elevados de linfócitos B CD5⁺ foram observados em pacientes com miocardiopatia chagásica (Dutra *et al.*, 2000), sugerindo uma relação entre este fenótipo celular e o desenvolvimento de autoimunidade na doença de Chagas (Dutra *et al.*, 1994). É importante salientar que esta população de linfócitos é capaz de produzir auto-anticorpos relacionados a alguns processos auto-imunes no homem (Hardy & Hayakawa, 1986; Becker *et al.*, 1990; Hardy *et al.*, 1994).

Por outro lado, os linfócitos B convencionais, através da produção de anticorpos, são também importantes para controlar a parasitemia durante a fase aguda da infecção, uma vez que a depleção dessa população celular leva ao aumento da parasitemia e mortalidade dos animais (Rodrigues *et al.*, 1981). Além disso, o *T. cruzi* é capaz de induzir a apoptose de linfócitos B, via Fas e Fas-L, o que limitaria a resposta imune do hospedeiro favorecendo o crescimento do parasito e o desenvolvimento da imunopatologia (Zuniga *et al.*, 2000, 2002, 2005).

Durante a fase crônica da doença de Chagas humana, observa-se um percentual elevado de linfócitos B convencionais CD19⁺ no sangue periférico de pacientes que apresentam as formas clínicas IND e CARD (Dutra *et al.*, 1994; Piedras *et al.*, 1997; Sathler-Avelar *et al.*, 2003). Nossos dados corroboram com esses resultados, onde observamos um percentual elevado de linfócitos B convencionais CD19⁺ no sangue periférico dos pacientes dos grupos IND e CARD no contexto *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 3).

Além do papel das células B convencionais, existem subclasses distintas de células B capazes de controlar as respostas imunes ou melhorar a recuperação de inflamações através de

mecanismos que incluem a produção de IL-10 e TGF- β , apresentação secundária de antígenos e interação com outras células imunes diretamente ou através de anticorpos secretados (Mizoguchi & Bhan, 2006).

No modelo experimental têm sido descritas várias subpopulações de células B reguladoras, porém, a participação dessas células no homem ainda não está bem estabelecida (Mizoguchi *et al.*, 2002; Sonoda & Stein-Streilein, 2002; Dalwadi *et al.*, 2003; Brummel & Lenert, 2005; Wei *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007). Esses estudos mostraram que vários marcadores são capazes de identificar as Bregs, entretanto os mecanismos pelos quais elas exercem suas funções supressoras ainda não foram definidos. Com base nos perfis fenotípicos descritos para camundongos avaliamos algumas moléculas presentes na superfície de células B que poderiam estar associadas com sua função reguladora na doença de Chagas.

A avaliação fenotípica das Bregs foi feita utilizando alguns marcadores de superfície (CD19, CD21, CD43, CD1d). Esta análise é importante para a identificação mais precisa desta subpopulação celular, porém, se todos esses marcadores são simultaneamente expressos em uma mesma população de Bregs ainda é necessário determinar.

Uma das subpopulações de células B reguladoras descritas refere-se a células B que apresentam alta expressão da molécula CD1d (Mizoguchi *et al.*, 2002). Nesse estudo observou-se que células B CD1d^{high} são capazes de controlar as respostas inflamatórias no tecido intestinal, provavelmente através da produção de IL-10, uma vez que a parte intracitoplasmática da molécula CD1d está ligada à cascata de sinalização associada com a transcrição de IL-10 (Colgan *et al.*, 1999). É interessante destacar que o aumento da expressão de CD1d está associada com uma intensa produção de IL-10 (Lemoine *et al.*, 2009). Entretanto, a investigação de células BCD19⁺CD1d^{high}IL-10⁺ não foi possível nesse primeiro momento, devido a limitações técnicas, pois os anticorpos utilizados para marcação de CD1d e IL-10 apresentavam o mesmo fluorocromo.

A molécula CD1d é uma glicoproteína de superfície celular capaz de se ligar e apresentar certos glicolipídeos antigênicos para subpopulações distintas de linfócitos T. Esses glicolipídeos apresentados pelo CD1d rapidamente ativam células NKT (Mizoguchi *et al.*, 2002). Dentro desse contexto, foi também demonstrado que as células Bregs regulariam negativamente o processo inflamatório favorecendo a geração de células NKT (Mauri & Ehrenstein, 2007; Bouaziz *et al.*, 2008).

As células NKT têm sido descritas como outra célula relevante na regulação da resposta imunológica, através da interação com células acessórias ou através de citocinas anti-inflamatórias, limitando, assim, a patologia induzida por infecções (Godfrey & Hammond, 2000; Kronenberg & Gapin, 2002; Hammond & Kronenberg, 2003; Matsuda *et al.*, 2003;

Taniguchi *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2003; Godfrey & Kronenberg, 2004; Van der Vliet *et al.*, 2004; Dutchie *et al.*, 2005). Na doença de Chagas, foi demonstrado que pacientes com a forma clínica IND apresentam percentual elevado de células NKT associado com um aumento de células NK citotóxicas, sugerindo que as células NKT seriam capazes de controlar os efeitos citotóxicos deletérios induzidos por células efectoras de pacientes IND (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostraram que pacientes na fase crônica da doença de Chagas apresentam um maior percentual de células B expressando a molécula CD1d (Figura 4), indicando um possível papel dessa subpopulação na infecção pelo *T. cruzi*. Se as células Bregs CD1d^{high} aumentadas nos pacientes com doença de Chagas teriam papel na ativação de células NKT, estudos ainda devem ser realizados.

Além do CD1d, um outro marcador bem descrito para as células B reguladoras é o CD21, um receptor para complemento, mais especificamente para fragmentos de C3. A molécula CD19 forma um complexo com o CD21, e após ligação ao CD21, inicia-se a transdução de sinal, a partir do CD19, para ativação celular (Fujimoto & Sato, 2007). Nossos dados mostraram uma maior expressão da molécula CD21 na superfície de linfócitos B de pacientes IND, tanto *ex vivo* como na presença de estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Figura 5). Da mesma forma, a co-expressão de CD21 e CD1d foi maior no grupo IND (Figura 6). Com base na informação de que células Bregs co-expressam essas duas moléculas, e que pacientes chagásicos com a forma clínica IND apresentam percentual elevado de células BCD19⁺CD21⁺CD1d⁺, esses resultados sugerem que essas células podem estar envolvidas no controle da morbidade da doença de Chagas.

Outra subpopulação de célula Breg é caracterizada pela ausência da molécula CD43 e sua ação envolve a inibição de respostas do tipo Th1 através da produção de IL-10 (Dalwadi *et al.*, 2003; Evan *et al.*, 2007). A avaliação dessa subpopulação de Bregs CD19⁺CD43⁻CD1d⁺ demonstrou que pacientes portadores da doença de Chagas apresentam níveis elevados dessas células (Figura 8).

Vários trabalhos sugerem que as células Bregs exercem seu papel supressor através da produção de IL-10 (Mann *et al.*, 2007; Mauri & Ehrenstein, 2007; Bouaziz *et al.*, 2008; Majlessi *et al.*, 2008; Lemoine *et al.*, 2009; Yanaba *et al.*, 2009). Nossos dados mostraram que as subpopulações de linfócitos Bregs (CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻) são capazes de expressar IL-10 e essa expressão foi significativamente mais acentuada nos pacientes do grupo CARD (Figuras 9 e 11). É importante destacar que Sathler-Avelar *et al.* (2006) descreveram uma produção de IL-10 por linfócitos B de pacientes portadores da fase crônica

da doença de Chagas. Portanto, é possível que células Bregs possam estar envolvidas no controle da morbidade ou até mesmo potencializar o processo inflamatório.

Dentro desse contexto, foi observado que células Bregs produtoras de IL-10 são capazes de regular as funções de células T (Bouaziz *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos mostram que essas mesmas células Bregs poderiam regular o papel de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ via IL-10 e B7 (Mann *et al.*, 2007). Considerando o percentual elevado de células B reguladoras (CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻) expressando IL-10 nos pacientes CARD, é possível especular que as células Bregs poderiam controlar o percentual de células Tregs, já que nesses pacientes observa-se menor percentual de células Tregs (Araújo *et al.*, 2007; Vitelli-Avelar *et al.*, 2005).

Adicionalmente, Araújo (2009) mostrou que pacientes CARD apresentavam percentual elevado de células T CD4⁺CD25⁺Granzima B⁺, sugerindo que a expressão da molécula Granzima B poderia ser uma forma de autotoxicidade, ou ainda um mecanismo de regulação das respostas imunes, levando a apoptose de células efectoras, o que consequentemente, ocasionaria um desequilíbrio da resposta imune e possível dano tecidual nesses pacientes, favorecendo o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica.

A falta de uma resposta adequada das células reguladoras nos pacientes CARD associada a outros mecanismos reguladores descontrolados podem esclarecer a exacerbação da resposta imune e forte resposta de células T citotóxicas CD8⁺ observada nesses pacientes. Além disso, alguns estudos sugerem a predominância de uma função inflamatória em pacientes CARD, o que pode estar associado ao estabelecimento de uma resposta imune não regulada, favorecendo o desenvolvimento da patologia (Menezes *et al.*, 2004; Dutra *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de regulação das células Bregs pode ser através da citocina TGF-β, uma vez que estudos mostram que essa citocina estaria envolvida com a indução de apoptose de células T efectoras, como também na indução de células T reguladoras (Mauri & Ehrestein, 2007). Nossos resultados mostraram que pacientes chagásicos apresentam percentual diminuído de células B reguladoras (CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻) expressando TGF-β (Figuras 10 e 12), sugerindo que esse mecanismo pode não estar envolvido no controle da resposta imune induzida pelo *T. cruzi*.

Esses achados enfatizam que o balanço de citocinas representa um elemento chave no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Assim, avaliar a produção de diferentes citocinas com características inflamatórias e reguladoras produzidas por subpopulações de células B reguladoras representa uma estratégia adequada

para caracterização do perfil imunológico de indivíduos portadores das diferentes formas clínicas da doença.

Células B fornecem co-estimulação para células T através das moléculas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86). Além disso, linfócitos B podem regular células T reguladoras via CD80 e CD86, uma vez que células B isoladas de camundongos deficientes em B7 são incapazes de induzir sinais cognitivos para ativação de linfócitos T, bem como de apresentar células T reguladoras (Mann *et al.*, 2007). De fato, nossos resultados mostraram, após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi*, um aumento do percentual de células B CD19⁺ expressando e/ou co-expressando as moléculas CD80 e CD86 (Figuras 13, 14 e 15). Entretanto, se essas moléculas estão envolvidas na ação ou na geração de células T reguladoras, via células Bregs, ainda não foi possível identificar nesse trabalho.

Na tentativa de estudar outros mecanismos possíveis de regulação das células Bregs, avaliamos a expressão de marcadores de apoptose (Granzima B e Caspase 3), uma vez que esses marcadores têm sido descritos como importantes moléculas indutoras de apoptose de células Th1 (Appay *et al.*, 2002; Van Leeuwen *et al.*, 2004; Mauri & Ehrestein, 2007; Bouaziz *et al.*, 2008). Apesar de não ter sido possível avaliar a expressão de caspase 3 e granzima B nas subpopulações CD19⁺CD21⁺ e CD19⁺CD43⁻, observamos em nossos resultados que células B de pacientes portadores da doença de Chagas apresentam percentual elevado de granzima B e caspase 3 ativa (Figuras 16 e 17), sugerindo que esse poderia ser um possível mecanismo regulador das respostas imunes induzidas pelo *T. cruzi*. Estudos funcionais são necessários para validar nossa hipótese.

7 CONCLUSÃO

Os resultados adquiridos com o desenvolvimento deste trabalho trouxeram um melhor entendimento sobre o perfil fenotípico das células B reguladoras, avaliado por marcadores de superfície e moléculas intracelulares, bem como sua presença no sangue periférico de pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas. Além disso, esse trabalho originou pela primeira vez na literatura, dados relacionados às células B reguladoras na doença de Chagas.

Assim como toda resposta imunológica, as células B reguladoras não agem isoladamente, mas participam como mais um fator importante para os mecanismos de imunorregulação. Entretanto, apenas a caracterização fenotípica destas células não permitiu a identificação do papel das células Bregs na patogênese da doença de Chagas.

Esses achados reforçam que a resposta imune contra o *T. cruzi* pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro. Entretanto, são necessários estudos adicionais para melhor compreender a atividade funcional das células B reguladoras durante a infecção por *T. cruzi* e sua participação na progressão da doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH & Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. New York: W.B. Saunders Company; 2000.

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. J. autoimmun. 2001; 17:99-107.

Abrahamsohn IA & Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. J. immunol. 1995; 155:3955-3963.

Abrahamsohn IA & Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp. parasitol. 1996; 84: 231-244.

Acosta AM & Santos-Buch CA. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. Circulation. 1985; 71:1255-1261.

Al-Sabbagh A, Garcia CA, Diaz-Bardales BM, Zaccarias C, Sakurada JK & Santos LM. Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. Exp. parasitol. 1998; 89:304-311.

Andrade ZA. Patologia da Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 201 – 230. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P & Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am. j. trop. med. hyg. 1999; 60:726-735.

Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, et al. Characterization of CD4⁺CTLs ex vivo. J. immunol. 2002; 168:5954-5958.

Araujo FF, Gomes JAS, Rocha MOC, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJF, et al. Potential role of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Front. biosci. 2007; 12:2797-2806.

Araújo FF. Avaliação do papel das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Belo Horizonte: s.n., 2009. 133 p. Tese(Doutorado em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_12.pdf Acesso: 01 dez. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/index.html>

Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I, Turner PC, Moyer RW, et al. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J. biol. chem.* 1998; 273:21261-21266.

Baecher-Allan C, Brown J A, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. immunol.* 2001; 167:1245-1253.

Barreto MP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p. 89 – 151. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/ph182/index.html>

Barros-Mazon S, Guariento ME, Da Silva CA, Coffman RL, Abrahamssohn IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin. immunol.* 2004; 111(1):137-145.

Barry M, Heiben JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. cell. biol.* 2000; 20:3781-3794.

Becker H, Weber C, Storch S & Federlin K. Relationship between CD5⁺ B lymphocytes and the activity of lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. immunol. immunopathol.* 1990; 56:219-225.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat. rev. immunol.* 2007; 7:875-88.

Bergeron M, Olivier M. Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. J. immunol. 2006; 177(9):6271-80.

Bilate AM & Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2008; 50(2):67-74.

Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. Am. j. dis. child. 1976; 130:97-103.

Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. Immunol. rev. 2008; 224:201-214.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília: MS, 2006. 815 p. ISBN: 85-334-1047-6. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso: 01 dez. 2009 Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener – <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; 82:205-213.

Brener Z & Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. Int. arch. allergy immunol. 1997; 114:103-110.

Brummel R & Lenert P. Activation of marginal zone B cells from lúpus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. J. immunol. 2005; 174:2429-2434.

Cancro MP, Hao Y, Scholz JL, Riley RL, Frasca D, Dunn-Walters DK, Blomberg BB. B cells and aging: molecules and mechanisms. Trends immunol. 2009; 30(7):313-318.

Cardillo F, Voltarelli J, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. Infect. immun. 1996; 64(1):128-134.

Chagas C. Nova espécie mórbida do homem produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*). Nota prévia. Brás Med. 1909; 23:161.

Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT, Blumberg RS. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10. Critical role of cytoplasmic tail in autocrine signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999; 96:13938-13943.

Costa J & Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines – Chagas disease vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104(Suppl. I):46-51.

Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. J. immunol. 2006; 177(5):3193-200.

Coura JR. Chagas disease: What is known and what is needed – a background article. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007; 102(Suppl. I):113-122.

Coura JR & Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104(Suppl.I):31-40.

Cunha-neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin –specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995; 92:3541-3545.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity. 2006; 39(1):41-54.

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo AS, Goldenberg AC et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; 104 (Suppl. I):252-258.

Cury A. Nunca desista de seus sonhos. Rio de Janeiro; Sextante. 2004

Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L et al. B cell development requirement for the G alpha i2 gene. *J. immunol.* 2003; 170:1707-1715.

Darmon AJ, Pinkoski MJ, Bleackley RC. Granule-mediated cytotoxicity. *Results probl. cell differ.* 1999; 23:103-125.

De Titto EH, Braum M, Lazzari JO, Segura EL. Cell mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Immunol. cell biol.* 1983; 9: 249.

Dias JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1989; 22:147-156.

Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 48-74. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41: 193-196.

Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. immunol.* 2004; 172:3422-3427.

Duthie MS, Kahn M, White M, Kapur RP, Kahn SJ. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. immun.* 2005; 73:181-92.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Dias JCP, Brener Z, Freeman GL, Colley DG, Gazzinelli G, Carvalho-Parra JF. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas disease. *Int. immunol.* 1994; 6: 499-506.

Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias, JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic infection. *Scand. j. immunol.* 1997; 45:74-80.

Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand. j. immunol.* 2000; 51:91-97.

Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, Costa GC, Da Silveira ABM, D'avila Reis D, Gollob KJ. Cellular and Genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (Suppl I):208-218.

El Cheikh MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A, Minoprio P. CD5 B cells. Potential role in the (auto)immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992; 651:557-563.

Evans JK, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. immunol.* 2007; 178:7868-7878.

Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderson SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. immunol.* 2002; 3:944-950.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. immunol.* 1991; 146(10):3444-51.

Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand. j. immunol.* 2007; 66(2-3):362-71.

Fujimoto M & Sato S. B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. *J. dermatol. sci.* 2007; 46:1-9.

Gazzinelli RT, Oswald P, Hienv S, James L, Sher A. The microbial activity of IFN-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen

oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *Eur. j. immunol.* 1992; 22: 2501-2506.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. today.* 2000; 21:573–583.

Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. clin. invest.* 2004;114:1379–1388.

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

Gomes JA, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a non-balanced Th1 specific immune response. *Infect. immun.* 2003; 71(3):1185-1193.

Grünig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. exp. med.* 1997; 185:1089-1099.

Guiñazú N, Pellegrini A, Carrera-Silva EA, Aoki MP, Cabanillas AM, Gironés N, Fresno M, Cano R, Gea S. Immunisation with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. *Int. j. parasitol.* 2007; 37(11):1243-54.

Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunol.* 2009; 31(11):673-85.

Hammond KJL, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr. opin. immunol.* 2003; 15:683–9.

Hardy RR & Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B cell and its human homolog Leu-1B. *Immunol. rev.* 1986; 93:53-79.

Hardy RR, Yampolski I, Kovjazin R, Galli M, Novogrodsky A. A monoclonal antibody against a human B lymphoblastoid cell line induces tumor regression in mice. *Cancer res.* 1994; 54:5793-5796.

Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. immunol.* 2000; 1:475-482.

Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting Edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J. exp. med.* 2005; 175:7103-7107.

Hernandez HJ, Wang Y, Stadecker MJ. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *J. immunol.* 1997; 158:4832-7.

Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. pathol.* 1993; 2:101-106.

Higuchi ML, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, 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.* 1997; 56:485-489.

Higuchi ML, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M. Pathophysiology of the heart in chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc. res.* 2003; 60(1): 96-107.

Hoerauf A, Röllinghoff M, Solbach W. Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. *Int. immunol.* 1996; 8(1):1569-1575.

Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, 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.* 1998; 66:1208-1215.

Hontebeyrie-Joskowicz & Minoprio. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Res. immunol.* 1991; 142:141-143.

Huang H, Calderon TM, Berman JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect. immun.* 1999 67 (10):5434-5440.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. j. trop. med. hyg.* 1993; 48 (3):348-357.

Kalil J & Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol. today.* 1996; 12:396-399.

Kierszenbaum F. Autoimmunity in Chagas' disease. *J. parasitol.* 1986; 72:201-211.

Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat. rev. immunol.* 2007; 7(7):532-42.

Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. rev. immunol.* 2002; 2:557-68.

Lee BO, Haynes L, Eaton SM, Swain SL, Randall TD. The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12. *J. exp. med.* 2002; 196(5):693-704.

Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173:260-7. PubMed PMID: 19758160.

Lenert P, Brumme R, Field EH. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J. clin. immunol.* 2005; 25:29-40.

Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. immunol.* 1991; 85:413-417.

Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes – Key regulators of immunity. *Curr. opin. immunol.* 2008; 20:332-338.

Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. *J. Bras. med.* 1980;38:34-40.

Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Dias, Joao Carlos Pinto (org.); Coura, José Rodrigues (org.). *Clínica e terapêutica da Doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 1997. p. 135 – 152. ISBN 85-85676-31-0. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, Silva JS. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. *Microbes infect.* 2008; 10:1558-1566.

Mady C, Cardoso RH, Barretto AC, Da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas cardiomyopathy, *Circulation.* 1994; 90:3098-30102.

Majlessi L, Lo-Man R, Leclerc. Regulatory B and T cells in infection. *Microbes infect.* 2008; 10:1030-1035.

Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. immunol.* 2007; 178:3447-3456.

Marinho CR, D'império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas disease. *Infect. immunol.* 1999; 67:308-318.

Matsuda JL, Gapin L, Baron JL et al. Mouse Va14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. Proc. natl. acad. sci. U.S.A. 2003; 100:8395–8400.

Mauri C, Gray D, Mushtaq N et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. J. exp. med. 2003; 197:489-501.

Mauri C & Ehrenstein MR. The ‘short’ history of regulatory B cells. Trends immunol. 2007; 29(1):34-40.

Mccabe RE, Remington JS, Araujo FG, Dekker M. Enhancement of resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by recombinant IFN- γ . In: Byrne GI., Turco J. Interferon and nonviral pathogens. New York : Dekker, c1988; p. 203-216. ISBN: 9780824779733. Series: Immunology series ; 42. National Library of Medicine - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Mccabe RE, Meagher SG, Mullins BT. Endogenous IFN- γ , macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J.infect. dis. 1991; 163:912-915.

McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. J. immunol. 2005; 175:3025-3032.

Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin. Exp. immunol. 2004; 137(1):129-38.

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am. j. pathol. 2001; 159:1723-1733.

Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. Infect. immun. 2003; 71(6):3165-3171.

Minoprio P, Coutinho A. Lymphocyte subpopulations and clonal repertoires participate in immune response to acute *T. cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1988a; 83 Suppl 1:356-359.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. j. immunol.* 1988b; 28:553-561.

Minoprio P. Chagas disease: CD5 B-cell-dependent The pathology? *Res. immunol.* 1991; 142:137-140.

Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. j. parasitol.* 2001; 31:588-591.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, Preffer FI, Bhan AK. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor α -mutant mice. *J. exp. med.* 1997; 186:1749-1756.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002; 16:219-230.

Mizoguchi A & Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J. immunol.* 2006; 176:705-710.

Moncayo A & Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104(Suppl I): 17-30.

Morato MJF, Brener Z, Cançado JR, Nunes RMB, Chiari E, Gazzinelli G. Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different strains and clones. *Am. j. trop. med. hyg.* 1986; 35:505-511.

Morris A & Moller G. Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis. *J. immunol.* 1968; 101:439-445.

Munõz-Fernández M, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. Eur. j. immunol. 1992; 22: 301-307.

Nabors GS & Tarleton RL. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infections. J. immunol. 1991; 146: 3591-3598.

Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M, Weigle WO. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. J. immunol. 1980; 124:121-126.

Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. Ann. trop. med. parasitol. 2000; 94(6):571-579.

Parekh VV, Prasad DV, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF-beta 1. J. immunol. 2003; 170:5897-5911.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Ann. rev. immunol. 2004; 22:929-979.

Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine. 2008; 43:395-401.

Piedras J, Gutierrez S, Reyes-López PA, Reyes K, López-Karpovitch X, Monteón V. Circulating lymphocyte subpopulations and activated T and B cells in patients with chagasic and non-chagasic cardiomyopathy. Cytometry. 1997; 30:28-32.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. Clin. cardiol. 2000; 23:883-889.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi AG, Rassi GG et al. Development and validation of a risk score for predicting mortality in Chagas heart disease. N. Engl. j. med. 2006; 355:799-808.

Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. immunol.* 1988; 150:4342-4247.

Reed SG, brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. immunol.* 153:3135-3140, 1994.

Rezende JM. Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Rev. goiana med.* 1959; 5:197.

Ribeiro-dos-Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, Pontes-de-Carvalho LC. A heart-specific CD4⁺ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite immunol.* 2001; 23(2):93-101.

Rodriguez AM, Santoro F, Afchain D, Bazin H, Capron A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect. immunol.* 1981;31:524-529.

Rottenberg ME, Bakhiet M, Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, Orn A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect. immun.* 1993; 61:5129-5133.

Saeland S, Duvert V, Moreau I, Banchereau J. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *J. exp. med.* 1993; 178:113-120.

Sahoo NC, Rao KV, Natarajan K. CD80 expression is induced on activated B cells following stimulation by CD86. *Scand. j. immunol.* 2002; 55:577-584.

Samudio M, Montenegro-James S, Cabral M, Martinez J, Rojas de Arias A, James MA. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am. j. trop. med. hyg.* 1998; 58:119-121.

Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. immun.* 2006; 74(4):2031-42.

Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PRZ, et al. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. j. immunol.* 2003; 58:655-663.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A et AL. Benznidazole Treatment during Early-indeterminate Chagas' Disease Shifted the Cytokine Expression by Innate and Adaptive Immunity Cells toward a Type 1-modulated Immune Profile. *Scand. j. immunol.* 2006; 64:554–563.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, de Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes infect.* 2008; 10:103-13.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009 104(suppl I):246-251.

Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, Bottasso O, Guiñazú N, Silva-Barbosa SD, Gea S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine growth factor rev.* 2007; 18(1-2):107-24.

Scharfstein J, Gomes JAS, Correa-Oliveira R. Back to the future in Chagas disease: from animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009. 104(Suppl I):187-198.

Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agente of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion.* 1991; 31:547-557.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007; 102(Suppl I):75-85.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta trop.* 2009.

Silva JS, Morriessey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. exp. med.* 1992; 175:169-174.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. 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.* 1995; 63:4862-4867.

Soares MBP & Ribeiro dos Santos R. Immunopathology of cardiomyopathy in experimental Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999; 94:257-262.

Sonoda KH, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. j. immunol.* 2002; 32:848-857.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gllob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. immun.* 2004; 72:5283-5291.

Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao HR. The regulatory role of Va14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Ann. rev immunol.* 2003; 21:483–513.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog. cardiovasc. dis.* 2009; 51:524-539.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of $\alpha 2$ microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* 1992; 356:338-340.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends parasitol.* 2002; 18(6):262-265.

Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, Godfrey DI, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ, Berzofsky JA. Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, Godfrey DI, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ, Berzofsky JA. *J. exp. med.* 2005; 202:1627-1633.

Torrice F, Heremans H, Rivera MT, Marck EV, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. immunol.* 1991; 146:3626-3632.

Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* 2001; 2(12):3014.1-3014.7.

Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg Leonard A, Herzenberg Leonore A. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103(16):6293-6298.

Tung JW & Herzenberg Leonore A. Unraveling B-1 progenitors. *Curr. opin. immunol.* 2007; 19:150-155.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S & Pena SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. j. pathol.* 1996; 149:2153-2159.

Van der Vliet HJ, Molling JW, Von Blomberg BM et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin. immunol.* 2004; 112:8-23.

Van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PM, van Lier RA, et al. Emergence of a CD4+CD28-granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J. immunol.* 2004; 173:1834-1841.

Van Voorhis WC & Eisen H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. exp. med.* 1989; 169:641-652.

Vasu C, Wang A, Gorla SR, Kaithamana S, Prabhakar BS, Holterman MJ. CD80 and CD86 C domains play an important role in receptor binding and co-stimulatory properties. *Int. immunol.* 2003; 15(2):167-175.

Velupillai P, Harn DA. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proc. natl. acad. sci. U. S. A.* 1994; 91:18-22.

Velupillai P, Secor WE, Horauf AM, Harn DA. B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars. *J. immunol.* 1997; 158:338-344.

Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JR. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. immun.* 1994; 62:5177-5182.

Vincent MS, Gumperz JE, Brenner MB. Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat. immunol.* 2003; 4:517-23.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage OS, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural Killer and CD4+CD25high regulatory T lymphocytes. *Scand. j. immunol.* 2005; 62:297-308.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand. j. immunol.* 2008. 68(5):516-525.

Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. immunol.* 2009; 182:7459-7472.

Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1^{high}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008; 28:639-650.

Wei DG, Lee H, Park SH, Beaudoin L, Teyton L, Lehuen A, Bendelac A. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J. exp. med.* 2005; 202(2):239-248.

World Health Organization. Chagas Disease. In: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Tropical Disease Research: Progress 1975-94: Highlights 1993-94: Twelfth programme Report of the UNDP/World bank/WHO Special Programme for research and training tropical disease (TDR). Geneva: WHO; 1995. p. 125. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1995/9241561793.pdf> Acesso: 01 dez. 2009. Bireme - <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=WHOLIS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=9241561793&indexSearch=ID>

Wood JN, Hudson L, Jessel TM, Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinat on subpopulation of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature*. 1982; 296:34-38.

Zuniga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunossupression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin. exp. immunol.* 2000; 119:507-515.

Zuniga E, Motran CC, Montes CL, Yagita H, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG⁺ B lymphocytes susceptible to Fas/ Fas ligand-mediated fratricide. *J. immunol.* 2002; 168(8):3965-3973.

Zuniga E, Acosta-Rodriguez E, Merico MC, Montes C, Gruppi a. Depletion of immature B cells durinf *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. *Eur. j. immunol.* 2005; 35(6):1849-1858.