

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS
T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺ NAS
DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA
DOENÇA DE CHAGAS**

por

FERNANDA FORTES DE ARAÚJO

Belo Horizonte

Setembro/2009

TESE DBCM-CPqRR

F.F.ARAÚJO

2009

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS
T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺ NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

por

FERNANDA FORTES DE ARAÚJO

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular
Orientação: Dr. Rodrigo Correa Oliveira
Co-orientação: Dr^a. Juliana de Assis Silva
Gomes Estanislau**

Belo Horizonte
Setembro/2009

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

A658
2009

Araújo, Fernanda Fortes de.

Avaliação do papel das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas / Fernanda Fortes de Araújo. – Belo Horizonte, 2009.

xix, 114 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 112 - 133

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Doença de Chagas/imunologia 2. Doença de Chagas/quimioterapia 3. Linfócitos T Reguladores/imunologia 4. *Trypanosoma cruzi*/imunologia
I. Título. II. Correa-Oliveira, Rodrigo (Orientação). III. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes (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 PAPEL DAS CÉLULAS
T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺ NAS DIFERENTES
FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS**

por

FERNANDA FORTES DE ARAÚJO

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Correa Oliveira (Presidente)

Prof. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Prof. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

Suplente: Marco Antônio da Silva Campos

Tese defendida e aprovada em 29/09/2009

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte

Dra. Andréa Teixeira Carvalho

Dr. Olindo Assis Martins Filho

Ms. Ana Thereza Chaves

Ms. Jacqueline Araújo Fiúza

Rafaella Christine Gomes Fares

Karine Silvestre Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha

Dra. Silvana Maria Eloi Santos

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dra. Débora d'Avila Reis

Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Alexandre Barcelos Morais da Silveira

SUPORTE FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

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

Dedico este trabalho aos meus pais pelo exemplo de vida e constante incentivo. À minha irmã e ao Kiko por estarem sempre presentes e ao meu afilhado Túlio por fazer minha vida mais feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado e me proporcionar sempre mais.

Ao Dr. Rodrigo meu imenso agradecimento pelo exemplo profissional, pela oportunidade que me foi dada, sempre acreditando no meu potencial e me apoiando desde a minha iniciação científica. Obrigado pelo incentivo e confiança que contribuíram para a minha formação científica, além de me proporcionar todos os ensinamentos e infra-estrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Juliana pelo apoio incondicional, dedicação, disposição, críticas, sugestões e principalmente amizade. Obrigado por contribuir para o meu crescimento científico e pessoal, acreditando sempre no meu trabalho e nunca perdendo a paciência. Obrigada pelo seu esforço e dedicação para a realização deste trabalho e por dividir comigo sua exemplar experiência profissional.

Ao Dr. Manoel Otávio pela atenção, carinho e disponibilidade na obtenção do sangue dos pacientes utilizados neste estudo. Obrigada por me proporcionar a oportunidade de convivência e aprendizagem com os pacientes portadores da doença de Chagas.

À Dra. Silvana Eloí por me proporcionar a oportunidade de trabalhar com amostras de pacientes com doença de Chagas tratados.

À Dra. Andréa Teixeira pelos ensinamentos, incentivos, apoio em todos os momentos, conversas e disponibilidade. Muito obrigada pelo auxílio e atenção para a realização e conclusão deste trabalho e acima de tudo pela amizade desde a minha entrada no laboratório de Imunologia.

Ao Dr. Ricardo Fujiwara pelo exemplo de profissionalismo, pelas críticas e sugestões essenciais neste trabalho. Obrigada pelo apoio, atenção, disponibilidade e ensinamentos infindáveis.

Ao Dr. Alexandre Barcelos pelo apoio e atenção nos ensinamentos relacionados à imunohistoquímica. Obrigada pela dedicação e amizade.

A Dra. Débora d'Ávila por permitir a utilização da infra-estrutura de seu laboratório necessárias a realização dos experimentos de imunohistoquímica.

Ao Dr, Olindo Martins-Filho pela oportunidade de colaboração e pela disponibilidade constante e consultoria científica.

À Dra. Maria José (Zezé), pelos ensinamentos, sempre compartilhando de suas experiências e sugestões de fundamental importância.

Aos doadores de sangue, cuja participação foi essencial para a execução desse trabalho.

À Tiza pelo auxílio e sugestões na parte de Citometria de fluxo.

À Clari, Lucina, Lorena e Renata pela amizade, alegria e principalmente boa vontade em me auxiliar com eficiência.

Ao nosso grupo de Chagas pelas agradáveis discussões, auxílio na realização da parte experimental desta tese e principalmente amizade. Agradeço à Juliana, Ana Thereza, Jacqueline, Rafaelle, Karine e Nilton.

Às minhas amigas do laboratório de Imunologia, Ana, Jack, Jack Maria, Rafa, Roberta e Karine pelo agradável convívio e por dividirem comigo momentos de descontração e alegria.

À minha estudante de iniciação científica Karine pela oportunidade de ensinar e aprender.

À todos os meus amigos 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.

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

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 tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos meus pais pela dedicação e incentivo, sempre me apoiando, principalmente nos momentos mais difíceis. À minha irmã e ao kiko pela participação em todos os momentos da minha vida e ao meu afilhado Túlio por me proporcionar alegria e motivação.

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

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | xii |
| LISTA DE TABELAS..... | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xv |
| RESUMO..... | xviii |
| ABSTRACT..... | xix |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2 OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 2.1 Objetivos Específicos..... | 21 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 23 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1 Caracterização da população estudada..... | 33 |
| 4.1.1 Critérios de exclusão..... | 34 |
| 4.1.2 Tratamento e acompanhamento dos pacientes..... | 35 |
| 4.1.3 Amostras de tecido cardíaco..... | 35 |
| 4.2 Obtenção dos antígenos solúveis..... | 36 |
| 4.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 36 |
| 4.2.2 <i>Schistosoma mansoni</i> | 36 |
| 4.2.3 <i>Leishmania braziliensis</i> | 37 |
| 4.2.4 <i>Candida albicans</i> | 37 |
| 4.3 Análise <i>ex vivo</i> do fenótipo celular de linfócitos TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico..... | 37 |
| 4.4 Análise do fenótipo celular, detecção de citocinas intracitoplasmáticas e expressão de Foxp3 por linfócitos TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico..... | 38 |
| 4.5 Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo..... | 39 |
| 4.6 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)..... | 42 |
| 4.7 Purificação das células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ | 42 |
| 4.8 Atividade funcional das células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ | 43 |
| 4.9 Ensaio de proliferação celular..... | 43 |
| 4.10 Cinética da expressão de Foxp3 em PBMC..... | 46 |
| 4.11 Processamento dos tecidos e Imunohistoquímica para o fator de transcrição Foxp3..... | 46 |
| 4.12 Quantificação dos linfócitos Foxp3 e análise morfológica..... | 47 |
| 4.13 Análise Estatística..... | 47 |

| | |
|--|------------|
| 5 RESULTADOS..... | 49 |
| 5.1 Caracterização das células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 49 |
| 5.2 Caracterização das células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} com perfil migratório do sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 54 |
| 5.3 Avaliação da presença de foco inflamatório e quantificação de células Foxp3 positivas em amostras de tecido cardíaco de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 57 |
| 5.4 Verificação do efeito da estimulação <i>in vitro</i> com antígenos não relacionados no perfil das células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} do sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 59 |
| 5.5 Avaliação da atividade funcional das células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 63 |
| 5.6 Determinação da cinética de Intensidade Média de Fluorescência do fator de transcrição Foxp3 em células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} nas culturas de PBMCs de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca..... | 65 |
| 5.7 Análise da expressão do fator de transcrição Foxp3 e dos marcadores de superfície CD45RO, CTLA-4 em células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de pacientes CARD após tratamento específico..... | 68 |
| 5.8 Análise no perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de pacientes CARD após tratamento específico..... | 71 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 73 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 86 |
| 8 ANEXOS..... | 87 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 112 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Análise de linfócitos TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico por citometria de fluxo..... | 41 |
| Figura 2: Análise da proliferação celular no sangue periférico de pacientes com doença de Chagas e indivíduos não infectados por citômetria de fluxo..... | 45 |
| Figura 3: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD=13)..... | 50 |
| Figura 4: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD=13)..... | 51 |
| Figura 5: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} CD62L ⁻ e TCD4 ⁺ CD25 ^{high} CD54 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD=13)..... | 55 |
| Figura 6: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} CD11a ⁺ e TCD4 ⁺ CD25 ^{high} CD18 ⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD=13)..... | 56 |
| Figura 7- Análise do foco inflamatório e quantificação de células Foxp3 positivas no tecido cardíaco..... | 58 |
| Figura 8: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico após 22 horas de estimulação com antígenos não relacionados..... | 60 |
| Figura 9: Avaliação da proliferação celular para análise da atividade funcional das células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ no sangue periférico..... | 64 |
| Figura 10: Cinética da intensidade média de fluorescência do fator de transcrição Foxp3 por células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} nas culturas de PBMC dos grupos estudados..... | 66 |
| Figura 11: Cinética da intensidade média de fluorescência do fator de transcrição Foxp3 por células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} nas culturas de PBMC dos grupos estudados..... | 67 |
| Figura 12: Avaliação de células T CD4 ⁺ CD25 ^{high} e do fator de transcrição Foxp3 no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou pacientes apresentando a forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7)..... | 69 |


Figura 13: Avaliação de células TCD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ e TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou pacientes apresentando a forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7)..... 70

Figura 14: Avaliação de células TCD4⁺CD25^{high}IFN- γ e TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou pacientes apresentando a forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7)..... 72

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Características da população estudada..... | 33 |
| Tabela 2: Análise fenotípica de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} | 53 |
| Tabela 3: Análise do percentual de células TCD4 ⁺ CD25 ^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=5); pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND=6) ou cardíaca (CARD=6)..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APC** – Alofocianina
- APCs** – Células apresentadoras de antígenos
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CAND** - Antígenos derivados de *Candida albicans*
- CARD** – Indivíduos portadores da forma clínica cardíaca
- CARD T** – Indivíduos portadores da forma clínica cardíaca Tratados
- CBA** - Cytometric Bead Array
- CD** – Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
- 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
- CD11a**- Molécula envolvida na adesão de leucócitos
- CD18** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos
- CD25** – Cadeia  receptor para a citocina IL-2
- CD28** – Marcador de superfície celular para molécula coestimulatória
- CD40L** – Ligante de CD40 (molécula de ativação de linfócitos B)
- CD45RO**- Marcador de superfície de linfócitos de memória
- CD45RA**- Marcador de superfície de linfócitos virgens
- CD54** – Molécula envolvida na adesão de leucócitos
- CD62L** - Molécula L-selectina considerada molécula de ativação e adesão de leucócitos
- CD69** –Molécula de ativação de leucócitos
- CDG** – Indivíduos portadores da forma clínica cardiodigestiva
- CFSE** – Corante para marcação da proliferação celular (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)
- CMBLAST** – Meio de Cultura
- CPqRR** – Centro de Pesquisas René Rachou
- 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
- DC** – Células dendríticas
- DIG** – Indivíduos portadores da forma clínica digestiva
- ECG** – Eletrocardiograma
- EDTA** – Etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima
EPI – Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
FL – Fluorescência
Foxp3- Repressor de transcrição
FSC – Tamanho celular
GITR- Receptor da família do receptor de TNF induzido por glicocorticóides
HAS - Hipertensão arterial sistêmica
HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano
Id- Anticorpo anti-idiotípo
IDO - Enzima indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN- γ Interferon gamma
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
IMF – Intensidade Média de Fluorescência
IND – Indivíduos portadores da forma clínica indeterminada
IPEX - Imunodesregulação, Poliendocrinopatia e Enteropatia, ligado ao X
LAG 3 – Molécula de superfície homóloga a CD4 que se liga ao MHC II com alta afinidade
LIT – Meio de cultivo para formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (Liver Infusion Tryptose)
Lb – Antígenos de *Leishmania braziliensis*
LB – Linfócitos B
LT- Linfócitos T
MACS – Sistema de separação celular por magnetismo
MEM – Meio de cultura (Minimal Essential Medium)
MFF – Solução Fixadora
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA – RNA mensageiro
n- número de indivíduos analisados
NFAT - Fator nuclear de ativação de células T
NI – Indivíduos não infectados
NK- Células natural killer
NO – Óxido Nítrico
OPD – Cromógeno (Ortho-Phenylenediamine)

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
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PE – Ficoeritrina
PerCP – Proteína Clorofila Piridinina
RNI- Reativos intermediários de nitrogênio
ROI- Reativos intermediários de oxigênio
RPMI – Meio de cultura (Rosweel Park Memorial Institute)
SEA- Antígenos derivados do ovo de *Schistosoma mansoni*
SNPs - Polimorfismos de base única
SSC – Granulosidade e complexidade interna de uma célula
SWAP - Antígenos derivados do verme adulto de *Schistosoma mansoni*
TCD4- Linfócitos T da subpopulação celular CD4 (auxiliares)
TCR- Receptor de linfócitos T
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
TNFR – Receptor do Fator de Necrose Tumoral
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 células T reguladoras, apoptose e citocinas reguladoras. Recentemente foi demonstrada a participação de células T CD4⁺CD25⁺ (Treg) no controle da resposta imune. A identificação de células TCD4⁺CD25⁺ e o seu papel tem sido objeto de intenso estudo devido ao papel crítico dessas células na manutenção da auto-tolerância, bem como, no controle da resposta imune. Nosso objetivo neste trabalho foi avaliar o perfil fenotípico e os mecanismos pelos quais as células T CD4⁺CD25^{high} exercem sua função em indivíduos portadores das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas. Nossos resultados mostraram que pacientes apresentando a forma clínica IND possuem maior percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ no sangue periférico e que essas células mantêm a expressão de Foxp3 por períodos de tempo semelhantes aos dos indivíduos não infectados (NI). Adicionalmente, nossos dados mostraram que os pacientes de grupo IND também possuem um maior percentual de células Foxp3 positivas no tecido cardíaco. Por outro lado, os pacientes do grupo CARD apresentam um aumento de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺, Granzima B⁺ e que apresentam uma queda na expressão de Foxp3 após alguns dias de cultura. Nossos resultados ainda mostraram que as células Treg dos pacientes portadores da doença de Chagas apresentam perfil de ativação e de migração podendo, desta forma, migrar para o local de infecção e provavelmente atuar *in situ*. Além disso, as células TCD4⁺CD25^{high} dos pacientes portadores da doença de Chagas atuam de forma antígeno específica e possuem uma tendência a regular a atividade de células efetoras. Nossos dados mostram que o tratamento quimioterápico tem efeito no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}, porém sua atividade supressora e produção de citocinas não é alterada. De fato, o papel das células Treg durante o tratamento ainda é desconhecido e são necessários estudos adicionais para melhor caracterizar a resposta imunológica pós-tratamento. Nossos dados reforçam a importância das células Treg no desenvolvimento da doença de Chagas, sugerindo que a resposta imune contra *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 regulatory T cells, apoptosis and regulatory cytokines. Recently, it has been demonstrated the participation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (Treg) in the control of the immune response. The identification of the CD4⁺CD25⁺ T cells and its role have been the object of intense studies due to the putative critical role of these cells in maintaining self tolerance, as well as in the control of immune response. In this study we evaluate the phenotypic profile and the mechanisms by which the CD4⁺CD25^{high} T cells function in patients with the indeterminate (IND) and cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. Our results showed that patients with the IND clinical form present an increase on the percentage of CD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ T cells in the peripheral blood. These cells also express Foxp3 for a similar period of time as non-infected individuals (NI). Additionally, the data show that patients from the IND group also present an increase of Foxp3 positive cells in the cardiac tissue. On the other hand, the patients from the group CARD showed an increase of CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺, Granzima B⁺ T cells and a decrease in the Foxp3 expression in culture. The results demonstrated that Treg cells from patients with Chagas disease present an activated and migratory profile and therefore may be able to migrate to the tissues where acting *in situ*. Moreover, CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with Chagas disease are antigen specific and have a tendency to regulate the activity of effectors cells. Our data showed that the chemotherapeutic treatment affect the percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells, however, their suppressive activity and cytokines production do not changed. In fact, the role of Treg cells during the treatment is still unknown and additional studies are necessary for better characterization of the immunologic response after treatment. Our data emphasize the importance of Treg cells 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.

1 INTRODUÇÃO

Em abril de 1909, Carlos Chagas comunicou ao mundo científico a descoberta da doença de Chagas, seu agente causal, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, e o inseto que o transmitia, triatomíneo conhecido como “barbeiro”. O “feito” de Chagas, considerado único na história da medicina, 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 com doença de Chagas (WHO, 2003).

Estima-se que durante a fase crônica da doença cerca de 60% dos indivíduos infectados apresentam forma clínica indeterminada, com ausência de sinais e sintomas da doença. Entretanto, após 20-30 anos de infecção, cerca de 30% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca, resultante de danos progressivos do miocárdio levando a cardiopatia chagásica, representando um sério problema de saúde pública (Dias, 1989). Os custos previdenciários e médico-hospitalares, processos de perpetuação de pobreza familiar em zonas endêmicas, baixa produtividade e programas de controle e vigilância são elementos que indicam importantes gastos financeiros e sociais dos países afetados pela endemia.

Vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle e/ou desenvolvimento das formas graves na doença de Chagas na tentativa de encontrar marcador(es) de evolução da morbidade permitindo, assim, a identificação de pacientes que possam ser acompanhados mais intensamente, e que deverão receber tratamentos alternativos, se disponíveis. Esses estudos são extremamente importantes no contexto mundial devido ao fato da doença de Chagas ainda ser um problema de saúde pública, com risco de transmissão anual de 200.000 novos casos.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil fenotípico e os mecanismos pelos quais as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg) exercem sua função nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

2.1 Objetivos Específicos

Caracterizar o perfil fenotípico das células T CD4⁺CD25^{high} através da expressão das moléculas de superfície (CTLA-4, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD40L, CD69, GITR), e fatores intracelulares Foxp3, Granzima B e das citocinas IL-10, TGF- β e IL-17 do sangue periférico dos indivíduos não-infectados (NI) e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD, *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;

Caracterizar o perfil migratório das células T CD4⁺CD25^{high} através da expressão das moléculas de superfície (CD62L⁻, CD54, CD11a e CD18) do sangue periférico dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;

Avaliar a presença de células Foxp3 positivas em amostras de tecido cardíaco dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD;

Verificar o efeito da estimulação *in vitro* com antígenos não relacionados sobre perfil das células TCD4⁺CD25^{high} do sangue periférico dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD;

Avaliar a atividade inibitória de células T CD4⁺CD25⁺ purificadas a partir de amostras do sangue periférico dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD sobre a proliferação celular;

Avaliar o mecanismo de supressão das células T CD4⁺CD25⁺ através do bloqueio *in vitro* com anticorpos monoclonais anti-TGF- β ou anti-IL10 ou anti-CTLA-4 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD;

Determinar a cinética de expressão de Foxp3 em PBMC dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;

Avaliar o efeito do tratamento com Benzonidazol sobre o perfil fenotípico das células TCD4⁺CD25^{high}, através da expressão de Foxp3, dos marcadores de superfície CD45RO, CTLA-4 e das citocinas intracitoplasmáticas IL10 e IFN- γ dos pacientes apresentando a forma clínica CARD após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Há 100 anos, Carlos Chagas descreveu a doença de Chagas (Chagas, 1909) reportando seus elementos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos, bem como seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelo inseto da ordem Hemiptera. Segundo a Organização Mundial de Saúde existem aproximadamente 15 milhões de indivíduos infectados na América Latina, apresentando o Brasil cerca de 5 milhões de chagásicos (WHO, 2003). Apesar dos grandes avanços obtidos no controle da transmissão natural, dados da organização mundial da saúde mostram que ainda existe a incidência de 200 mil novos casos ao ano (WHO, 2003).

A transmissão natural da doença se faz 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 sangüíneos são ingeridos e, uma vez no intestino do inseto, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em formas tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são expelidos com as fezes e/ou urina do inseto vetor no local da picada, após o repasto sangüíneo, e penetram no hospedeiro através da pele lesada ou mucosa. A forma tripomastigota se desenvolve no interior de diferentes tipos de células do hospedeiro vertebrado. No interior dessas células, os parasitos se transformam na forma amastigota que se multiplica por sucessivas divisões binárias, evoluindo, posteriormente, para a forma tripomastigota. As células infectadas rompem-se e os parasitos livres invadem células próximas ou alcançam a corrente sangüínea disseminando a infecção para os diferentes órgãos e sistemas (Dias, 2000).

Outros mecanismos de transmissão, alternativos ao vetorial, têm sido descritos e incluem a via transfusional, a transmissão congênita, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (Bittencourt, 1976; Brener, 1987; Schmunis, 1991; Dias, 2000). Além disso, em regiões como na Amazônia, existem mecanismos excepcionais de transmissão (vetorial domiciliar sem colonização, vetorial extradomiciliar) e a ocorrência de surtos episódicos de transmissão oral (Coura, 2006). Recentemente, ocorreram surtos de doença de Chagas com forma aguda e morte após ingestão de formas tripomastigotas dissolvidas em bebidas, como suco de cana e açaí, em que os insetos vetores silvestres, provavelmente, foram triturados durante o preparo ou suas fezes contaminaram o alimento, conforme divulgado amplamente na mídia e no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (Brasil, 2005).

A análise clínica e laboratorial de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por

alterações teciduais degenerativas e inflamatórias focais, devido a uma intensa multiplicação local do parasito. Manifestações sistêmicas, como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, podem também ser observadas (Laranja, 1953; Rezende & Rassi, 1994). Entretanto, em geral, esses sinais são atenuados e a fase inicial da doença passa despercebida, confundindo-se com uma "gripe" ou "mal estar" passageiro.

O benzonidazol é o composto disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil. Esse composto apresenta sérios efeitos colaterais, requer administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica e há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito à ação dessa droga, sendo recomendado o tratamento de pacientes na fase aguda e crônica recentes, nos quais se observam resultados positivos, principalmente em crianças menores de 15 anos (Urbina & Docampo, 2003). Sabe-se que durante a fase aguda a terapêutica específica tem sucesso significativo com níveis de cura que podem chegar a 70% dos pacientes tratados (Rassi et al., 2000). Estudos realizados por nosso grupo e outros mostram que há estreita relação sinérgica entre a produção de elevados níveis de IFN- γ e a eficácia do tratamento quimioterápico instituído na fase aguda da infecção chagásica (Bahia-Oliveira et al., 2000; Sathler-Avelar et al., 2006).

A evolução da fase aguda para a fase crônica, que pode durar de poucas semanas a meses, é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas, diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe IgG. Do ponto de vista clínico, as manifestações desenvolvidas durante a fase crônica da doença permitem a classificação dos pacientes em diferentes formas clínicas: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardiodigestiva (CDG). A forma clínica indeterminada é observada na maioria dos pacientes infectados (50-60%) que podem permanecer assintomáticos por períodos de tempo longos e variáveis. 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). 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). Acredita-se que cerca de 2 a 5% dos pacientes apresentando a forma clínica indeterminada irão desenvolver a forma cardíaca a cada ano, enquanto uma menor percentagem irá apresentar a forma digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) (Macedo, 1980; Dias, 1989).

Aproximadamente, 30 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma clínica cardíaca podendo apresentar alterações eletrocardiográficas decorrentes da infecção

chagásica, levando ao surgimento de arritmias e insuficiência cardíaca (Brener, 1987). A miocardite 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). Nos estágios iniciais, o paciente pode apresentar sintomas leves, relacionados a distúrbios de ritmo. Nos estágios intermediários, as manifestações clínicas persistem ou se intensificam e pode 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. A morte súbita representa um risco constante em qualquer estágio da forma clínica cardíaca da doença de Chagas (Mady et al., 1994). A infecção chagásica pode levar ainda a dilatações do cólon e esôfago (megacólon e megaesôfago), principais manifestações da forma clínica digestiva. A denominação de forma clínica digestiva 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 megaesôfago e megacólon bem caracterizados. Inquéritos realizados em áreas endêmicas mostram que a prevalência da forma clínica DIG varia em torno de 6-9% em indivíduos acometidos pela doença de Chagas (Dias, 1989).

Uma das grandes incógnitas na doença de Chagas é o tratamento quimioterápico durante a fase crônica da doença. Apesar da maioria dos estudos revelarem uma baixa eficiência desse fármaco durante a terapia de pacientes crônicos, avaliações recentes têm sugerido o tratamento de modo a retardar, ou mesmo evitar, a evolução da doença crônica (Andrade et al., 2004; De Castro et al., 2006; Viotti et al., 2006). No entanto, na fase crônica e principalmente de pacientes portadores das formas graves não se conhece bem o efeito do tratamento. Considerando que o parasito tem papel importante no desenvolvimento das formas graves observadas nos pacientes portadores da doença de Chagas, é interessante especular se o tratamento com benzonidazol interfere nos mecanismos reguladores de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca da infecção.

Os mecanismos específicos envolvidos com o estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são complexos. Não se sabe explicar como alguns indivíduos infectados desenvolvem formas graves da doença e nem o fato das manifestações clínicas serem tão heterogêneas. Acredita-se que estas manifestações são conseqüências de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) (Dias, 2000).

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-ímmunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns autores apontam, ainda, para a existência de reação cruzada entre componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (Kierszenbaum, 1986, 1999, Al-Sabbagh et al., 1998; Kalil & Cunha-Neto, 1996; Cunha-Neto et al., 1995; Levitus et al., 1991; Van Voorhis & Eisen, 1989; Acosta & Santos-Buch, 1985; Wood et al., 1982). 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 (Añez et al., 1999; Higuchi et al., 1993, 1997; Vago et al., 1996; Tarleton, 2001). De fato, Higuchi e colaboradores (1993) utilizando técnicas de imunohistoquímica estabeleceram uma associação entre a presença de antígenos do *T. cruzi* e a formação de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco de pacientes com miocardite chagásica.

Devido a limitações éticas de se estudar o perfil fenotípico do infiltrado inflamatório e lesões teciduais decorrentes da infecção crônica da doença de Chagas, vários pesquisadores têm utilizado o sangue periférico como estratégia para avaliar a resposta imunológica desencadeada durante a fase crônica da doença. Estudos da resposta imune celular na infecção chagásica têm sido desenvolvidos através da análise da reatividade *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes após a estimulação antigênica específica, bem como, por estudos da composição celular de diferentes compartimentos. A resposta de proliferação de PBMC de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas tem demonstrado que essas células são capazes de proliferar quando estimuladas *in vitro* por antígenos solúveis das formas epimastigotas ou tripomastigotas do *T. cruzi* (De Titto et al., 1983; Morato et al., 1986; Michailowsky et al., 2003; Gomes et al., 2003; Barros-Mazon et al., 2004). Diferenças na intensidade da resposta de proliferação de PBMC aos antígenos do parasito tem sido reportado (Morato et al., 1986; Barros-Mazon et al., 2004), embora outros estudos não tenham observado diferenças entre as formas clínicas (De Titto et al., 1983). A remoção de células aderentes em culturas de PBMC leva a um aumento da resposta proliferativa (Morato et al., 1986), sugerindo um efeito supressivo exercido pelos monócitos/macrófagos. Citocinas e mediadores da resposta imune produzidos por estas células, como a IL-10, prostaglandinas, reativos intermediários de oxigênio ou de nitrogênio (ROI e RNI) são moléculas que poderiam mediar à supressão da proliferação e ativação de linfócitos (Abrahamsohn & Coffman, 1995, 1996; Pinge Filho et al., 1999; Barros-Mazon et al., 2004), levando conseqüentemente à diminuição da intensidade da reação imune. Além disso, na doença de chagas também foi observado que monócitos derivados de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada apresentam características moduladoras como, baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10, enquanto monócitos

derivados de pacientes apresentando a forma clínica cardíaca 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.

Embora inúmeros trabalhos utilizando modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção pelo *T. cruzi* (Laguens et al., 1981; Honteberty-Joskowicz et al., 1991; Ribeiro Dos Santos et al., 1992; Soares & Ribeiro Dos Santos, 1999; Tarleton et al., 1992, 1990; Araujo, 1989; Rottenberg et al., 1988, 1993; Brener & Gazzinelli, 1997), o papel dessas células ainda não está totalmente esclarecido na infecção humana.

Na doença de Chagas humana, a avaliação de células presentes no sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos demonstrou um grande número de células T e B circulantes, além de uma diminuição significativa no percentual de células T CD3⁺ (Dutra et al., 1994). Células B CD5⁺ estão presentes em alto percentual na circulação destes pacientes, sugerindo uma relação entre estes fenótipos celulares 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). Observa-se ainda proliferação diferenciada de populações celulares após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* ou com anticorpos anti-epimastogotas (Id). Dessa maneira, a estimulação com antígenos de *T. cruzi* leva a expansão preferencial de células T ativadas enquanto Id estimula preferencialmente células B CD5⁺ e células T CD8⁺. O fato de que antígenos do parasito e anticorpos anti-parasito estarem presentes no hospedeiro durante a fase crônica da infecção, sugerem o seu envolvimento em mecanismos distintos de ativação celular e provavelmente no desenvolvimento da patologia chagásica (Dutra et al., 2000).

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. 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). 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). 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; Abrahamssohn & Coffman, 1996; Abbas et al., 2000).

A avaliação do papel imunorregulador das citocinas na doença de Chagas humana é ainda escassa. Dutra e colaboradores (1997), utilizando RT-PCR, analisaram os níveis de expressão de mRNA para várias citocinas em 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. Estes achados sugerem que a presença simultânea de resposta a estímulos antigênicos assim como aquelas mediadas por anticorpos durante a fase crônica da doença de Chagas poderiam explicar a existência de reatividade inflamatória e anti-inflamatória detectada na maioria dos pacientes.

Bahia-Oliveira e colaboradores (1998) sugeriram um papel duplo para o IFN- γ no decorrer da doença chagásica humana. Utilizando PBMCs obtidas de grupos distintos de pacientes com a doença de Chagas, tratados e não tratados durante a fase aguda, esses autores relataram níveis significativamente mais elevados desta citocina em pacientes considerados curados quando comparados a pacientes tratados não curados. Paradoxalmente, no grupo não tratado, composto por pacientes portadores da forma crônica da doença, a citocina IFN- γ estava mais elevada em pacientes cardíacos do que em pacientes assintomáticos. Desta forma, esta citocina poderia estar envolvida tanto na proteção quanto no desenvolvimento da patologia chagásica. Esses autores atribuíram ainda, papel para o IFN- γ na eliminação do parasito, em conjunto com a quimioterapia específica, levando assim a cura dos pacientes (Bahia-Oliveira et al., 2000), enquanto nas formas mais graves esta citocina estaria envolvida na indução de resposta inflamatória (Gomes et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que pacientes apresentando a forma clínica cardíaca 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 com as formas clínicas cardíaca e indeterminada secretam IFN- γ diferencialmente ao estímulo induzido pelo *T. cruzi*, sugerindo que um perfil do Tipo 1 pode ter papel no desenvolvimento da cardiopatia. Recentemente, foi observado que a razão entre as citocinas IFN- γ /IL-10 está aumentada nos pacientes da forma clínica cardíaca quando comparada ao grupo indeterminado, entretanto, a razão IL-10/IFN- γ nos pacientes da forma clínica indeterminada era maior quando comparado aos pacientes do grupo cardíaco. Interessantemente, quando foi re-avaliada a produção destas citocinas após 2 anos de estudo

foi verificado que os pacientes com a forma clínica indeterminada, que evoluíram para a forma clínica cardíaca apresentaram uma diminuição significativa da razão IL-10/IFN- γ e um aumento significativo na 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, porém recentemente foi observado que as subpopulações de células T CD4⁺ têm atividade importante no controle da resposta imune. Essas células denominadas T reguladoras (Treg) apresentam função protetora em várias situações patológicas e expressam o marcador de superfície CD25 e o repressor de transcrição Foxp3. Essas células são naturalmente geradas no Timo e constituem de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas em animais e humanos (Baecher-Allan et al., 2001; Mills, 2004).

A presença de células T reguladoras em humanos foi descrita como sendo células caracterizadas pela anergia em resposta a estímulos policlonais, e elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular, através de um mecanismo de contato célula-célula (Baecher-Allan et al., 2001). Essas células T CD4⁺CD25⁺ apresentam-se como uma subpopulação altamente especializada que é essencial para o controle de resposta ao próprio exercendo papel na contenção de desordens auto-imunes (Baecher-Allan et al., 2002).

Para o estudo das células Treg várias moléculas são utilizadas para caracterização de seu fenótipo regulador. Dentre essas moléculas destacam-se CTLA-4, CD62L, CD45RO (Baecher-Allan et al., 2001). Além disso, o receptor induzido por glicocorticóide (GITR), da família do TNFR (Shimizu et al., 2002) e Foxp3 (Fontenot et al., 2003) são marcadores adicionais. Estudos recentes mostram que a alta expressão do gene Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁺ e a baixa expressão deste gene em células T virgens e em células T CD4⁺CD25⁻ recém ativadas, sugerem que a expressão de Foxp3 é fator determinante no desenvolvimento das células Treg (Fontenot et al., 2003; Khattry et al., 2003; Hori et al., 2004). Esta função foi mostrada claramente em animais “knockout” para Foxp3 onde ocorre a perda da regulação e desenvolvimento de doença autoimune. Foxp3 foi ainda associado à síndrome de IPEX (Imunodesregulação, Poliendocrinopatia e Enteropatia, ligado ao X) em humanos, sugerindo o papel dessa molécula na regulação imune (Hori et al., 2003, Fontenot et al., 2003). De fato, pacientes com IPEX desenvolvem doenças autoimunes, tais como diabetes do Tipo 1 e tireoidite, bem como doença intestinal inflamatória e alergias (Wildin et al., 2002).

A importância do Foxp3 no desenvolvimento e função das células Treg está bem estabelecida, entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais Foxp3 funciona permanece sem ser elucidado. Foxp3 possui três domínios funcionais distintos: domínio “zinc-finger” (aminoácidos 200-223); domínio “leucine-zipper” (aminoácidos 240-261) e domínio “carboxi-terminal forkhead” (aminoácidos 338-421) (Gambineri et al., 2003; Wu, 2006). Em

estudos recentes, mutações foram encontradas em cada um dos domínios funcionais do gene de Foxp3 em indivíduos afetados por IPEX, o que indica que essas regiões são importantes para a correta funcionalidade do Foxp3 e conseqüentemente para a função das células T reguladoras (Gambineri et al., 2003).

Estudos adicionais mostram que a habilidade do Foxp3 de inibir a transcrição é abolida com mutações nos resíduos do domínio “forkhead” que interage com NFAT (fator nuclear de ativação de células T) (Wu, 2006). Esses estudos deixam claro que a expressão do Foxp3 tem efeito marcante na função das células Treg, tanto bioquimicamente quanto em níveis celulares. Outros estudos já demonstraram a existência de vários sítios polimórficos, do tipo microssatélites e polimorfismos de base única (SNPs), no gene Foxp3 e sua possível associação com a suscetibilidade a doenças auto-imunes, provavelmente por alterar a expressão e/ou a função de Foxp3 (Abel et al., 2001; Sanchez et al., 2005; Ban et al., 2007).

A participação de moléculas co-estimuladoras inibidoras, como o CTLA-4, pode ser um importante mecanismo de supressão utilizado pelas células TCD4⁺CD25⁺. A expressão da molécula CTLA-4 nas células TCD4⁺CD25⁺ leva a inibição da ativação de células T por indução de um sinal negativo que coincide com a estimulação do TCR ou por co-estimulação inibitória competitiva devido à alta afinidade em ligar-se B7-1 e B7-2 quando comparado com CD28. Isto sugere que a força de sinalização do TCR, bem como, o grau de co-estimulação pode ter papel diferenciado na manutenção da função efetora das células T CD4⁺CD25⁺ (Baecher-Allan et al., 2001). Além disso, Tang & Krummel (2006) mostraram que células Treg *in vivo* formam interações duradouras com as células dendríticas (DCs) logo após elas entrarem nos linfonodos, e isso enfraquece a capacidade das DCs para, subsequentemente, ativar células T efectoras, indicando que, *in vivo*, células Treg podem inibir a resposta das células T indiretamente, pela modulação da função das células apresentadoras de antígeno (APCs). Outro estudo mostrou que células Treg expressando CTLA-4 induzem a expressão pelas APCs de uma enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que degrada o triptofano. A falta desse aminoácido essencial tem sido mostrada como causa da inibição da ativação de células T e, conseqüentemente, a indução de apoptose dessas células (Fallarino et al., 2003). Outro mecanismo descrito é a participação das citocinas IL-10 e TGF- β bem conhecidas por suas atividades reguladoras, podendo ser produzidas por células T CD4⁺CD25⁺ ou indiretamente por T CD4⁺ CD25⁻ em situações de tolerância a infecções (Liu et al., 2003). Porém, Asseman e colaboradores (1999) e Fahlen e colaboradores (2005) afirmaram que a molécula co-inibitória CTLA-4, bem como as citocinas imunossupressoras, TGF- β e IL-10, influenciam a função das células Treg apenas em alguns sistemas de supressão *in vivo* e não são essenciais para a função das Treg *in vitro*. Apesar de inúmeros estudos, em vários

modelos, o mecanismo pelo qual células Treg limitam as respostas efetoras permanece pouco entendido, persistindo uma oposição aparentemente não resolvida entre os mecanismos pelos quais essas células suprimem a atividade das células T efetoras *in vitro* e *in vivo*.

Recentemente, vários estudos têm mostrado o duplo papel das células Treg, por um lado controlando a exacerbação da inflamação e o dano tecidual e por outro auxiliando na persistência do patógeno. O equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores pode determinar o progresso da infecção e em alguns casos ser mutuamente benéfico para o parasito e para o hospedeiro (Belkaid et al., 2002, 2004). Esses dados são confirmados através de estudos feitos em modelos de camundongos infectados com *Plasmodium yoelii*, onde a depleção de células Treg protege o camundongo da morte, pois restaura o número de células efetoras contra o parasito, controlando a infecção (Hisaeda et al., 2004). Estudos realizados em camundongos infectados com *Candida albicans* mostram ainda que a redução de células Treg induz um melhor controle da infecção, entretanto, aumenta a inflamação patológica gastrointestinal (Montagnoli et al., 2002).

Por outro lado, em algumas situações o aumento no número de células Treg pode conduzir para a reativação da doença. Estudos demonstram que em camundongos portadores da infecção crônica por *Leishmania* a transferência de células Treg purificadas derivadas de outros camundongos também na fase crônica da infecção é suficiente para disparar a reativação da doença e inibição da resposta efetora de memória (Mendez et al., 2004). Estudos adicionais em camundongos portadores da infecção por *Leishmania* confirmam que a produção de IL-10 por células Treg contribui diretamente para a persistência do parasito através da modulação da função das células apresentadoras de antígenos (APCs) ou inibição da produção de citocinas por células do tipo 1, sugerindo que o equilíbrio estabelecido entre células T reguladoras e efetoras nos sítios de infecção crônica podem refletir estratégias de sobrevivência tanto do parasito quanto do hospedeiro (Belkaid et al., 2002).

É bem aceito que a ausência de patologia em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* está associada com a capacidade do indivíduo em regular a resposta anti-*T. cruzi*, responsável pelo controle da parasitemia persistente e do dano inflamatório tecidual, característicos da doença de Chagas (Brenner et al., 1997). Portanto os estudos sobre imunorregulação em pacientes com doença de Chagas que possibilitem a investigação dos processos de transição entre os estágios clínicos da doença crônica, com vistas ao desenvolvimento de indicadores de prognóstico, tornam-se cruciais no atual estágio de conhecimento das formas clínicas graves.

A participação das células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} na doença de Chagas tem demonstrado que pacientes portadores da forma clínica indeterminada apresentam percentuais elevados dessas células quando comparado aos pacientes portadores da forma clínica cardíaca

e indivíduos não infectados (Vittelli-Avelar et al., 2005; Araujo et al., 2007), sugerindo que essas células poderiam controlar as funções efetoras dos linfócitos T desencadeada pelo *T. cruzi*, controlando o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica. Baseado nestes dados nosso objetivo é determinar o perfil fenotípico e os mecanismos pelos quais as células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} exercem sua função e o papel dessas células no controle e/ou desenvolvimento das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas. O presente projeto nos permitirá contribuir com a produção de conhecimentos relevantes sobre o mecanismo de supressão das células T reguladoras na doença de Chagas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da população estudada

A população estudada neste trabalho constou de pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas e indivíduos não-infectados, com a idade variando entre 25-70 anos (Tabela 1). Estes pacientes foram provenientes 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. É importante salientar que o número(n) dos pacientes estudados neste trabalho foi diferente de acordo com o procedimento realizado.

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 | 4/7 | 29-55 |
| Indeterminada | IND | 14 | 5/9 | 30-67 |
| Cardíaca | CARD | 13 | 10/3 | 25-70 |

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 15 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; consentimento 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, caracterizada por positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas

e/ ou sinais da doença; eletrocardiograma convencional normal; exames 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 sorológicos negativos, além de ausência de indícios clínicos e epidemiológicos do diagnóstico de doença de Chagas.

Grupo 4: Constituído por pacientes portadores da forma clínica cardíaca, tratados com benzonidazol. Esses pacientes foram acompanhados clinicamente pela Professora Silvana Maria Eloi Santos.

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 hidroeletrolíticos, 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 – CEP SH-IRR) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (COEP - ETIC 37204).

4.1.2 Tratamento e acompanhamento dos pacientes

Os pacientes pertencentes ao grupo 4 foram tratados com benzonidazol (Rochagan-Roche) 5mg/Kg por 60 dias. A avaliação inicial, durante (30º e 60º dias) e 1 ano após o tratamento consiste em: avaliação clínica para detecção de sintomas ou sinais cardíacos ou digestivos, raio X de tórax, eletrocardiograma, holter, hemograma, teste ergométrico. O sangue foi coletado para avaliação hematológica e análise dos parâmetros imunológicos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UFMG (COEP – ETIC 025/97).

4.1.3 Amostras de tecido cardíaco

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de tecido cardíaco obtidas de pacientes chagásicos apresentando a forma clínica indeterminada (n=4) e cardíaca (n=3) da doença de Chagas e amostras de tecido cardíaco de indivíduos não infectados (n=3) submetidos à necropsia ou procedimentos cirúrgicos provenientes da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Os pacientes estudados não receberam nenhum tratamento específico ao parasito e os testes sorológicos (fixação do complemento, hemaglutinação e imunofluorescência) foram realizados para a confirmação da doença de Chagas. A média de idade dos pacientes estudados foi de 55 ± 14 anos. O grupo controle, composto dos indivíduos NI foram indicados por sorologia negativa para doença de Chagas com média de idade de 54 ± 20 anos. As amostras de tecido cardíaco foram fixadas em

solução e embebidas em parafina para a realização da histologia convencional e imunohistoquímica.

Os familiares dos pacientes avaliados neste estudo assinaram um Termo de Consentimento. Todas as dúvidas referentes à pesquisa foram esclarecidas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP -ETIC 127/03)

4.2 Obtenção dos antígenos solúveis

4.2.1 *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas do parasito foram cultivadas e mantidas em meio LIT. Os parasitos da forma epimastigota da cepa CL foram 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 foram centrifugadas a 50000 g durante 60 minutos a 4°C contra PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0.45 μm e mantido em pequenas alíquotas (1ml) a -70 °C até o uso.

4.2.2 *Schistosoma mansoni*

Os antígenos solúveis de ovos (SEA) e vermes adultos do *S. mansoni* (SWAP) foram obtidos segundo método descrito por (Gazzinelli et al., 1983), e cedidos para as avaliações *in vitro* deste trabalho pela Dra. Andréa Teixeira Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ). Resumidamente, os ovos do parasito e os vermes adultos foram coletados, após seis semanas de infecção, de camundongos albinos infectados com cercarias da cepa LE do *S. mansoni*. Ovos ou vermes adultos do parasito foram triturados e ressuspensos em salina 1,7%, utilizando-se um homogeneizador com pistão de teflon (Wirtis, DTL) (30 segundos de homogeneização com intervalos de 60 segundos). O homogenato foi centrifugado a 50.000g, durante uma hora, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS durante 48h a 4°C, em seguida filtrado em filtro Millipore 0.22 μm e mantido em pequenas alíquotas (1ml) a -70 °C até o uso.

4.2.3 *Leishmania braziliensis*

O antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis* foi obtido a partir do cultivo de massa de promastigotas em meio LIT. A massa final de parasitos foi inicialmente submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente sonicada por ultrassom (Sonifier Cell Disruptor[®] - Brason Sonic Power Co. – EUA) durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo. A sonicação foi repetida por três vezes, com intervalo de 1 minuto entre as sonicações. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 3000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos cônicos de diálise (Centricon 5 kDa, Millipore, EUA), e centrifugados a 3000 g por 30 minutos. Por fim, o material remanescente foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 μm , em condições de fluxo laminar. Uma alíquota foi retirada para dosagem de proteína utilizando o biofotômetro Nanodrop N1000 (Nanodrop, EUA). Amostras do antígeno foram alíquotadas e mantidas congeladas a -70°C até o uso. O antígeno de *Leishmania* foi cedido para as avaliações *in vitro* deste trabalho pelo Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (Departamento de Parasitologia/UFMG).

4.2.4 *Candida albicans*

O antígeno de *Candida* foi obtido através do extrato de *Candida albicans* (Greer Laboratories, EUA). Esse antígeno foi cedido para as avaliações *in vitro* deste trabalho pelo Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (Departamento de Parasitologia/UFMG).

4.3 Análise *ex vivo* do fenótipo celular de linfócitos TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico

Os ensaios *ex-vivo* de imunofenotipagem dos linfócitos TCD4⁺CD25^{high} do sangue periférico dos pacientes tratados e não tratados foram realizados seguindo o protocolo descrito a seguir:

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). As células e anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras de células foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution - BD, E.U.A), por 10

minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras 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 0,015M, pH 7,4 (SIGMA, E.U.A). Em seguida, as amostras foram fixadas com 300ul de solução fixadora – Macs Facs Fix (MFF) (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2 - SIGMA, E.U.A). Após um período adicional de 15 minutos a 4°C, a análise dos parâmetros fenotípicos foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur - BD, E.U.A).

4.4 Análise do fenótipo celular, detecção de citocinas intracitoplasmáticas e expressão de Foxp3 por linfócitos TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico

As células sanguíneas dos pacientes tratados e não tratados que participaram deste estudo foram coletadas em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. Aliquotas 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 (Meio) ou na presença de antígenos solúveis epimastigotas do *T. cruzi*, apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação de cultura com estímulo específico (EPI). Para a verificação do impacto da estimulação *in vitro* com antígenos não relacionados no perfil das células T CD4⁺CD25^{high} as células do sangue periférico foram incubadas adicionalmente na presença de antígenos de *Candida Albicans* apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação (CAND); ou na presença de antígenos solúvel de ovo de *Schistosoma mansoni* apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação (SEA); ou na presença de antígenos de verme adulto de *Schistosoma mansoni* apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação (SWAP) ou na presença de antígenos de *Leishmania braziliensis* apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação (Lb).

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 incubadas 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 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 das citocinas intracitoplasmáticas e do fator de transcrição Foxp3 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 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidos da adição de 20ul de anticorpos anti-citocina, diluídos 1:20 em PBS-P ou anti-Foxp3 aos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 1 hora 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 analisados em torno de 50.000 eventos dentro da população de linfócitos totais (gate R1)

4.5 Obtenção 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) e fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP e APC. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram feitas através de um sistema de computador e o "software, Cell Quest", acoplado ao citômetro. O "Cell Quest" fornece um perfil de células de acordo com o tamanho e granulosidade.

A análise de células T CD4⁺CD25^{high} foi feita segundo protocolo proposto por Baecher-Allan e colaboradores (2001). Primeiramente foi selecionada a população de

linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (Figura 1A). Em seguida, gráficos de FL3 (CD4) versus FL4 (CD25) foram construídos para identificar a segregação da população CD4⁺ em 3 subpopulações: CD4⁺CD25^{high} (R2), CD4⁺CD25^{low} (R3) e CD4⁺CD25⁻ (R4) (Figura 1B).

O próximo passo consistiu na combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 através da fórmula G2=R1 and R2, G3=R1 and R3 e G4=R1 and R4, onde and designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2 (Figura 1C). Em seguida, os histogramas contendo as células confinadas em G2 foram utilizados para quantificar os percentuais dos seguintes marcadores, por nós definidos: CD45RA, CD45RO, CD62L, CD40L, CD69, HLA-DR, CD11a, CD18, CD54, GITR, CTLA-4, IL-10, TGF- β 1, IL-17, Granzima B e Foxp3 na população CD4⁺CD25^{high} (G2), tomando como padrão o controle isotipo para evitar reações inespecíficas.

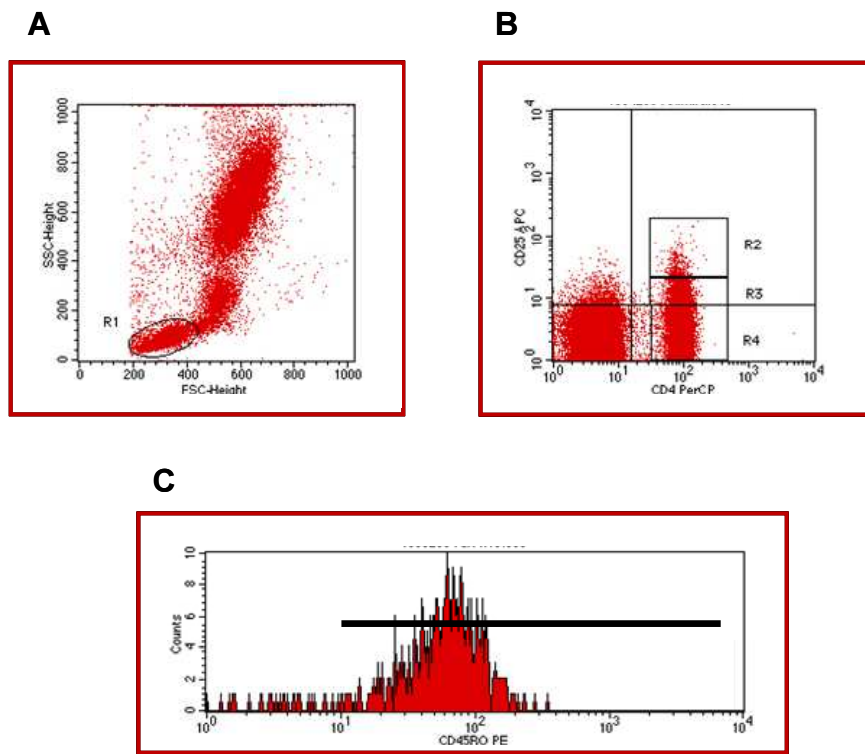


Figura 1: Análise de linfócitos TCD4⁺CD25^{high} do sangue periférico por citometria de fluxo. **(A)** Representa o perfil celular obtido no contexto *ex-vivo*, característico de gráficos de tamanho versus granulosidade. **(B)** Representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 3 (CD4 – PerCP) versus fluorescência 4 (anti-CD25 – APC), abordagem utilizada para delimitar a população celular de interesse CD4⁺CD25^{high} (R2), CD4⁺CD25^{low} (R3) e CD4⁺CD25⁻ (R4). **(C)** Representa o perfil celular obtido pelo gráfico de histograma da fluorescência 2 (CD45RO - PE), abordagem utilizada para delimitar a população de interesse CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺.

4.6 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

O sangue dos pacientes que participarem deste estudo foi coletado em tubo vacutainer estéril contendo heparina. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma mistura de Hystopaque (SIGMA), na proporção de 2:1 em tubos de 50 ml. Os tubos foram centrifugados a 400g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-6B (Beckman Instruments Inc., Irvine, USA). Ao final da centrifugação obteve-se um anel de PBMC entre o Hystopaque e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e posteriormente utilizado para os testes de sorologia convencional para a doença de Chagas. As células foram coletadas e transferidas para tubos cônicos de 50 ml onde foram lavadas 3 vezes por centrifugação 400g por 10 minutos a 4°C em meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium). Finalmente, as células foram ressuspensas em RPMI, contadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para a concentração desejada de acordo com o ensaio a ser realizado.

4.7 Purificação das células TCD4⁺CD25⁺

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas do sangue periférico dos pacientes com doença de Chagas e indivíduos NI como descrito anteriormente. Para a separação das subpopulações de células TCD4⁺ em CD4⁺CD25⁺ foi utilizado o sistema de purificação por meio de microesferas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação das células TCD4⁺CD25⁺ foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, PBMC dos pacientes foram incubadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina anti CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 e Glicoforina A e em seguida incubadas com microesferas contendo anticorpos anti-biotina. Após esse procedimento, as células CD4⁺ foram excluídas da suspensão celular pela exposição a coluna MACS apropriada a um campo magnético fornecido pelo equipamento VarioMACS (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Na segunda etapa, as células TCD4⁺CD25⁺ foram diretamente marcadas com microesferas contendo anticorpos anti-CD25 e selecionadas positivamente, após passagem pela coluna MACS apropriada. As células TCD4⁺CD25⁺ ficaram retidas na coluna e após a remoção da coluna do campo magnético foram eluídas com salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7.2, suplementada com 0,5% de albumina bovina sérica e 2 mM de EDTA. Para obtermos alta pureza, a seleção positiva da fração de células contendo

TCD4⁺CD25⁺ foi separada novamente, repetindo-se a segunda a etapa do procedimento. Desta forma, obtivemos nossa população celular de interesse: de células TCD4⁺CD25⁺ (Treg).

4.8 Atividade funcional das células TCD4⁺CD25⁺

Para avaliação da atividade supressora, as células TCD4⁺CD25⁺ foram purificadas e co-cultivadas com PBMC (1x10⁵/poço marcadas com CFSE) de pacientes portadores da doença de Chagas e de indivíduos não infectados e células TCD4⁺CD25⁺ (2,5x10⁴/poço), na ausência ou presença de antígenos derivados do *T. cruzi* em placas de 96 poços, fundo chato. Em alguns poços foram acrescentados à co-cultura anticorpos monoclonais anti-IL-10 (Clone:23738, 1,8mg/mL), anti-CTLA-4 (Clone:BNI3, 1mg/mL) ou anti-TGF- β 1 (Clone:AB100-NA, 1mg/mL) para avaliação do possível mecanismo de supressão realizado pelas células TCD4⁺CD25⁺. As culturas foram mantidas em incubadora contendo 5% de CO₂ em atmosfera úmida (Scientific, Marietta, OH, USA) a 37% durante 6 dias. Posteriormente foi realizada a avaliação da proliferação celular para análise da atividade funcional das células TCD4⁺CD25⁺.

4.9 Ensaio de proliferação celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada através da marcação com o corante CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (CFSE Cell Proliferation Kit – C34554 – Invitrogen, Molecular Probes). O CFSE consiste em uma molécula fluorescente que contém *succinimidyl ester functional group* que se difunde pelo citoplasma sem afetar as funções celulares. Durante cada ciclo de divisão celular, o fluoróforo é distribuído igualmente entre as células filhas geradas e a intensidade de fluorescência cai pela metade à medida que as células proliferam.

Para a aquisição dos dados no citômetro de fluxo e avaliação da proliferação celular, primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (Figura 2A). Em seguida, gráficos de FL1-CFSE (FITC) versus tamanho (FSC) dentro do gate de linfócitos totais (R1) foram construídos para identificar a marcação com o CFSE (Figura 2B). Posteriormente, foi construído um gate R2 para eliminação de células não marcadas com CFSE (células TCD4⁺CD25⁺). Após essa etapa, gráficos de FL1-CFSE (FITC) versus tamanho (FSC) novamente foram realizados, entretanto com combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula G1=R1 and R2, onde and designa a interseção dos eventos presentes

simultaneamente em R1 e R2 (Figura 2C). Na Figura 2C podemos notar no quadrante superior à esquerda a fluorescência do marcador CFSE caracterizando as células que apresentam proliferação celular e o quadrante superior à direita correspondem às células marcadas com CFSE, mas que não apresentam proliferação celular.

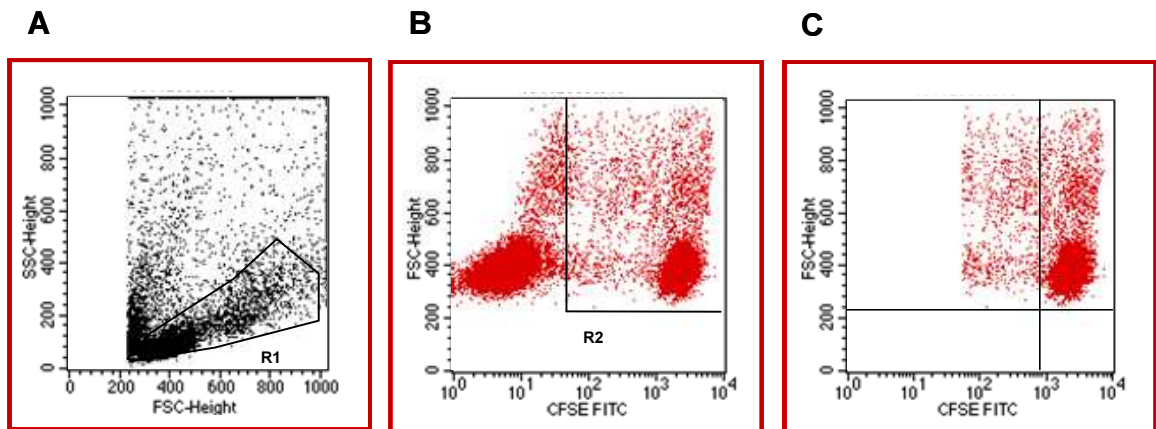


Figura 2: Análise da proliferação celular do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas e indivíduos não infectados por citometria de fluxo.

(A) Representa o perfil celular obtido na cultura característico de gráficos de tamanho versus granulosidade (B) Representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 1 (CFSE – FITC) versus tamanho (FSC), abordagem utilizada para delimitar a população celular CFSE positiva (C) Representa um perfil celular obtido em um gráfico de fluorescência 1 (CFSE – FITC) versus tamanho (FSC) utilizando-se combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula $G1=R1 \text{ and } R2$, abordagem utilizada para delimitar a população celular que se encontra em processo de divisão celular.

4.10 Cinética da expressão de Foxp3 em PBMC

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes apresentando a forma clínica IND ou CARD e de indivíduos NI foram cultivadas em placas de 24 poços na presença de meio de cultura CMBLAST (1,6% de L-glutamina; 3% de Antibiótico/Antimicótico; 5%NHS e RPMI-1640, GIBCO, E.U.A), recebendo a denominação de cultura controle (Meio) ou na presença de antígenos solúveis epimastigotas do *T. cruzi*, apresentando uma concentração final de 25ug/ml, recebendo a denominação de cultura com estímulo específico (EPI). As placas foram incubadas por tempo variável (1 a 5 dias), a 37°C e 5% CO₂. As células foram lavadas com PBS-W e incubadas por 20-30 minutos, ao abrigo da luz, com anticorpos monoclonais de superfície marcados com PercP: anti-CD4; PE: anti-CD25. Em seguida as amostras foram lavadas novamente com PBS-W por centrifugação (400g, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante de cultura desprezado. Após fixação e permeabilização com PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-Foxp3 marcados com APC, por 1 hora 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 analisados em torno de 50.000 eventos dentro da população de linfócitos totais.

4.11 Processamento dos tecidos e Imunohistoquímica para o fator de transcrição Foxp3

As amostras de tecido destinadas a imunohistoquímica foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado com tampão fosfato por 24 horas. Em seguida as amostras foram desidratadas com banhos de álcool de 10 minutos cada, em concentrações crescentes entre 70% a 100%. Após este passo as amostras foram diafanizadas com 3 banhos de 30 minutos de xilol e em seguida incluídas em parafina. Assim que os tecidos foram incluídos em blocos de parafinas, os mesmos foram levados ao micrótomo histológico para a realização de cortes de 6 µm de espessura. Após a confecção das lâminas histológicas essas permaneceram em estufa a 40°, overnight. A desparafinização das lâminas foi realizada com 3 banhos de xilol de 20 minutos cada. Em seguida as lâminas foram hidratadas em sucessivos banhos de álcool (álcool Absoluto 2X, álcool 90%, álcool 70%, álcool 50%), por 2 minutos cada. Do álcool o tecido foi direto para solução salina tampão fosfato (PBS), passando por 2

banhos de 5 minutos. O bloqueio de ligação inespecífica foi obtido com PBS contendo BSA (2%) por 30 minutos.

O anticorpo anti-Foxp3 (eBioscience, clone PCH101) foi apropriadamente diluído em PBS contendo BSA (2%), usando-se em torno de 100µl de solução já diluída por lâmina. A incubação do anticorpo foi realizada overnight. Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e incubadas com o ligante biotinilado anti-IgG2a de camundongo / anti-IgG2a de coelho do Kit DAKO (Ref. K0675) por 45 minutos e lavadas com PBS-Tween por 3 vezes, 5 minutos cada banho. Depois as lâminas foram incubadas com a estreptoavidina / peroxidase do Kit DAKO por 45 minutos e lavadas com PBS-Tween por 3 vezes, 5 minutos cada. Foi realizada a incubação com solução de di-amino-benzidina e peróxido de hidrogênio 30% em PBS por 10 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas com PBS-Tween e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. As mesmas passaram pelo processo de desidratação (álcool 50%, álcool 70%, álcool 90%, álcool absoluto 2X, xilol I, xilol II, sendo 2 minutos cada banho e 10 minutos de xilol III) e montadas em meio sintético.

4.12 Quantificação dos linfócitos Foxp3 e análise morfométrica

A quantificação de linfócitos totais Foxp3 positivos no tecido cardíaco dos pacientes IND, CARD e indivíduos não infectados foi realizada a partir de secções de tecidos submetidos à técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-Foxp3. A enumeração destas células foi realizada pela contagem de 30 campos aleatórios (Área total de 1566µm²) em um único slide por paciente, com aumento de 400x. O percentual de células Foxp3 positivas foi determinado pela relação de células mononucleares totais (morfologia dos linfócitos) e total de células Foxp3 positivas. Ambas as células (linfócitos e células Foxp3 positivas) foram contadas no mesmo campo.

O processo inflamatório foi quantificado pelo número total de células mononucleares (morfologia dos linfócitos) para determinar a intensidade do processo inflamatório. Estudos morfométricos destas células foram realizados pela análise de imagens (Kontron KS300 v. 2.0).

4.13 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 através do teste de normalidade Anderson Darling. Em seguida, 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 culturas controle ou culturas estimuladas. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$ e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prim 4.0.3 (San Diego, CA).

A análise estatística referente aos dados paramétricos foi realizada a partir do teste MANOVA, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos estudados, e verificar diferenças entre culturas controle ou culturas estimuladas. Para comparações múltiplas (determinar qual grupo obteve diferença) foi utilizado Hotelling's T-Squared Test. O nível de significância definido foi de $p < 0.05$ e todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Minitab, versão 10.1 (E.U.A).

Para análise estatística dos dados do tecido cardíaco foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA ONEWAY. Foi considerado o nível de significância de $p < 0.05$. Toda a análise estatística realizada neste trabalho foi orientada e supervisionada pela bioestatística do setor de Assessoria em Bioestatística do IRR.

5 RESULTADOS

Os dados gerados no presente estudo serão apresentados na seguinte ordem: Caracterização do perfil fenotípico das células TCD4⁺CD25^{high} e sua presença no tecido cardíaco; efeito da estimulação com antígenos não relacionados sobre o perfil das células TCD4⁺CD25^{high}, atividade funcional, cinética de expressão de Foxp3 e o efeito do tratamento com benzonidazol sobre o perfil das células TCD4⁺CD25^{high}.

5.1 Caracterização das células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

Células T reguladoras naturais expressam o marcador de superfície CD25 e o fator de transcrição Foxp3. Entretanto, a expressão de CD25 na superfície das células T não é suficiente para determinar o perfil fenotípico das células Treg, uma vez que esta molécula está presente também em outras populações de células T ativadas (Baecher-Allan et al., 2001). Para o estudo das células Treg, várias moléculas são utilizadas para caracterização de seu fenótipo regulador. Com o objetivo de caracterizar o perfil fenotípico das células TCD4⁺CD25^{high} do sangue periférico dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD foram analisadas as seguintes moléculas de superfície: CTLA-4, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD40L, CD69, GITR, as moléculas intracelulares Foxp3, Granzima B e as citocinas IL-10, TGF- β e IL-17, tanto *ex vivo* quanto após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no grupo IND em relação ao grupo NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 3B). Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação entre os grupos *ex vivo* (Figura 3A).

A avaliação da expressão da molécula de superfície CTLA-4 e da citocina intracitoplasmática IL-10 mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ no grupo CARD em relação ao grupo NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 4A). Foi observado ainda um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ no grupo IND em relação ao grupo NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Figura 4B).

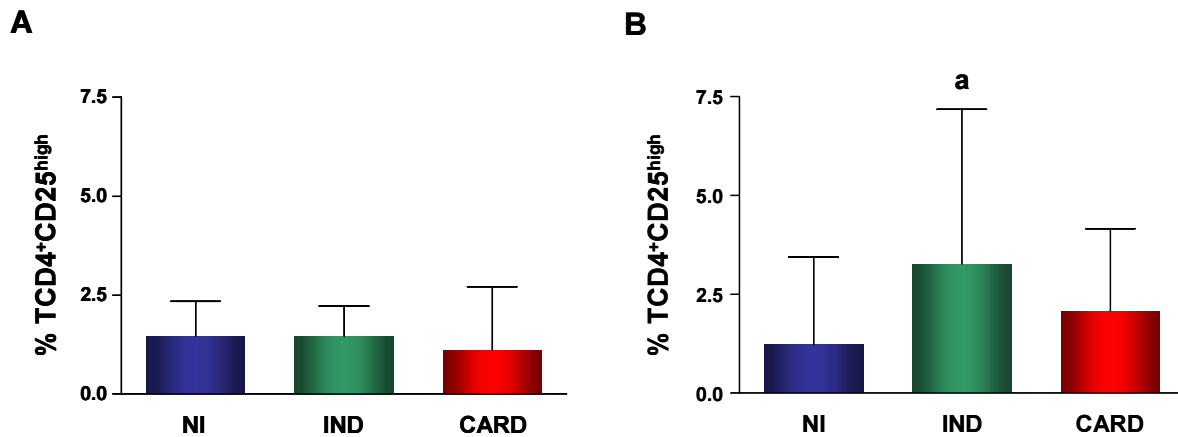


Figura 3: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD= 13). **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} *ex vivo* e **(B)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi*. Os resultados foram expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NI está representada pela letra **a**.

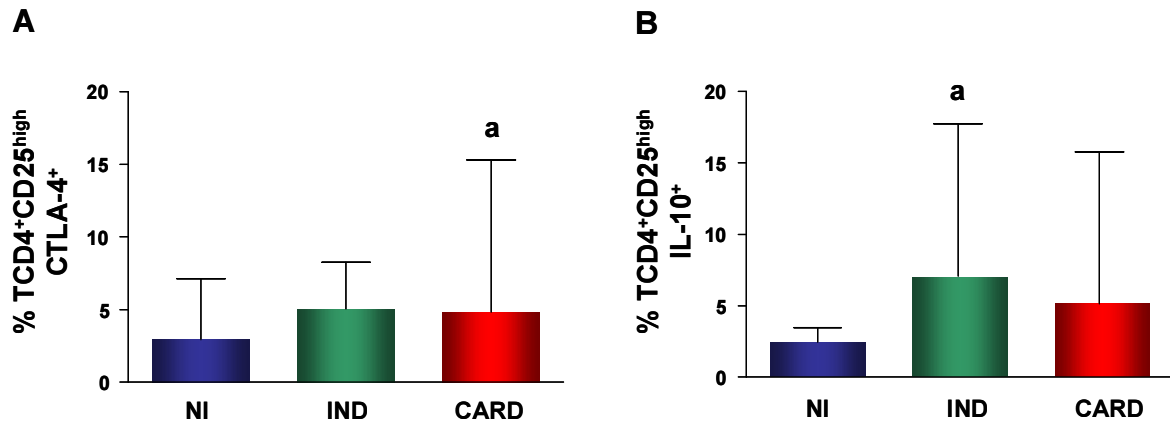


Figura 4: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) e cardíaca (CARD= 13). **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* e **(B)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi*. Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando a molécula de superfície CTLA-4 ou a citocina intracitoplasmática IL-10. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo NI está representada pela letra *a*.

A avaliação fenotípica das células TCD4⁺CD25^{high} foi feita ainda utilizando vários marcadores de superfície assim como citocinas. Esta análise é importante para a identificação mais precisa desta subpopulação celular.

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD40L⁺ e TCD4⁺CD25^{high}CD69⁺ em pacientes dos grupos IND e CARD em relação ao grupo NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Tabela 2). Observou-se também aumento significativo na expressão de CD40L e CD69 por células TCD4⁺CD25^{high} de pacientes do grupo IND e CARD após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* quando comparado a análise *ex vivo* (Tabela 2).

Recentemente alguns estudos demonstraram células TCD4⁺ são aptas a sintetizarem Granzima B e perforinas (Appay et al., 2002; Van Leeuwen et al., 2004). Além disso, Grossman e colaboradores (2004) mostraram que as células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas para mediar a supressão necessitam de Granzima A. Baseado nestes dados analisamos a presença de células TCD4⁺CD25^{high}Granzima B⁺ do sangue periférico nos grupos estudados.

A avaliação da expressão da molécula Granzima B mostrou aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}Granzima B⁺ no grupo CARD quando comparado ao grupo NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Tabela 2).

A análise dos dados não mostrou diferença significativa na expressão de CD45RA, CD45RO, HLA-DR, GITR, do fator de transcrição Foxp3 (Tabela 2) e das citocinas TGF- β e IL-17 (Tabela 2) por linfócitos TCD4⁺CD25^{high} entre os grupos estudados tanto *ex vivo* quanto após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (Tabela 2).































































| Molécula | TCD4 ⁺ CD25 ^{high} | | | | |
|--|--|--|--|-----------------|---|
| CD45RA | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 5.97  1.62 | | NI | 5.25  2.07 |
| | IND | 7.57  1.91 | | IND | 5.10  1.26 |
| | CARD | 6.56  2.15 | | CARD | 4.74  1.06 |
| CD45RO | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 90.77  2.08 | | NI | 89.88  2.45 |
| | IND | 90.37  2.39 | | IND | 88.91  2.47 |
| | CARD | 92.34  1.83 | | CARD | 90.94  1.67 |
| HLA-DR | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 14.14  1.80 | | NI | 11.77  1.33 |
| | IND | 14.05  1.44 | | IND | 14.44  2.07 |
| | CARD | 16.82  3.57 | | CARD | 15.81  2.96 |
| CD40L | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 3.02  1.52 | | NI | 5.12  1.24 |
| | IND | 5.17  2.28 | | IND | 12.34  2.17* |
| | CARD | 4.12  1.58 | | CARD | 11.08  1.83* |
| CD69 | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 0.52  0.13 | | NI | 1.47  0.38 |
| | IND | 0.86  0.19 | | IND | 36.96  3.03* |
| | CARD | 0.88  0.40 | | CARD | 26.62  4.46* |
| GITR | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 2.71  1.53 | | NI | 0.46  0.45 |
| | IND | 1.44  0.46 | | IND | 0.41  0.21 |
| | CARD | 0.88  1.59 | | CARD | 1.50  0.71 |
| Foxp3 | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 51.79  6.00 | | NI | 59.24  3.50 |
| | IND | 55.65  4.58 | | IND | 49.17  7.59 |
| | CARD | 51.42  3.24 | | CARD | 45.53  10.53 |
| Granzima B | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 0.45  0.46 | | NI | 1.45  0.72 |
| | IND | 0.73  0.48 | | IND | 7.21  3.90 |
| | CARD | 3.34  0.66 | | CARD | 13.76  8.60* |
| TGF-  | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 1.69  1.68 | | NI | 2.07  2.68 |
| | IND | 3.06  0.94 | | IND | 3.66  1.88 |
| | CARD | 3.98  1.02 | | CARD | 2.33  1.55 |
| IL-17 | <i>Ex vivo</i> | | | <i>In vitro</i> | |
| | NI | 0.80  0.49 | | NI | 0.50  0.29 |
| | IND | 1.25  0.68 | | IND | 0.27  0.12 |
| | CARD | 0.69  0.41 | | CARD | 0.62  0.34 |

Tabela 2: Análise fenotípica de células TCD4⁺CD25^{high}. Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando a molécula de interesse. A diferença estatisticamente significativa (p<0,05) em relação ao grupo NI está representada pelo símbolo *. *Ex vivo* = antes da estimulação antigênica e *In vitro* = após estimulação com antígenos do *T. cruzi*.

5.2 Caracterização das células TCD4⁺CD25^{high} com perfil migratório no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

Estudos recentes sugerem que as células T reguladoras funcionam efetivamente *in vivo*, possuem capacidade de migração e operam tanto em tecidos linfóides como não-linfóides (Campbell & Ziegler, 2007). Baseado nestes achados, as células T CD4⁺CD25^{high} de pacientes do grupo IND e CARD e indivíduos NI foram avaliadas de acordo com a expressão de moléculas de superfície com o intuito de caracterizar o perfil migratório desta subpopulação celular nestes pacientes.

CD62L é uma molécula de adesão expressa em linfócitos e sua diminuição ou ausência está associada a células ativadas (dos Santos et al., 2001). Nossos dados mostraram aumento no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD62L⁻ de pacientes chagásicos quando comparado aos indivíduos NI após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (EPI) (Figura 5A). Os dados também mostraram aumento do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD62L⁻ em pacientes dos grupos IND e CARD na cultura EPI quando comparado ao *ex vivo* (Figura 5A). Com relação à molécula de superfície CD54, caracterizada como ligante de LFA-1, a análise dos dados mostrou um aumento na intensidade média de fluorescência de células TCD4⁺CD25^{high}CD54⁺ dos grupos IND e CARD quando comparado aos indivíduos NI na cultura contendo antígenos de EPI (Figura 5B).

LFA-1 (CD11a/CD18) é o único membro da família das  integrinas expressas por células TCD4⁺CD25⁺ e possuem importante papel no tráfego e ativação celular além de propriedades de adesão (Lub et al., 1995; Berlin-Rufenach et al., 1999; Abraham et al., 1999; Abraham & Miller, 2001; Kandula & Abraham, 2004). A análise dos dados mostrou um aumento na intensidade média de fluorescência de células TCD4⁺CD25^{high}CD11a⁺ em pacientes dos grupos IND e CARD quando comparado aos indivíduos NI na cultura EPI (Figura 6A). Foi observado aumento na intensidade média de fluorescência de células TCD4⁺CD25^{high}CD18⁺ no grupo IND quando comparado aos indivíduos NI na cultura EPI (Figura 6B).

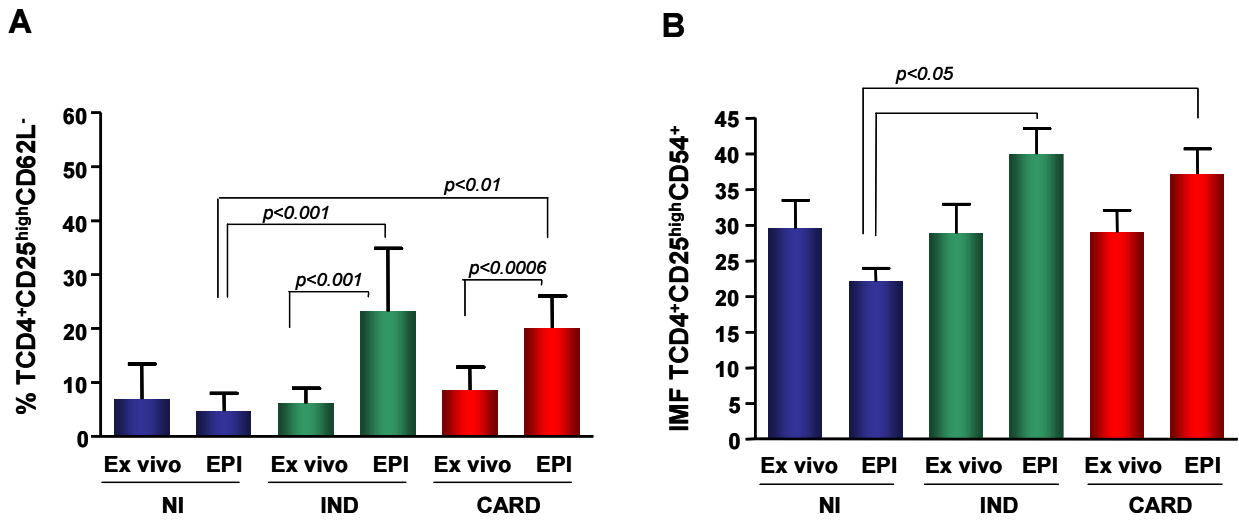


Figura 5: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD62L⁻ e TCD4⁺CD25^{high}CD54⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD= 13). **(A)** representa a mediana do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD62L⁻ *ex vivo* e após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). **(B)** representa a intensidade média de fluorescência (IMF) de células TCD4⁺CD25^{high}CD54⁺ *ex vivo* e após 22 horas de estimulação com antígenos do *T.cruzi* (EPI). A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados estão representadas pelo *p* valor.

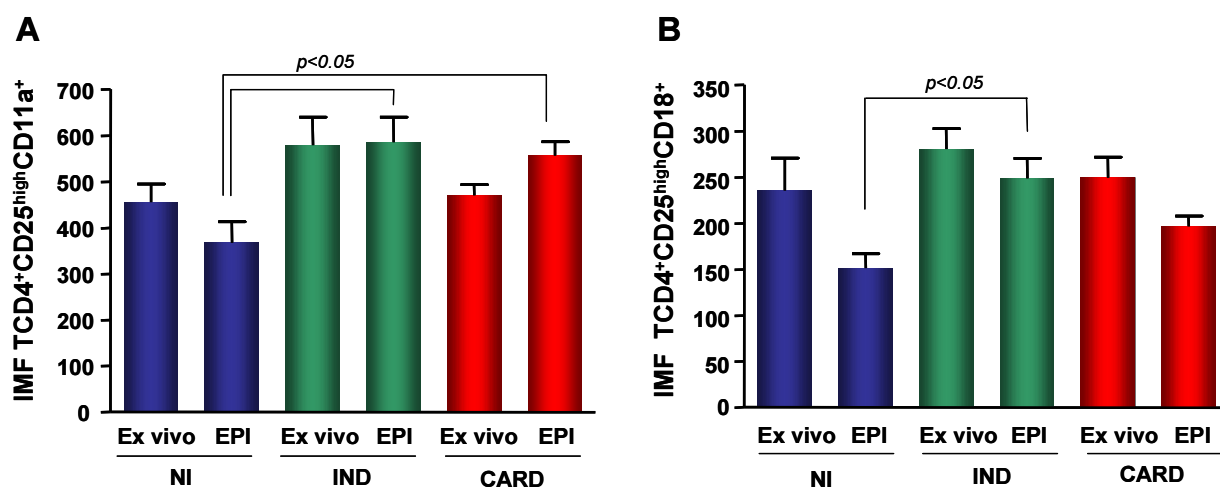


Figura 6: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD11a⁺ e TCD4⁺CD25^{high}CD18⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND=14) ou cardíaca (CARD=13). **(A)** representa a intensidade média de fluorescência de células TCD4⁺CD25^{high}CD11a⁺ *ex vivo* e após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI) **(B)** representa intensidade média de fluorescência de células TCD4⁺CD25^{high}CD18⁺ *ex vivo* e após 22 horas de estimulação com EPI. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos estudados estão representadas pelo *p* valor.

5.3 Avaliação da presença de foco inflamatório e quantificação de células Foxp3 positivas em amostras de tecido cardíaco de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

Baseado na observação de que as células $CD4^+CD25^{\text{high}}$ apresentam um perfil fenotípico de migração, nos questionamos se essas células poderiam estar presentes no tecido cardíaco. Com o objetivo de avaliarmos a possível participação de células Treg no tecido cardíaco de pacientes com doença de Chagas análises de imunohistoquímica foram realizadas para detecção de células Foxp3 positivas nos focos inflamatórios de tecidos cardíacos de pacientes apresentando as formas clínicas IND, CARD e indivíduos NI.

Os resultados demonstraram que os focos inflamatórios encontrados em tecidos cardíacos de pacientes do grupo IND e CARD são constituídos principalmente de células de morfologia mononuclear, sugerindo uma maciça participação de linfócitos (Figura 7B-C). Pacientes com a forma clínica CARD apresentaram processos inflamatórios mais numerosos e intensos (Figura 7C) em comparação aos pacientes do grupo IND (Figura 7B). Além disso, a presença de fibrose próxima aos focos inflamatórios pode ser facilmente notada nos pacientes portadores de cardiopatia grave (Figura 7C). Indivíduos não infectados não apresentam focos inflamatórios no tecido cardíaco (Figura 7A).

A análise de distribuição de linfócitos Foxp3 positivos no tecido cardíaco dos grupos estudados mostra que os mesmos estão distribuídos preferencialmente ao redor dos vasos sanguíneos, sendo raramente encontrados próximos aos focos inflamatórios (Figura 7D-E-F). A análise quantitativa destas células demonstrou um aumento significativo no percentual de células Foxp3 positivas no grupo IND em relação aos indivíduos NI (Figura 7G) Estes resultados sugerem que células Foxp3 positivas estão presentes no tecido cardíaco e, portanto, podem modular a resposta inflamatória no tecido durante a fase crônica da doença de Chagas.

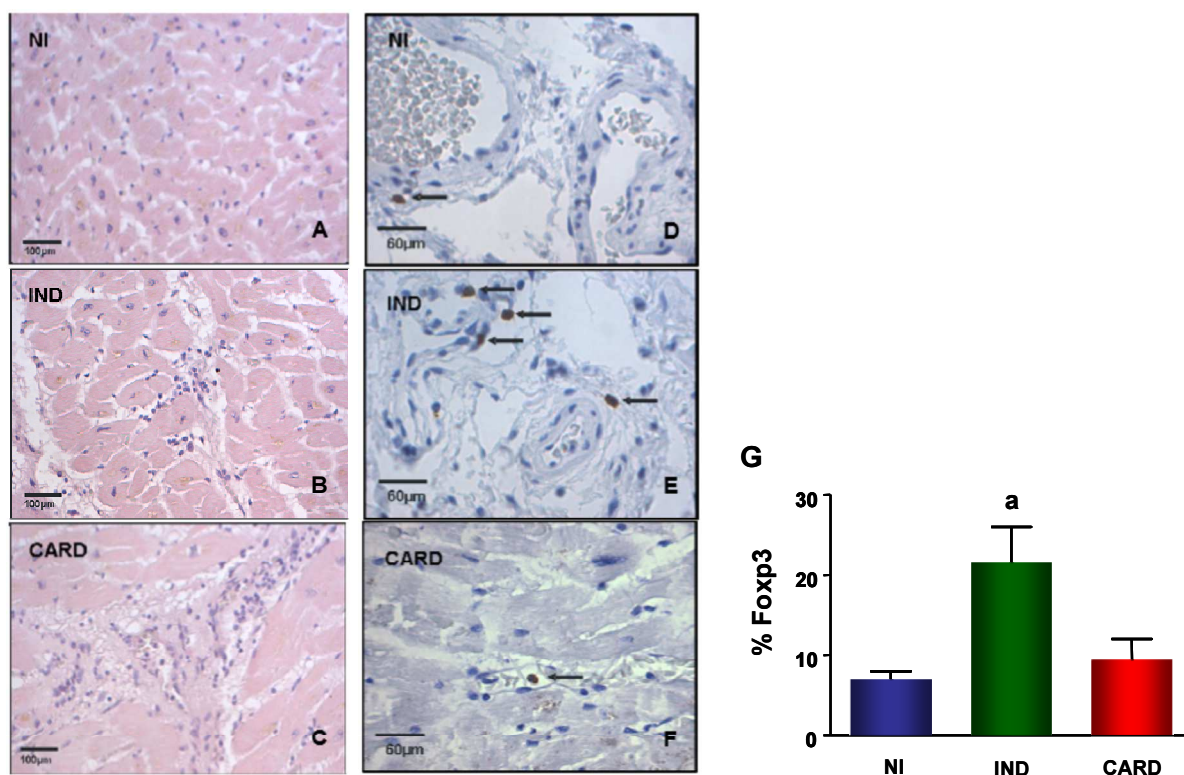


Figura 7- Análise do foco inflamatório e quantificação de células Fcpx3 positivas no tecido cardíaco. A primeira coluna representa a análise do foco inflamatório e a segunda coluna representa as células Fcpx3 positivas de (A-D) indivíduos não infectados (NI=3), (B-E) pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND=4) e (C-F) pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD= 3). (G) representa a análise quantitativa de células Fcpx3 positivas. A quantificação foi determinada pela média de linfócitos positivos para este marcador como descrito em Material e Métodos. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos IND e NI estão representadas pela letra *a*. As setas indicadas na figura representam células Fcpx3 positivas.

5.4 Verificação do efeito da estimulação *in vitro* com antígenos não relacionados sobre o perfil das células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

Estudos envolvendo a depleção ou transferência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ têm mostrado evidências de que as células Treg podem influenciar a resposta imune contra patógenos e no efeito das doenças infecciosas (Mills, 2004). Entretanto evidências de que células Treg são antígeno-específicas ainda são limitadas. Alguns estudos em modelos experimentais ainda demonstram que uma vez ativada, a função supressora das células Treg CD4⁺CD25⁺ são antígeno não-específicas (Thornton & Shevach, 2000).

Baseado nestes dados, a caracterização do perfil fenotípico das células TCD4⁺CD25^{high}, na presença de diferentes estímulos antigênicos para determinar a especificidade dessas células seria apropriado no presente trabalho. Para alcançar esse objetivo, as células TCD4⁺CD25^{high} de indivíduos NI e pacientes do grupo IND e CARD foram estimuladas por antígenos solúveis do *T. cruzi* (EPI); antígenos de *Candida Albicans* (CAND); antígenos solúveis de ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA); antígenos de verme adulto de *Schistosoma mansoni* (SWAP) ou antígenos de *Leishmania braziliensis* (*Lb*) e posteriormente avaliado o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} co-expressando o fator de transcrição Foxp3; as citocinas intracitoplasmáticas TGF- β e IL-17; a molécula Granzima B e a molécula de superfície GITR.

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} nos grupos IND e CARD na cultura EPI em relação às culturas SEA e SWAP (Figura 8B-C). A análise dos dados também demonstrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no grupo IND na cultura CAND em relação à SEA (Figura 8B) Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação entre os estímulos no grupo NI (Figura 8A).

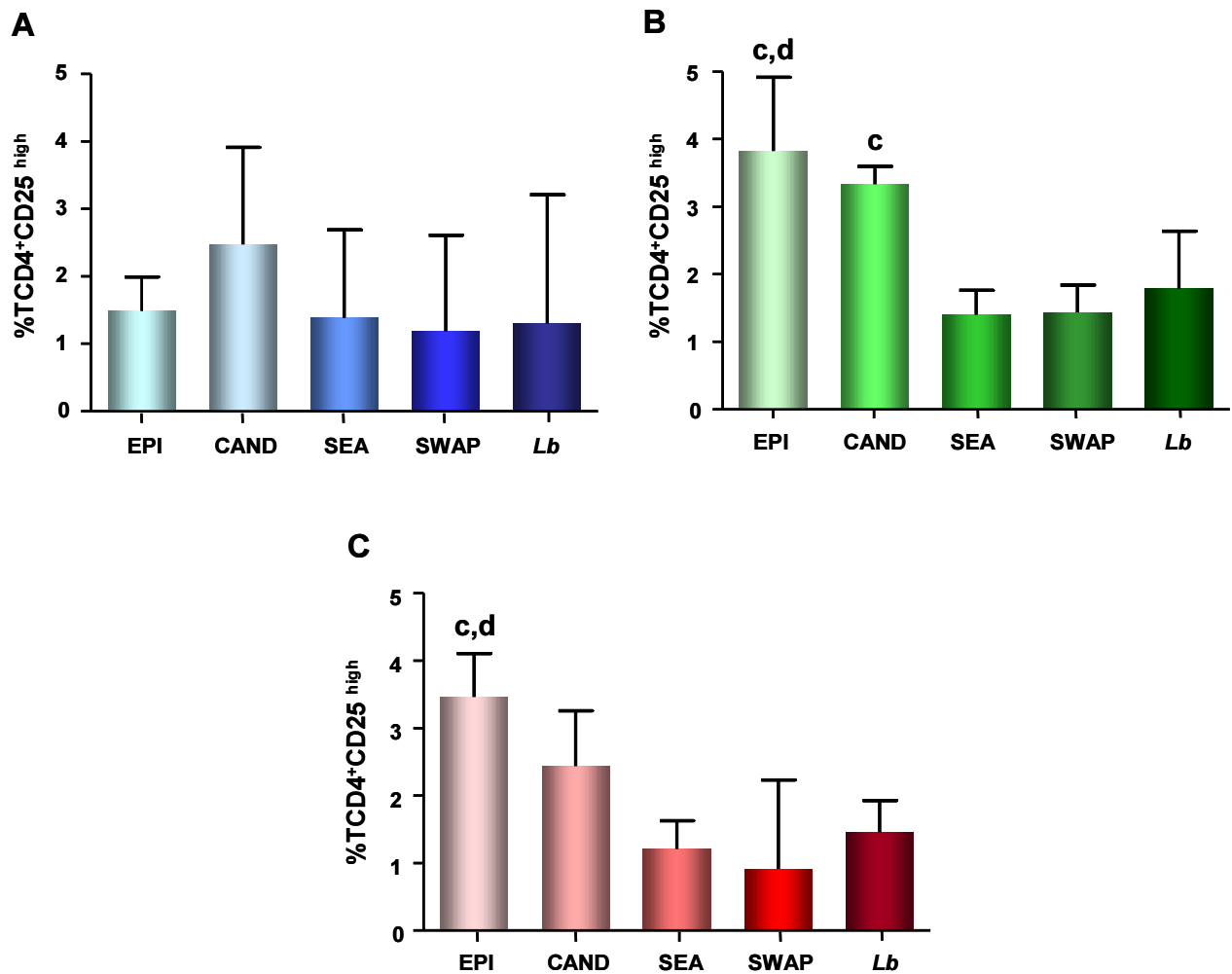


Figura 8: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico após 22 horas de estimulação com antígenos não relacionados. **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} de indivíduos não infectados (NI=5) **(B)** pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND=6) e **(C)** pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=6). **EPI** representa a resposta após estimulação com antígenos do *T. cruzi*; **CAND** com antígenos de *Candida Albicans*; **SEA** com antígenos solúveis de ovo de *Schistosoma mansoni*; **SWAP** com antígenos de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e **Lb** com antígenos de *Leishmania braziliensis*. Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 da cultura estimulada dividido pela cultura controle (INDEX). As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação à cultura EPI quando comparada às culturas SEA e SWAP estão representadas pelas letras *c* e *d*, respectivamente.

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}Granzima B⁺ nos grupos IND e CARD na cultura EPI em relação às culturas SEA e SWAP (Tabela 3). A análise dos dados também demonstrou aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}Granzima B⁺ no grupo IND na cultura EPI em relação à cultura Meio (Tabela 3). Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação entre os estímulos no grupo NI (Tabela 3).

A avaliação da expressão da molécula de superfície GITR mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}GITR⁺ no grupo IND na cultura SEA em relação a cultura EPI (Tabela 3). Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação entre os estímulos no grupo NI e CARD (Tabela 3).


Nenhuma diferença significativa no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} positivas para o fator de transcrição Foxp3 e para as citocinas intracitoplasmáticas TGF- β e IL-17 foi observada entre os estímulos estudados (Tabela 3).

| Molécula | Forma Clínica | Meio | EPI | CAND | SEA | SWAP | Lb |
|-------------------------------|---------------|-------------------|---------------------|-------------|-------------------|-------------------|--------------|
| Foxp3 | NI | 51,79± 6,00 | 59,24± 5,50 | 53,33± 3,29 | 53,00± 2,33 | 45,45± 9,12 | 43,86± 5,79 |
| | IND | 55,65± 14,58 | 49,17± 7,59 | 54,89± 3,88 | 57,33± 4,54 | 56,85± 8,95 | 57,71± 6,53 |
| | CARD | 51,42± 5,24 | 45,53± 10,53 | 54,23± 5,30 | 41,17± 7,56 | 49,57± 8,10 | 52,12± 10,77 |
| TGF-β | NI | 1,69± 1,68 | 2,07± 2,68 | 2,73± 3,90 | 1,61± 1,41 | 1,56± 1,49 | 1,52± 0,88 |
| | IND | 3,06± 0,94 | 3,66± 1,88 | 2,67± 1,03 | 2,17± 1,38 | 1,77± 1,53 | 2,50± 1,57 |
| | CARD | 3,98± 1,02 | 2,33± 1,55 | 2,15± 0,68 | 3,47± 1,10 | 2,64± 1,30 | 3,21± 1,68 |
| IL-17 | NI | 0,80± 0,49 | 0,50± 0,29 | 1,35± 0,46 | 0,70± 1,71 | 0,46± 0,49 | 0,06± 0,15 |
| | IND | 1,25± 0,68 | 0,27± 0,12 | 0,91± 0,71 | 0,75± 0,15 | 0,20± 0,23 | 0,83± 0,58 |
| | CARD | 0,69± 0,41 | 0,62± 0,34 | 1,01± 0,67 | 1,40± 0,91 | 0,78± 0,62 | 0,47± 0,23 |
| Granzima B | NI | 0,45± 0,76 | 1,45± 0,72 | 6,56± 4,81 | 0,77± 0,76 | 1,28± 0,71 | 0,48± 2,18 |
| | IND | 0,73± 0,48 | 7,21± 3,90 | 5,07± 0,83 | 0,81± 0,53 | 1,09± 0,66 | 1,59± 3,10 |
| | CARD | 3,34± 0,66 | 13,76± 8,60* | 3,32± 1,60 | 1,93± 1,89 | 1,45± 1,00 | 4,30± 2,14 |
| GITR | NI | 2,71± 1,53 | 0,46± 0,45 | 3,05± 1,79 | 0,90± 0,85 | 0,92± 0,95 | 0,62± 0,38 |
| | IND | 1,44± 0,46 | 0,41± 0,21 | 1,98± 0,64 | 2,15± 1,72 | 1,10± 0,90 | 0,87± 0,35 |
| | CARD | 0,88± 1,59 | 1,50± 0,71 | 2,33± 1,62 | 1,74± 1,47 | 1,23± 1,31 | 1,34± 0,51 |

Tabela 3: Análise do percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=5); pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND=6) ou cardíaca (CARD=6). **Meio** representa a cultura na ausência de estímulo; **EPI** representa cultura após estimulação com antígenos do *T. cruzi*; **CAND** a cultura estimulada com antígenos de *Candida Albicans*; **SEA** a cultura estimulada com antígenos solúveis de ovo de *Schistosoma mansoni*; **SWAP** a cultura estimulada com antígenos de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e **Lb** a cultura com antígenos de *Leishmania braziliensis*. Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando os marcadores indicados na tabela. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação às culturas EPI quando comparada às culturas Meio, SEA e SWAP estão representadas pelos números em negrito. A diferença estatisticamente significativa (p<0,05) em relação ao grupo NI está representada pelo símbolo *.

5.5 Avaliação da atividade funcional das células TCD4⁺CD25⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

As células TCD4⁺CD25⁺, denominadas reguladoras, possuem função crítica na modulação de doenças autoimunes, porém os mecanismos de ação induzidos por essas células que efetivamente inibem a proliferação de células efetoras permanece desconhecido (Baecher-Allan et al., 2001). Com o objetivo de avaliar a atividade funcional das células TCD4⁺CD25⁺ analisamos a proliferação celular de co-culturas de células efetoras e reguladoras no sangue periférico dos indivíduos NI e dos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD. A análise dos dados referente ao percentual de células em proliferação (CFSE positivas) foi obtida através da cultura experimental (EPI) dividido pela cultura controle (INDEX).

A análise dos dados não mostrou nenhuma diferença significativa, entretanto, pode-se observar uma tendência de diminuição da proliferação celular na presença de células TCD4⁺CD25⁺ nas culturas de PBMC em pacientes dos grupos IND e CARD (Figura 9B-C). Essa diminuição se manteve nestes grupos mesmo quando adicionado a co-cultura bloqueadores para as citocinas IL-10 e TGF- para a molécula de superfície CTLA-4 (Figura 9B-C). Nenhuma diferença na proliferação celular no grupo NI foi observada entre as diferentes co-culturas (Figura 9A).

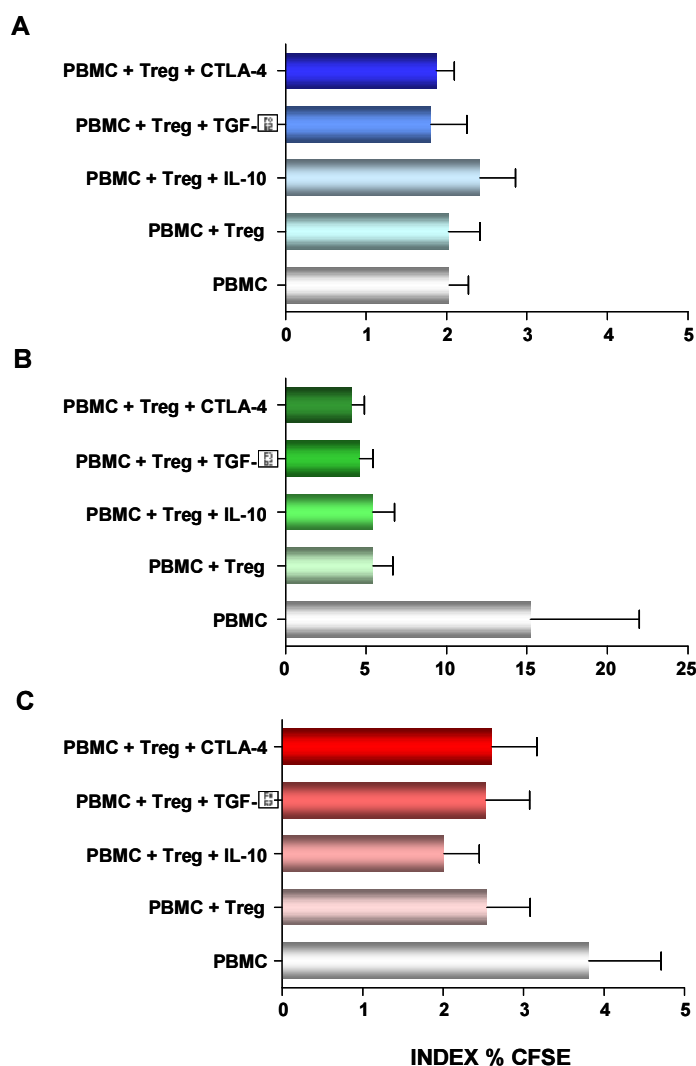


Figura 9: Avaliação da proliferação celular para análise da atividade funcional das células TCD4⁺CD25⁺ no sangue periférico **(A)** Indivíduos não infectados (NI=5), **(B)** pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND=6) ou **(C)** Cardíaca (CARD=6). Foram realizadas as seguintes culturas: Cultura de PBMC (1×10^5 células/poço). Co-cultura de PBMC (1×10^5 células/poço) + TCD4⁺CD25⁺ ($2,5 \times 10^4$ células/poço). Co-cultura de PBMC (1×10^5 células/poço) + TCD4⁺CD25⁺ ($2,5 \times 10^4$ células/poço) + anticorpo anti-IL10. Co-cultura de PBMC (1×10^5 células/poço) + TCD4⁺CD25⁺ ($2,5 \times 10^4$ células/poço) + anticorpo anti-TGF- β . Co-cultura de PBMC (1×10^5 células/poço) + TCD4⁺CD25⁺ ($2,5 \times 10^4$ células/poço) + anticorpo anti-CTLA-4. Os resultados estão expressos em INDEX (Cultura EPI : Cultura Controle) de células positivas para o fluoróforo CFSE.

5.6 Determinação da cinética de Intensidade Média de Fluorescência do fator de transcrição Foxp3 por células TCD4⁺CD25^{high} nas culturas de PBMCs de indivíduos não infectados, pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada ou cardíaca

A importância do Foxp3 no desenvolvimento e função das células Treg está bem estabelecida. Já foi descrito que células TCD4⁺CD25⁺ que expressam Foxp3 possuem função supressora (Fontenot et al., 2003) e deixam claro que a expressão do Foxp3 tem efeito marcante na função das células Treg, tanto bioquimicamente quanto em níveis celulares. Além disso, estudos adicionais sugerem que Foxp3 é um marcador molecular específico para caracterizar as células Treg (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Hori et al., 2004).

A determinação da Intensidade Média de Fluorescência (IMF) do fator de transcrição Foxp3 por células TCD4⁺CD25^{high} foi realizada em amostras de PBMC de indivíduos NI, pacientes apresentando as formas clínicas IND ou CARD na ausência de estímulo (Meio) ou após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* (EPI)(Figura 10). Os resultados foram avaliados por IMF devido a evidências anteriores demonstrando que não apenas a presença de Foxp3 é importante para a função das células Treg, mas também o nível de expressão dessa molécula é crucial (Campbell & Ziegler, 2007).

A análise dos dados mostrou uma diminuição significativa na IMF de Foxp3 por células TCD4⁺CD25^{high} no grupo CARD em relação ao grupo NI, a partir do 4 dia de cultura, tanto na cultura Meio quanto na cultura EPI (Figura 10A-B). Foi observada também diferença significativa na IMF de Foxp3 por células TCD4⁺CD25^{high} dos grupos NI e IND na cultura Meio em relação à cultura EPI (Figura 11A-B). Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação do grupo CARD em relação à cultura Meio e EPI (Figura 11C).

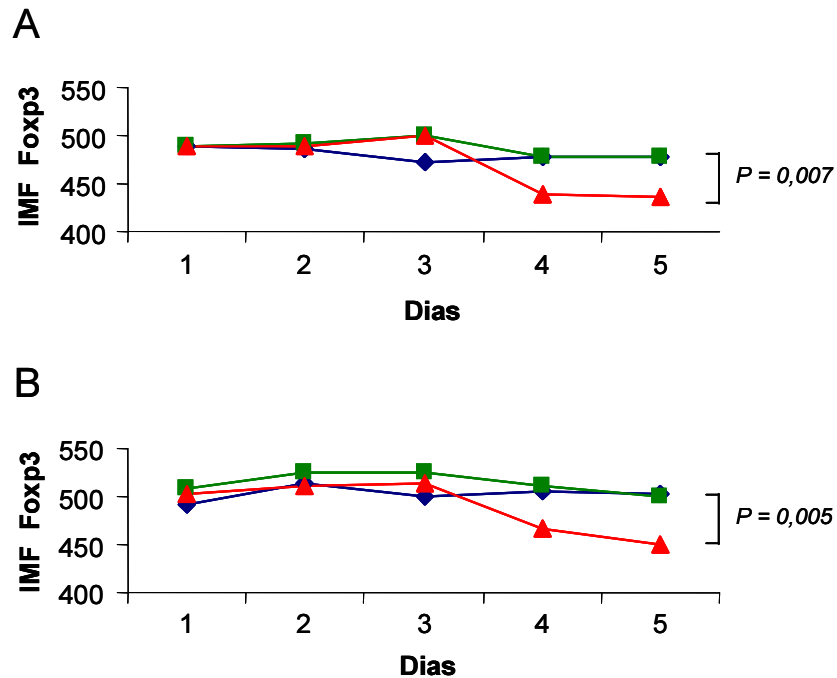


Figura 10: Cinética da intensidade média de fluorescência do fator de transcrição Fxp3 por células $TCD4^+CD25^{high}$ nas culturas de PBMC dos grupos estudados. Indivíduos não infectados (NI◆=7), pacientes apresentando as formas clínicas indeterminada (IND■=8) ou cardíaca (CARD▲= 5). **(A)** representa a média da IMF de Fxp3 por células $TCD4^+CD25^{high}$ na ausência de estímulo (Meio) e **(B)** representa a média da IMF de Fxp3 por células $TCD4^+CD25^{high}$ após estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). O eixo x representa os dias de cultura em que foram realizadas as marcações para avaliação do fator de transcrição Fxp3. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos CARD e NI estão representadas pelo *p* valor.

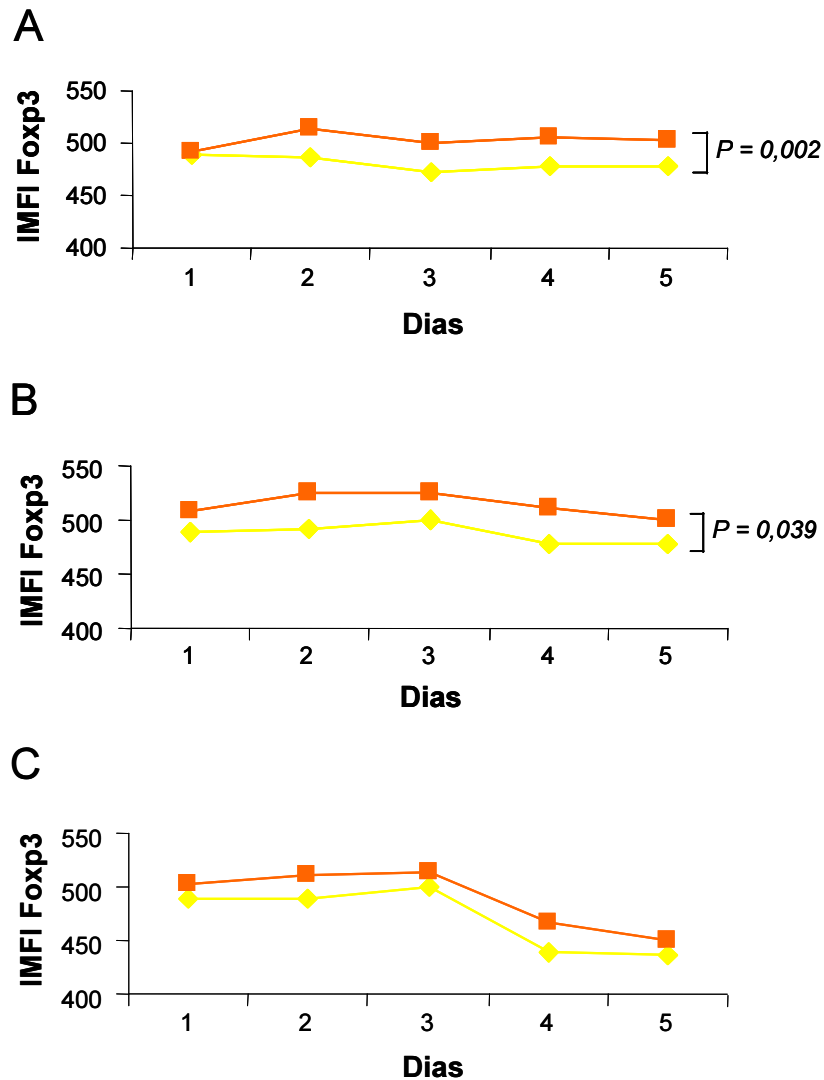


Figura 11: Cinética da intensidade média de fluorescência do fator de transcrição Foxp3 por células $CD4^+CD25^{high}$ nas culturas de PBMC dos grupos estudados **(A)** de indivíduos não infectados (NI= 7), **(B)** de pacientes apresentando a forma clínica indeterminada (IND= 8) ou **(C)** cardíaca (CARD= 5). (♦) representa a média da IMF de Foxp3 por células $CD4^+CD25^{high}$ na ausência de estímulo (Meio) e (■) representa a média da IMF de Foxp3 por células $CD4^+CD25^{high}$ após estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). O eixo x representa os dias de cultura em que foram realizadas as marcações para avaliação do fator de transcrição Foxp3. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as culturas Meio e EPI estão representadas pelo *p* valor.

5.7 Análise da expressão do fator de transcrição Foxp3 e dos marcadores de superfície CD45RO, CTLA-4 por células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de pacientes CARD após tratamento específico

Embora o tratamento da doença de Chagas na fase aguda seja capaz de curar cerca de 50-70% dos casos (Rassi et al., 2000), na fase crônica, a sua indicação é ainda restrita aos indivíduos portadores da forma clínica IND recente (Galvão et al., 1993). Um estudo multicêntrico internacional vem sendo realizado visando avaliar o impacto da terapêutica com benzonidazol em pacientes portadores da forma clínica CARD. A instituição desse protocolo terapêutico abriu novas perspectivas de avaliações acerca dos mecanismos imunológicos associados à infecção pelo *T. cruzi* (Marin-Neto et al., 2009).

Com o intuito de ampliar a nossa compreensão sobre os mecanismos imunorreguladores avaliamos o efeito do tratamento com benzonidazol sobre o perfil de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico de pacientes apresentando a forma clínica CARD da doença de Chagas.

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no grupo cardíaco tratado (CARD T) em relação ao grupo CARD *ex vivo* (Figura 12A). A avaliação da cultura EPI mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no grupo CARD T quando comparado aos indivíduos NI (Figura 12B). A avaliação do fator de transcrição Foxp3 não mostrou diferença significativa no percentual de células T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ entre os grupos estudados *ex vivo* e em cultura estimulada com EPI (Figura 12C-D).

Com relação à molécula de superfície CD45RO a análise mostrou diminuição significativa no percentual de células T CD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ no grupo CARD T em relação aos outros grupos estudados tanto *ex vivo* quanto na cultura contendo EPI (Figura 13A-B). A avaliação da molécula CTLA-4 demonstrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ nos grupos CARD e CARD T em relação ao grupo NI na cultura EPI (Figura 13D). Não foi observada nenhuma diferença significativa na avaliação entre os grupos *ex vivo* (Figura 13C).

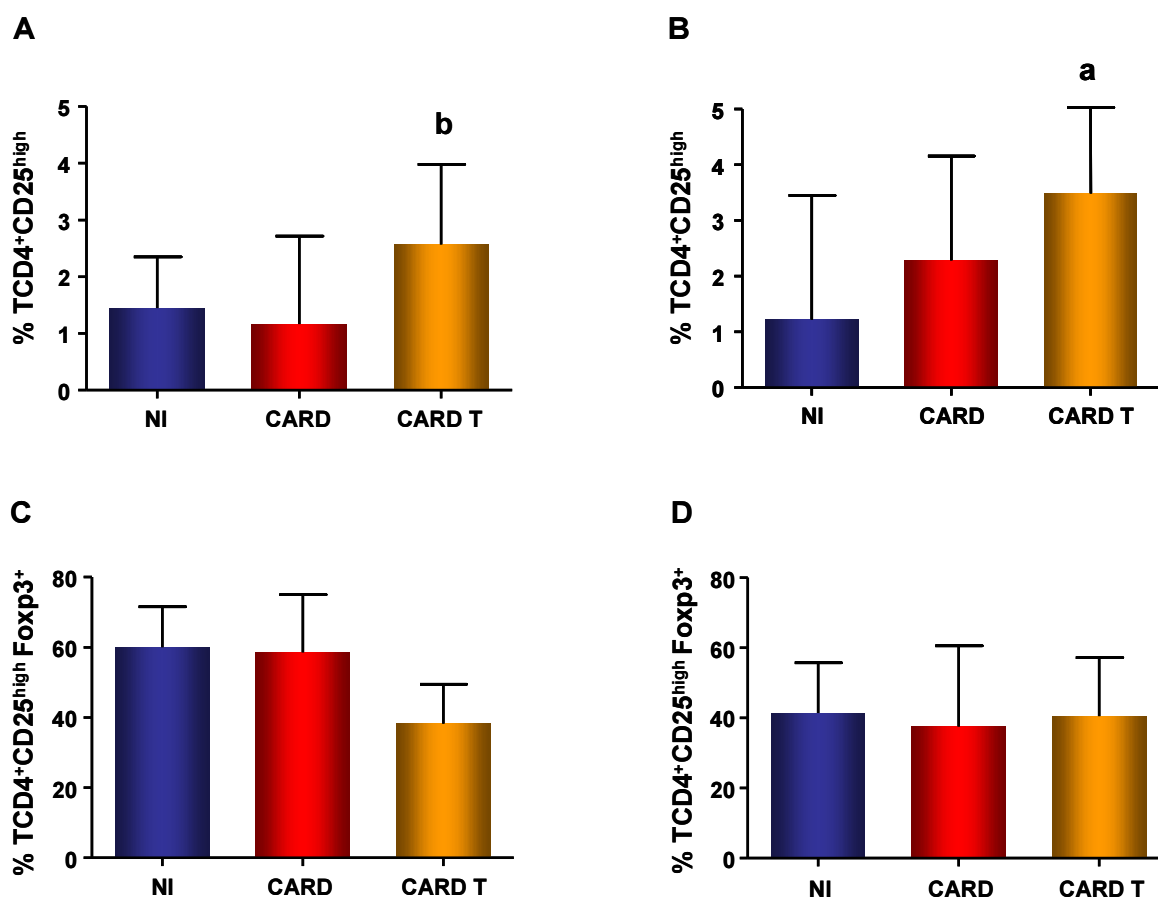


Figura 12: Avaliação de células T CD4⁺CD25^{high} e do fator de transcrição Foxp3 no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7). **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} *ex vivo*. **(B)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). **(C)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ *ex vivo*. **(D)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando o fator de transcrição Foxp3. As diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) em relação aos grupos NI e CARD estão representadas pelas letras **a** e **b**, respectivamente.

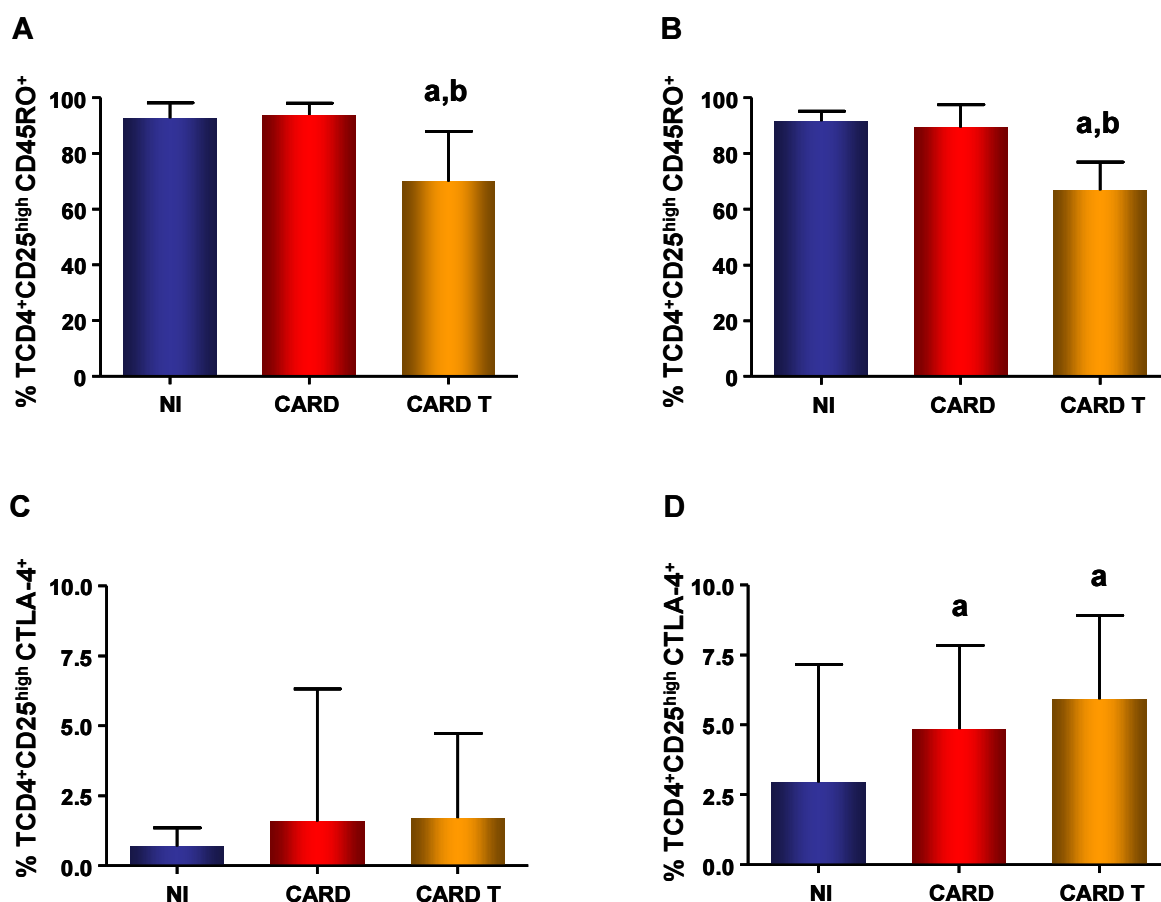


Figura13: Avaliação de células TCD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ e TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou a forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7). **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ *ex vivo*. **(B)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CD45RO⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). **(C)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ *ex vivo*. **(D)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando CD45RO ou CTLA-4. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos NI e CARD estão representadas pelas letras *a* e *b* respectivamente.

5.8 Análise no perfil de citocinas intracitoplasmáticas em células TCD4⁺CD25^{high} do sangue periférico de pacientes CARD após tratamento específico

A análise dos dados mostrou um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IFN- γ no grupo CARD em relação ao grupo NI na cultura EPI (Figura 14A). A avaliação do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ mostrou uma diminuição do percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ no grupo CARD T em relação ao grupo CARD na cultura EPI (Figura 14B).

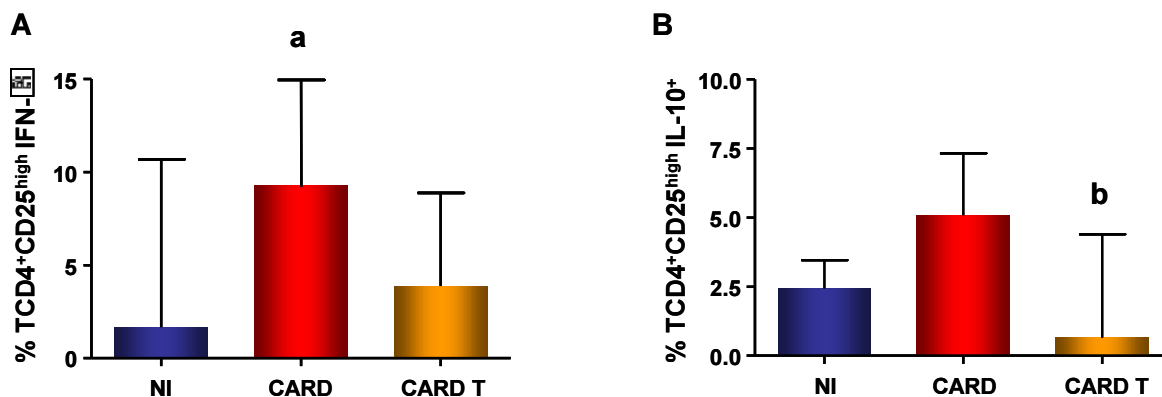


Figura 14: Avaliação de células TCD4⁺CD25^{high}IFN- γ e TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ no sangue periférico de indivíduos não infectados (NI=11), pacientes apresentando a forma clínica cardíaca (CARD=13) ou a forma clínica cardíaca tratados (CARD T=7). **(A)** representa o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IFN- γ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). **(B)** o percentual de células TCD4⁺CD25^{high}IL-10⁺ após 22 horas de estimulação com antígenos do *T. cruzi* (EPI). Os resultados estão expressos como mediana do percentual de células positivas para o marcador CD25 co-expressando IFN- γ ou IL-10. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos NI e CARD estão representadas pelas letras **a** e **b** respectivamente.

6 DISCUSSÃO

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 hospedeiro. 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 resposta imune inicial durante a infecção humana pelo *T. cruzi* (aguda recente, aguda tardia e crônica recente) não é completamente entendida, apesar da sua função crucial no direcionamento das diferentes formas clínicas da infecção crônica. Estudos demonstram que o *T. cruzi* induz uma forte ativação do sistema imune durante a infecção aguda e que os diferentes mecanismos imunes induzidos durante os estágios iniciais da fase crônica da infecção representam componentes essenciais da atividade imune presente na fase crônica tardia (Andrade, 1991; Brener & Gazzinelli, 1997; Marinho et al., 1999; Sathler-Avelar et al., 2003; Golgher & Gazzinelli, 2004). De fato, a infecção pelo *T. cruzi* causa alterações no sistema imune, como a ativação policlonal e a imunossupressão (Minoprio et al., 1986, 1987; D'imperio Lima et al., 1986) verificada na fase aguda, podendo assim alterar os processos de regulação.

A resposta imune contra diferentes patógenos pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, porém esses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. Recentemente tem-se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante infecções virais crônicas, bacterianas e fúngicas (Mills, 2004). A identificação de células T $CD4^+CD25^+$ e seu papel tem sido objeto de intenso estudo devido ao papel crítico dessas células na manutenção da autotolerância, bem como na defesa contra patógenos. Vários marcadores tem sido estudados para melhor caracterizar as células T reguladoras $CD4^+CD25^+$, dentre eles estão CD62L, CTLA-4 e o fator repressor de transcrição Foxp3 (forkhead box P3) (Powrie et al., 1996, Fontenot et al., 2003).

A regulação da resposta imune por células T reguladoras *in vivo* é um processo complexo envolvendo múltiplos subtipos de células Treg que parecem usar um único mecanismo para suprimir a ativação, diferenciação e função das células T efetoras dentro dos tecidos linfóides e não linfóides (Sather et al., 2007). Os mecanismos de supressão utilizados pelas células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ ainda não estão bem esclarecidos. Alguns autores

defendem a hipótese de que as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ suprimem células efetoras através do contato celular pela molécula CTLA-4 e mostram que o bloqueio de CTLA-4 inibe a função supressora das Treg (Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Maloy & Powrie, 2001; Annunziato et al., 2002; Battaglia et al., 2002). Adicionalmente, estudos demonstram que o mecanismo de supressão das células TCD4⁺CD25^{high} parece ser independente de citocinas inibidoras como IL-10 e TGF- β (Baecher-Allan et al., 2001; Jonuleit et al., 2002; Battaglia et al., 2002; Viglietta et al., 2004). Por outro lado, outros autores defendem a hipótese de que IL-10 e TGF- β também podem estar envolvidos no efeito supressor *in vivo* das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Hara et al., 2001; Liu et al., 2003).

Apesar de não existirem evidências para a função efetora dessa população celular na doença de Chagas, nossos resultados demonstraram que pacientes apresentando a forma clínica IND apresentam um aumento significativo no percentual de células T CD4⁺CD25^{high} expressando Foxp3 e IL-10 (Figura 3B-4B). Esses resultados sugerem que essas células podem estar envolvidas no controle da morbidade da doença de Chagas (Araújo et al., 2007), bem como no desenvolvimento do processo inflamatório. Como descrito previamente por Gomes e colaboradores (2003), a citocina IL-10 possui papel chave na regulação da resposta inflamatória na infecção

Nosso grupo também demonstrou percentuais elevados de células TCD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ nos pacientes portadores da forma clínica CARD (Figura 4A). A expressão da molécula de superfície CTLA-4 é constitutiva nas células T reguladoras (Fontenot et al., 2003; Takahashi et al., 2000) e sugerem que esta molécula pode ser funcionalmente importante. Entretanto, as células T CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ dos pacientes do grupo CARD podem não ser suficientes para controlar o desenvolvimento do processo inflamatório ou podem estar suprimindo a resposta imune protetora contra o patógeno. Além disso, a análise da expressão da molécula Granzima B intracitoplasmática demonstrou um aumento no percentual de células TCD4⁺CD25^{high}Granzima B⁺ no grupo CARD (Tabela 2). A molécula granzima B é uma serino protease, cujos substratos apresentam especificidade similar à da família das caspases (Darmon et al., 1999). De fato, Granzima B pode ativar diretamente caspase 3 induzindo apoptose sob múltiplos pontos da via dependente de caspase (Barry et al., 2000; Atkinson et al., 1998). Baseado nestes dados pode-se sugerir a possibilidade de auto citotoxicidade das células Treg, explicando o percentual diminuído de células Treg no grupo CARD e conseqüentemente sua limitação da regulação nestes pacientes.

Grossman e colaboradores (2004) têm demonstrado que células TCD4⁺CD25⁺ reguladoras medeiam a supressão com requerimento de Granzima A e perforinas. Outros


estudos têm re-examinado a apoptose de células T efetoras por células T reguladoras como um mecanismo de supressão da resposta imune (Grossman et al., 2004; Dai et al., 2004). Além disso, recentes estudos reportam que células TCD4⁺ humanas também estão aptas a sintetizar Granzima B (Appay et al., 2002; Van Leeuwen et al., 2004) e que esta molécula é largamente responsável pela indução de apoptose de células alvo. Gondek e colaboradores (2005) demonstram que imediatamente após ativação de células Treg, Granzima B é rapidamente expressa por estas células, sugerindo que esta serino protease possui papel importante na capacidade supressora das células Treg murinas mediando a apoptose. Múltiplos fatores estão envolvidos na supressão de células Treg e a apoptose pode ser um deles. Baseado nestes dados, podemos sugerir também que o aumento de células TCD4⁺CD25^{high} Granzima B⁺ no sangue periférico dos pacientes do grupo CARD poderiam estar induzindo elevação da apoptose de células efetoras, o que conseqüentemente ocasionaria um desequilíbrio da resposta imune e possível dano tecidual nestes pacientes, favorecendo o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica. De fato, autores descrevem que defeitos na regulação da apoptose podem levar ao desenvolvimento de doenças (Rudin & Thompson, 1997). Essa hipótese pode ser reforçada através dos dados obtidos pelo nosso laboratório, onde foi observado que pacientes do grupo CARD possuem maior índice de apoptose de linfócitos T em relação aos outros grupos estudados (Chaves, 2009 – dados não publicados). Em adição, apoptose pode ser identificada em cardiomiócitos e células inflamatórias no tecido cardíaco de pacientes chagásicos e associadas à falência cardíaca (Tostes et al., 2005).

A falta de uma resposta adequada das células Treg nos pacientes do grupo CARD associada a outros mecanismos reguladores descontrolados podem esclarecer a exacerbação da resposta imune e forte resposta de células TCD8⁺ citotóxicas observada nestes pacientes. Corroborando a este fato, alguns autores observaram correlação positiva de células TCD4⁺CD28⁻ e das citocinas IL-10 e TNF- α sugerindo um balanço destas citocinas nos pacientes do grupo IND, enquanto que em pacientes CARD foi observada uma correlação positiva entre células TCD4⁺CD28⁻ e da citocina inflamatória TNF- α . Estes dados sugerem a predominância de uma função inflamatória nestes pacientes, 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).

Devido ao fato de poucos trabalhos correlacionarem os aspectos imunorreguladores envolvidos no controle e/ou desenvolvimento da miocardiopatia da doença de Chagas, nos propusemos a estudar um dos possíveis mecanismos imunorreguladores (Treg) existentes, com o objetivo de contribuir para o melhor entendimento dos processos envolvidos na resposta imune da doença.

O controle exercido pelas células T reguladoras no sítio inflamatório é um processo que depende da natureza e do estado de ativação destas células e é coordenado por moléculas de adesão e receptores de quimiocinas. Vários estudos mostram que o comportamento de migração das células Tregs influencia de maneira importante na sua atividade supressora *in vivo* e não somente seu potencial supressor (Huehn & Hamann, 2005).

A expressão da molécula L-selectina (CD62L) tem sido mostrada na maioria das células reguladoras T $CD4^+CD25^+$ (Sakaguchi et al., 1995; Lepault & Gagnerault, 2000). Outros dados tem reportado o aumento dos níveis de moléculas de adesão (CD54 and LFA-1) nos subtipos de células T reguladoras (Sakaguchi et al., 1995; Annunziato et al., 2002; Bystry et al., 2001; Iellem et al., 2003), sugerindo que estas células podem entrar no tecido inflamado e exercer sua atividade supressora. De fato, no presente estudo foi observado que células T $CD4^+CD25^{high}$ do sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos NI expressam as moléculas de adesão/migração CD62L, CD54, CD11a, CD18 no contexto *ex vivo*. Entretanto, quando estas células são estimuladas *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* observou-se um aumento no percentual de células T $CD4^+CD25^{high} CD62L^-$ nos pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD quando comparado aos indivíduos NI (Figura 5A). Estudos prévios demonstram que a molécula CD62L é rapidamente regulada na superfície das células sob ativação, estando a perda da molécula CD62L associada a um perfil de ativação (Jung et al., 1988). Além disso, Jung e colaboradores (1988) defendem que devido ao fato de CD62L ser importante marcador fenotípico para distinguir os subtipos de células T reguladoras e ser o principal receptor de migração para os linfonodos, essa molécula pode ser crítica para a migração *in vivo* e compartimentalização da função reguladora.

Neste estudo observamos também um aumento no percentual de células T $CD4^+CD25^{high}$ expressando as moléculas de adesão CD54, CD11a e CD18 nos pacientes do grupo IND e CARD em relação aos indivíduos NI após estimulação *in vitro* (Figura 5B, 6A-B) caracterizando essas células com um perfil migratório nestes pacientes. De fato, dados na literatura mostram que a molécula LFA-1 (CD11a/CD18) é o único membro da família das integrinas  expressa por células T $CD4^+CD25^+$ e possuem importante papel no tráfego e ativação celular além de propriedades de adesão (Lub et al., 1995; Berlin-Rufenach et al., 1999; Abraham et al., 1999, 2001; Kandula & Abraham, 2004). Com base no exposto podemos especular que as células T $CD4^+CD25^{high}$ do sangue periférico dos pacientes chagásicos apresentam perfil migratório e de ativação, sugerindo que essas células Treg podem estar aptas a migrar para o tecido cardíaco e provavelmente atuar *in situ* (Belkaid et al., 2002), principalmente nos pacientes portadores da forma clínica IND. Corroborando a essa hipótese, trabalhos adicionais mostram que a expressão variada de receptores de

migração nas células Treg podem fornecer a essas uma vantagem competitiva sobre as células T efetoras, e permitir que elas migrem mais eficientemente para o sítio de inflamação prevenindo a resposta imune inadequada (Piccirillo, 2008). Além disso, dados na literatura confirmam que para funcionar efetivamente *in vivo* células Treg necessitam migrar e operar em vários tecidos linfóides e não linfóides (Campbell & Ziegler, 2007). Sather e colaboradores (2007) ainda especulam que durante inflamação tecidual as células Treg sofrem extensa expansão, durante a qual elas expressam receptores que permitem sua migração para os tecidos não-linfóides. Após a migração para os sítios não-linfóides, as células Treg podem limitar a resposta de células T efetoras resultando no controle efetivo do patógeno sem dano tecidual e sem o desenvolvimento de processo imunopatológico. Baseado na observação de que as células $CD4^+CD25^{high}$ apresentam um perfil fenotípico de migração, nos questionamos se essas células poderiam estar presentes no tecido cardíaco.

Desta maneira, analisamos a possível presença de células Treg no tecido cardíaco, através do marcador Foxp3 com o objetivo de elucidar algumas questões como: As células T reguladoras estão presentes no tecido cardíaco de pacientes portadores da doença de Chagas? Onde essas células atuariam?

Utilizamos a molécula Foxp3 para avaliar a presença de Treg no tecido cardíaco uma vez que estudos relacionados à importância das células T reguladoras no controle da resposta imune mostram que a expressão de Foxp3 tem efeito marcante na função das células Treg, tanto bioquimicamente quanto em níveis celulares. Além disso, a alta expressão do gene Foxp3 em células T $CD4^+CD25^+$ e a baixa expressão deste gene em células T virgens e em células T $CD4^+CD25^-$ recém ativadas sugerem que Foxp3 é um marcador molecular específico para caracterizar as células Treg (Fontenot et al., 2003; Khattri et al., 2003; Hori et al., 2004). A importância do Foxp3 no desenvolvimento e função das células Treg está bem estabelecida, uma vez que alguns estudos mostram que células $CD4^+CD25^+$ que expressam Foxp3 possuem função reguladora e que células negativas para Foxp3 não possuem essa função (Fontenot et al., 2003). Ziegler (2006) corrobora a esse dado permitindo concluir que Foxp3 é absolutamente necessário para o desenvolvimento e função das células Treg e que a expressão ectópica de Foxp3 pode levar a conversão de células T a um fenótipo regulador.

No presente estudo foi demonstrado que pacientes portadores da doença de Chagas apresentam foco inflamatório constituído principalmente por células mononucleares, sugerindo uma forte participação de linfócitos nesses sítios (Figura 7). Interessantemente, linfócitos Foxp3 positivos no tecido cardíaco de pacientes chagásicos estão localizados próximo aos vasos sanguíneos e não associadas ao foco inflamatório (Figura 7). Estudos recentes mostram que a localização apropriada determina a capacidade supressora *in vivo* das

células Treg (Huehn & Hamann, 2005). Também foi observado no tecido cardíaco que pacientes apresentando a forma clínica IND da doença apresentaram maior percentual de linfócitos Foxp3 positivos (Figura 7G). Baseado nos dados encontrados é possível especular que células Treg Foxp3 positivas podem entrar no tecido inflamado e atuar diretamente no sítio de infecção controlando a progressão da inflamação. Estudos que reforçam esta hipótese demonstram a atividade das células Treg nos tecidos não-linfóides associadas à limitação da inflamação e autoimunidade (Sather et al., 2007). Além disso, os autores mostram dados que indicam que a migração de Treg para tecidos não-linfóides é essencial durante a resposta imune contra antígenos estranhos ou em modelos experimentais de autoimunidade (Siegmund et al., 2005, Sather et al., 2007).

Na fase crônica da doença de Chagas, as células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras podem ser população importante no controle da resposta inflamatória no tecido cardíaco. Adicionalmente, seu efeito pode depender do seu perfil de migração, capacidade de adesão e sua presença no tecido. Estudos sobre a caracterização do infiltrado celular na miocardite crônica foram essencialmente estudados tanto em humanos como em modelos experimentais (Reis et al., 1993a,1993b; Higuchi et al., 1993, 1995, 1997, 2003; dos Santos et al., 2001). Reis e colaboradores (1997) quantificaram e correlacionaram o número de células inflamatórias positivas para IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α com o número de células T CD4⁺ e CD8⁺. Células TCD8⁺ foram as principais células encontradas nos tecidos, enquanto o número de células CD4⁺ encontrava-se reduzido. A expressão de IFN- γ foi intensa, havendo correlação positiva entre o número de células secretando essa citocina e células T CD8⁺, sugerindo que essas células seriam a principal fonte de produção de IFN- γ nos tecidos cardíacos de pacientes com a doença de Chagas. Foi também observado, número moderado de células secretando IL-4, IL-6 e TNF- α , sugerindo que a proliferação da sub-população de células T CD4⁺ Th2, estaria relacionada à disseminação do parasito.

Estudos de biópsias endomiocárdicas, obtidas de pacientes com cardiopatias prestes a serem transplantados possibilitaram verificar o padrão de citocinas sintetizadas, após estimulação *in vitro* de linhagens celulares obtidas no sítio da lesão. Os resultados obtidos mostraram predomínio de IFN- γ TNF- α concordantes com os achados imunohistoquímicos já descritos (Cunha-Neto et al., 1998) porém, estes estudos não determinam os possíveis mecanismos de imunorregulação existentes nos pacientes do grupo IND que controlam a progressão do processo inflamatório.

Muito pouco é conhecido a respeito da especificidade das células Treg e existem evidências de que essas células são uma população heterogênea que reage com peptídeos derivados tanto de tecidos próprios quanto antígenos estranhos (Maloy & Powrie, 2001).

Além disso, esses estudos sugerem que embora a ativação de TCD4⁺CD25⁺ seja antígeno específica, uma vez ativada, essas células inibem tanto células T CD4⁺ quanto CD8⁺ de maneira antígeno não-específica (Takahashi et al., 1998; Thornton & Shevach, 2000).

Nossos resultados demonstraram que o desenvolvimento de células TCD4⁺CD25^{high} parece ser dependente de estímulo antigênico, uma vez que observamos um aumento significativo no percentual de células TCD4⁺CD25^{high} no sangue periférico dos pacientes do grupo IND e CARD apenas após estimulação com antígenos do *T cruzi* e não na presença de antígenos não relacionados a infecção (Figura 8B-C). Esta interpretação é corroborada pelos resultados obtidos com cultura estimulada por *Candida albicans* considerando que o antígeno de *Candida* é onipresente na população humana. Os dados ainda permitem sugerir que o aumento de células TCD4⁺CD25^{high} na circulação sanguínea é dependente de uma resposta secundária para as células de memória imunológica específica. Esta interpretação é altamente pertinente uma vez que pode ser verificada nos indivíduos NI para *T cruzi*, que apresentam um aumento de células Treg apenas após estimulação com *Candida albicans* (Ag onipresente) (Figura 8A). De fato, as células Treg estão associadas muito mais ao marcador característico de células de memória CD45RO do que de células virgens CD45RA (Tabela 2, Araújo et al., 2007).

Durante a fase aguda, alguns estudos mostram que as células Treg naturais podem reconhecer antígenos próprios que são liberados devido ao dano tecidual, entretanto dados obtidos em estudos de infecções crônicas sugerem que as células Treg reconhecem antígenos microbianos (Hesse et al., 2004; Cabrera et al., 2004; Mckee & Pearce, 2004). Adicionalmente, células TCD4⁺CD25⁺ antígeno específicas tem sido mostradas nos sítios de infecção da derme logo após infecção com *L. major* (Belkaid et al., 2002). Além disso, existem evidências de que a resposta imune adaptativa contribui para o controle da imunopatologia induzida pela infecção através da geração de células T reguladoras antígeno-específicas, tendo essas células um papel protetor na imunidade contra a infecção (Mills, 2004).

De fato, as células Treg podem ser importantes para monitorar a resposta imune do hospedeiro e prevenir o dano tecidual. Estudos em infecções crônicas com *Schistosoma mansoni* em camundongos demonstram o papel protetor dessas células na imunopatologia e que sua remoção aumenta o dano tecidual (Hesse et al., 2004). Gavin & Rudensky (2003) concluem que as células TCD4⁺CD25⁺ naturais são direcionadas para reagir contra os agentes infecciosos o que leva a resposta imune balanceada de células T patógenos-específicas supressoras e inflamatórias, visando reduzir tanto a virulência quanto o dano inflamatório e possivelmente, manter o antígeno com a finalidade de geração de células T de memória.

As células Treg possuem diversos marcadores para sua caracterização fenotípica, dentre essas moléculas está o GITR. A proteína GITR (também conhecida como TNFRSF18) está relacionada ao receptor de TNF induzido por glicocorticóide e gerou a atenção dos imunologistas devido ao fato de ser um marcador potencial de células Treg (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002). Estudos demonstram que a proteína GITR possui papel significativo na reversão dos efeitos imunossupressores das células Treg, fenômeno esse denominado contrasupressão (Shevach & Stephens, 2006; Gershon et al., 1981). Apesar de não termos observado diferença na expressão de GITR por células TCD4⁺CD25^{high} entre as formas clínicas estudadas após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*, analisamos a expressão de GITR por células Treg frente a diferentes estímulos antigênicos. Nossos resultados nos permitiram observar um baixo percentual de células TCD4⁺CD25^{high}GITR⁺ após estimulação com antígenos do *T. cruzi* (Tabela 3).

Estudos adicionais mostram que a adição de anticorpos específicos ao GITR na cocultura de células reguladoras e efetoras anula a atividade supressora das células Treg, sugerindo que a interação GITR-GITRLigante inibe a atividade supressora das células Treg e aumenta a proliferação das células efetoras (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002; Shevach & Stephens, 2006). Entretanto, outros autores demonstram que a interação GITR-GITRLigante resulta na coestimulação tanto dos efeitos das células Treg quanto das células efetoras (Muriglian et al., 2004). Estudos *in vitro* aumentam as evidências de que a expressão de GITR por células Treg resulta na expansão e aumento do potencial supressivo destas (Shevach & Stephens, 2006). Porém se a interação GITR-GITRLigante induz a estimulação ou contrasupressão das células Treg ainda permanece por ser esclarecida. Adicionalmente, estudos na infecção por *T. cruzi* demonstram que o bloqueio de GITR pode estar relacionado à diminuição do número de células TCD4⁺CD25⁺ e conseqüentemente a diminuição da atividade supressora das células Treg (Mariano et al., 2008). Baseado nestes dados e em nossos resultados podemos sugerir que as células Treg presentes na circulação dos pacientes portadores da doença de Chagas possuem reduzida atividade funcional no sangue e devem migrar para local de infecção, onde irão *in situ* expressar propriedades funcionais reguladoras.

Vários estudos em modelos experimentais e humanos têm demonstrado que as células TCD4⁺CD25⁺ são população celular importante com capacidade de suprimir a ativação de células efetoras, produção de citocinas pro-inflamatórias, inibir a ação de células apresentadoras de antígenos e conseqüentemente controlar a resposta imune (Sakaguchi, 2000; Read et al., 2000; Dieckman et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2001, 2002, 2004; Belkaid et al., 2002, 2006; Belkaid, 2003,2007; Liu et al., 2003; Mills, 2004; Shevach, 2004, 2009; Belkaid & Rouse, 2005; Huehn et al., 2005; Rouse, 2007; Piccirillo, 2008).

Alguns autores sugerem que o alvo da atividade supressora das células Treg é a resposta imune que confere proteção contra infecções com microorganismos e também respostas que causam danos ao tecido do hospedeiro (Mills, 2004). Desta maneira, o balanço de células T reguladoras e atividade de células efetoras em diferentes tecidos é sintonizado de maneira precisa para permitir o controle do patógeno e a imunovigilância enquanto previne o desenvolvimento da inflamação crônica e doenças autoimunes (Belkaid et al., 2006). Entretanto, o mecanismo utilizado por essas células ainda não está bem estabelecido.

No presente estudo avaliamos a co-cultura de células efetoras (PBMC) na presença de células reguladoras ($CD4^+CD25^+$) do sangue periférico de indivíduos NI e pacientes apresentando as formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas para avaliação da atividade funcional das Treg. Nossos dados mostram que não há diferença significativa nas co-culturas estabelecidas. Entretanto, observamos uma tendência de regulação de PBMC por células Treg nos pacientes do grupo IND e CARD (Figura 9B-C), uma vez que podemos observar uma diminuição da proliferação celular na presença de Treg quando comparado a cultura somente com células efetoras (Figura 9B-C). Esses resultados não foram observados nos indivíduos NI (Figura 9A). A adição de anticorpos monoclonais anti-CTLA-4, anti-IL10 e anti-TGF- β nas co-culturas do presente estudo não alterou os resultados encontrados (Figura 9).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de determinar os mecanismos pelos quais as células Treg atuam nas diferentes infecções, sendo a supressão por contato celular (CTLA-4) ou por citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β) os mais estudados. Baseado nos nossos resultados, podemos sugerir outros mecanismos de supressão por essas células Treg que não esses, tais como os estudos realizados por Pandiyan e colaboradores (2007) que sugerem que as células Treg podem competir com as células T efetoras pela IL-2, uma vez que apresentam alta expressão de CD25 e desta maneira, devem consumir essa citocina presente no meio. Consequentemente esse consumo inibe a proliferação das células T efetoras resultando em apoptose dependente do fator pro-apoptótico Bim. Outros autores ainda sugerem que as células Treg expressam na sua superfície a molécula galactina 1 (homodímero que se liga a glicoproteínas como CD45, CD43 e CD7) podendo interagir com as células efetoras resultando na inibição do ciclo celular, apoptose e inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias (Garin et al., 2007).

Mecanismos pelos quais as células Treg suprimem a função das células apresentadoras de antígenos (APCs) vêm sendo amplamente discutidos. Liang e colaboradores (2008) sugerem que a expressão da molécula LAG 3 (homólogo de CD4) por células Treg permite a interação de alta afinidade dessas células com as moléculas de MHC II presentes nas células

dendríticas (DC) imaturas. Essa interação induz supressão da maturação das células DC e inibição da sua capacidade estimulatória.

Baecher-Allan e colaboradores (2002) postulam que células reguladoras TCD4⁺CD25^{high} suprimem seletivamente células alvo que recebem sinal “fraco” faltando coestimulação enquanto são incapazes de suprimir células T respondedoras que são induzidas por antígenos microbianos e sofrem expansão clonal via sinalização “forte”. Alguns autores ainda demonstraram que CTLA-4 e TGF- β não são necessários para a atividade das células Treg (Dieckmann et al., 2001; Levings et al., 2001) e que bloqueadores de TGF- β não revertem a atividade supressora das células Treg (Piccirillo et al., 2002; Shevach, 2009).

Baecher-Allan e colaboradores (2004) demonstraram através de experimentos que vários fatores podem interferir na atividade supressora das células Treg. Dentre eles o percentual de células TCD4⁺CD25^{high} que são obtidas após sua separação do restante das células, uma vez que somente as células TCD4⁺CD25^{high} derivadas de sangue periférico em humanos são funcionalmente supressoras, sendo que é provável que no subtipo TCD4⁺CD25^{high} ainda exista um pequeno número de células não supressoras (Levings et al., 2002; Baecher-Allan et al., 2004; Shevach, 2009).

Outro fator importante é o tipo de estímulo fornecido na co-cultura de células Treg e efectoras. Este estímulo tem forte influência no resultado final desta interação podendo levar a diferenciação em células supressoras ou a proliferação celular. Foi demonstrado ainda que o aumento da força de sinalização do TCR durante doenças autoimunes pode mudar a interação da co-cultura de células Treg e T efectoras de um processo de supressão para proliferação. Além disso, o tempo de andamento do estudo de supressão *in vitro* mostra que as células T respondedoras são inicialmente sensíveis à supressão, e que, de fato, elas se tornam resistentes à supressão após 40 ou 60 horas de estimulação (Baecher-Allan et al., 2004).

Os mesmos autores ainda notificam que até mesmo o método utilizado para a separação das células T reguladoras pode interferir na atividade supressora dessas células. Baecher-Allan (2004) reporta que diferenças no método de isolamento das células Treg, por “beads” magnéticas ou “sorting” por FACS, leva a diferenças no grau de pureza e conseqüentemente pode resultar em variação na supressão *in vitro* ou variações mais complexas nos mecanismos de ação aparentes. Os autores ainda sugerem que é possível que como resultado da inflamação crônica, as células Treg podem apresentar diminuição de sua atividade supressora devido à exaustão funcional. Baseado nestes dados e nos nossos podemos inferir que as células T reguladoras obtidas do sangue periférico dos pacientes portadores da doença de Chagas podem estar atuando através de mecanismos independente de CTLA-4 ou de citocinas reguladoras ou ainda podem estar sofrendo interferência de um dos

fatores descritos acima. Acreditamos que estes fatos podem explicar os resultados obtidos onde não conseguimos um resultado significativo ou simplesmente pelo fato de que estas células exercem sua atividade supressora somente no local de inflamação, atuando exclusivamente *in situ*.

Nossos resultados não nos permitiram demonstrar a presença de atividade funcional significativa por células Treg de pacientes portadores da doença de Chagas. Devido a este fato, analisamos por um período maior de tempo a expressão de Foxp3 por esses pacientes. Considerando a restrita expressão do fator de transcrição Foxp3 nas células Treg e sua importância para a diferenciação dessa linhagem celular analisamos a cinética de expressão de Foxp3 por células TCD4⁺CD25^{high} de PBMC dos pacientes do grupo IND e CARD e indivíduos NI. Interessantemente, estudos mostram que não apenas a completa falta de Foxp3 leva ao desenvolvimento da resposta autoimune fatal, mas a redução dos níveis desta molécula podem também conduzir ao mesmo fenótipo (Campbell & Ziegler, 2007). Desta forma, foi avaliado neste estudo a intensidade média de fluorescência (IMF) do Foxp3 com o intuito de determinar melhor a estabilidade de expressão desta molécula na superfície da célula e sua dinâmica, além de favorecer o melhor entendimento da participação de Foxp3 no desenvolvimento de células Treg.

No presente estudo observamos que indivíduos NI e pacientes apresentando a forma clínica IND matêm a expressão de Foxp3, principalmente após estimulação antigênica, enquanto que os pacientes do grupo CARD apresentam uma diminuição na IMF de Foxp3, após o 4º dia de cultura (Figura 10, 11). Ainda não está bem estabelecido o papel de Foxp3 para o desenvolvimento de células Treg no Timo e também para a manutenção dessas células na periferia. Entretanto, estudo recente relacionado a deleção condicional do alelo de Foxp3 em células Treg maduras periféricas demonstrou que alterações na proteína Foxp3 resulta em perda da função supressora e de características fenotípicas das células Treg. Além disso, essas células passam a produzir IL-2 e citocinas proinflamatórias e desenvolvem potencial patogênico (Williams & Rudensky, 2007). Assim, expressão contínua de Foxp3 é necessária para manter ativado o estado de diferenciação dessas células (Zheng & Rudensky, 2007). Desta forma, baseado nesses dados podemos sugerir que os pacientes do grupo CARD expressam a molécula Foxp3, porém não conseguem manter a expressão desta molécula na superfície celular das células Treg, o que acarretaria em uma deficiência de diferenciação destas células, ou provável alteração no perfil regulador. Conseqüentemente, essa alteração levaria a progressão da patologia nestes pacientes.

Nas últimas décadas, estudos vem apresentando evidências da correlação entre a resposta imune e a eficácia do tratamento quimioterápico (Michailowsky et al., 1998; Urbina,

1999; Coura & de Castro, 2002). Em modelos experimentais, há indícios de que o benzonidazol atua em sinergismo com a resposta imune, e que as citocinas IL-12 e IFN- γ são capazes de amplificar o efeito do tratamento sobre cepas resistentes, potencializando a fagocitose, a produção de citocinas e de óxido nítrico (Michailowsky et al., 1998), sugerindo que a ativação do sistema imune aumenta a eficácia do tratamento com benzonidazol durante a infecção por *T. cruzi* (Michailowsky et al., 1998; Urbina, 1999; Coura & de Castro, 2002).

Na doença de Chagas humana, a análise da resposta imune pré e pós-tratamento é essencial tanto para entendermos os mecanismos de ação do benzonidazol quanto para o desenvolvimento racional de novos agentes tripanocidas (Coura & De Castro, 2002; De Castro 1993; Urbina, 1999). Vários estudos têm sido realizados para determinar o efeito do tratamento com benzonidazol na evolução da doença de Chagas (Ferreira, 1976; Coura et al., 1978; Viotti et al., 1994; Andrade et al., 1996; Sosa Estani et al., 1998). No geral, os resultados obtidos foram mais satisfatórios durante o tratamento na fase aguda e casos de infecção recente (Coura & De Castro, 2002), onde se observou cura parasitológica em 70% dos casos tratados com benzonidazol (Rassi, 2000). Sather-Avelar e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento de crianças infectadas com benzonidazol leva a um aumento dos níveis de células NK ativadas no sangue periférico. Além disso, estes autores sugerem que esta forte ativação de células NK está relacionada a um padrão misto de citocinas caracterizada pela síntese simultânea de citocinas pró-inflamatórias e moduladoras (IFN- γ e IL-4). Estes achados sugerem ainda que uma resposta não polarizada do sistema imune pode ser importante para o benefício do tratamento etiológico na doença de Chagas (Sathler-Avelar et al., 2006, 2008).

O papel do tratamento anti-parasitário durante a fase crônica da doença de Chagas é controverso, sendo os estudos do efeito do tratamento durante essa fase da doença escassos no Brasil (Silva et al., 1974, Cerisola et al., 1977). Coura & De Castro (2002) enfocam que o tratamento na fase crônica tardia deve ser seletivo, com prioridade para os casos apresentando a forma clínica indeterminada ou com menor patologia que podem ser monitorados por longos períodos de tempo após o tratamento.

Estudos mais recentes demonstraram o efeito benéfico do tratamento com benzonidazol em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* (Garcia et al., 2005). Estes autores concluem que o tratamento etiológico na fase crônica previne o desenvolvimento da cardiomiopatia grave. Além disso, vários estudos sugerem que o tratamento etiológico leva a testes sorológicos negativos e a prevenção de mudanças clínicas e eletrocardiográficas associadas à progressão da doença de Chagas (Macedo & Silveira, 1987;

Miranda et al., 1994; Viotti et al., 1994, 2006; Fragata Filho et al., 1995, Fabbro et al., 2000, Gallerano & Sosa, 2001).

Baseado nestes dados e acreditando que o tratamento possa ocasionar alterações na resposta imunológica analisamos o efeito do benzonidazol sob as células reguladoras ($\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$) em pacientes pertencentes à forma clínica CARD da doença. Nossos resultados nos permitem dizer que pacientes do grupo CARD possuem aumento do percentual de células Treg após tratamento (Figura 12A-B), porém a expressão de Foxp3 por essas células não foi diferente em relação aos pacientes do grupo CARD sem tratamento e indivíduos NI (Figura 12C-D). A análise dos dados sugere que o tratamento altera o número de células reguladoras, porém a sua atividade funcional na circulação sanguínea parece não estar alterada. Isso não exclui o fato de que essas células possam ter capacidade migratória e exercer sua atividade funcional *in situ* contribuindo na prevenção do dano tecidual ou redução da carga parasitária nos pacientes sintomáticos que foram tratados.

Nossos dados mostraram ainda uma diminuição no percentual de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD45RO}^+$ nos pacientes CARD submetidos ao tratamento (Figura 13A-B), sugerindo que as células Treg com fenótipo de memória estão diminuídas na circulação dos pacientes tratados, provavelmente devido à migração dessas células específicas para os locais de ativação. Observamos ainda um aumento no percentual de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CTLA-4}^+$ nos pacientes CARD tratados (Figura 13C-D), mostrando um provável aumento de moléculas necessárias à atividade supressora das células T reguladoras nestes pacientes.

Em relação ao perfil de citocinas produzidas por células Treg após tratamento nos pacientes do grupo CARD foi observada uma diminuição no percentual de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{IL-10}^+$ em relação aos pacientes CARD não tratados (Figura 14B), sugerindo que após o tratamento esses pacientes produzem níveis semelhantes aos indivíduos NI da citocina IL-10 produzidas por células Treg. Através da análise de grupos anteriores que demonstram que após o tratamento observa-se elevação da síntese de IFN- γ e intensa produção de IL-10, favorecendo um efeito benéfico do benzonidazol, podemos inferir que provavelmente as células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ sofrem efeito do tratamento com benzonidazol, porém sua atividade supressora e produção de citocinas não altera a resposta imune na circulação. Entretanto, essa análise não exclui a possibilidade de alterações das funções de Treg sob o efeito do tratamento em outros locais de infecção. De fato, o papel das células T reguladoras durante o tratamento ainda é desconhecido e são necessários estudos adicionais para melhor caracterizar a resposta imunológica após tratamento.

7 CONCLUSÃO

Os resultados adquiridos com o desenvolvimento deste trabalho trouxeram um melhor entendimento sobre o perfil fenotípico das (Treg), avaliada pelos marcadores de superfície e moléculas intracelulares, bem como sua atividade funcional. Além disso, esse trabalho originou, pela primeira vez na literatura, dados relacionados à atividade funcional das células Treg no sangue periférico e a presença dessas células no tecido cardíaco de pacientes portadores da doença de Chagas. É importante mencionar também a importância dos dados obtidos com o tratamento com benzonidazol, que poderá orientar futuros trabalhos relacionados à atividade das células Treg frente ao tratamento quimioterápico.

Estes achados reforçam, portanto, a importância das células Treg no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, sugerindo que a resposta imune contra *T. cruzi* pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, entretanto os mecanismos presentes nos pacientes CARD parecem não ser suficientes para controlar a doença. Uma possibilidade para explicar tal fato pode ser o balanço entre a resposta efetora e mecanismos imunorreguladores (células Treg) em pacientes CARD ocorrer de maneira diferenciada daquele observado nos pacientes que mantêm a forma clínica IND.

8 ANEXOS

Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease

Fernanda Fortes Araujo¹, Juliana Assis Silva Gomes¹, Manoel Otavio Costa Rocha², Sarah Williams-Blangero³, Vladimir Martins Pinheiro^{1,2}, Maria Jose Ferreira Morato^{1,4}, Rodrigo Correa-Oliveira¹

¹ Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Rene Rachou-FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190002, Minas Gerais, Brazil, ² Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130100, Minas Gerais, Brazil, ³ Southwest Foundation for Biomedical Research Department of Genetic, San Antonio, Texas 78245-0549, ⁴ Faculdade Sao Camilo, Belo Horizonte 30150100, Minas Gerais, Brazil

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Subjects, material and methods
 - 3.1. Recruitment of Subjects
 - 3.2. Antigens
 - 3.3. Flow cytometric analysis of peripheral blood
 - 3.4. Flow cytometric analysis of cells culture
 - 3.5. FACS analysis of surface markers and intracellular cytokine
 - 3.6. Statistical analysis
4. Results
 - 4.1. Human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are elevated in individuals with the indeterminate form of Chagas disease
 - 4.2. Peripheral blood CD4⁺CD25^{high} cells from Chagasic patients express different levels of surface molecules
 - 4.3. Regulatory T cells from IND and CARD clinical forms of Chagas disease present different effector mechanism
5. Discussion
6. Acknowledgments
7. References

1. ABSTRACT

Several immunoregulatory mechanisms are proposed to be effective both in human and experimental *Trypanosoma cruzi* infection. However, the role of CD4⁺CD25^{high} T cells in Chagas disease has not yet been elucidated. These cells are critical for the regulation of immune response to infectious agents and in the control of autoimmune diseases. In this study, the presence of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in the whole blood of non-infected individuals (NI), and patients with the indeterminate (IND) and cardiac form (CARD) of Chagas disease was evaluated. To further characterize this population of regulatory cells, the co-expression of CTLA-4, CD62L, CD45RO, CD45RA, HLA-DR, CD40L, CD69, CD54, IL-10R and the intracellular molecules FOXP3 and IL-10 on the CD4⁺CD25^{high} T lymphocytes was examined. FOXP3 was expressed by the majority of CD4⁺CD25^{high} when compared with the other CD4⁺ T cells subsets in

patients with Chagas disease. Patients with the IND form of the disease had a higher frequency of circulating regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells than patients with the CARD form. Moreover, there was an increase in CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells that were also IL-10⁺ in the IND group whereas, in the CARD group, there was an increase in the percentage of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells that expressed CTLA-4. These data suggest that IL-10 produced by regulatory T cells is effective in controlling disease development in patients with the IND form. However, in individuals with the CARD form of the disease, the same regulatory mechanism, mediated by IL-10 and CTLA-4 expression is not sufficient to control the progression of the disease. The data suggest that CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with Chagas disease might play a role in the immune response against *T. cruzi* infection although with distinct effects in patients with the IND and CARD forms of disease.

2. INTRODUCTION

The protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, is the etiological agent of American trypanosomiasis or Chagas disease. The disease is endemic throughout Latin America where 18-20 million people are infected (1). The acute phase of infection with *T. cruzi* is characterized by intense parasitism and evident blood parasitemia and may result in death. In survivors, the acute phase is followed by an asymptomatic or indeterminate phase, during which there are no clinical symptoms. The asymptomatic phase may last anywhere between months to decades. About 30% of those individuals who experience the indeterminate phase of the disease go on to develop clinical symptoms of Chagas disease (2).

The scarce parasitism during the chronic phase, the prolonged latent period that precedes morbidity, and the intriguing existence of different clinical forms suggest an autoimmune basis for the pathology of chronic Chagas disease. The demonstration of *T. cruzi* or its antigens by immunohistochemical techniques or of *T. cruzi* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in inflamed myocardial tissues suggests that parasite antigens may be necessary to trigger the inflammatory process (3,4,5). Several studies of Chagas disease have demonstrated that immunoregulatory mechanisms control the intense immune activity in the chronic phase. These immunoregulatory mechanisms are necessary to prevent a deleterious effect of the excessive stimulation of immune system and fatality (6,7). In our laboratory, we demonstrated that patients with the cardiac (CARD) form of chronic Chagas disease develop a strong immune response against the parasite, with high levels of IFN-gamma and low levels of IL-10 (8,9) and this response is associated with cardiac pathology. These data suggest that an increase in the secretion of IL-10 during the chronic phase may be associated with protection of the host against the severe pathology induced by type 1 immune response (8,9).

Recently the role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells has become the focus of increased study because of the putative importance of these cells in maintaining self tolerance and in defense against infections. It has been suggested that these cells are important in perpetuating the persistence of the infection and consequent long-term resistance against re-infection (10,11,12,13). CD4⁺CD25⁺ cells are naturally generated in the thymus and constitute 5-10% of peripheral CD4⁺ T cells in naive animals and humans (14). However, by itself the expression of CD25 is not a definitive marker of natural regulatory T cells. CD25 is an activation marker for T cells and is therefore also expressed by effectors Type 1 and Type 2 cells. For these reasons, characterization of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells population with additional markers is crucial for improved characterization of the cells. Among the described markers are CD38, CD62L, and CTLA-4 or intracellular expression of the transcriptional repressor FOXP3 (forkhead box P3) (15,16).

The suppressive mechanisms of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells are not yet clear. However, there is

increasing evidence that cell-cell contact is required to trigger these suppressive mechanisms and that the expression of CTLA-4 might be involved (17). Furthermore, other studies have shown that IL-10 is an important cytokine involved in the suppressive function of regulatory T cells (18). Although there is no evidences for the effector function of this cell population in human Chagas disease, we have previously demonstrated that IL-10 is significantly involved in the control of morbidity during the chronic phase of the infection with *T. cruzi* (8). Thus, it is possible that in human Chagas disease, CD4⁺CD25⁺ T cells may be an important population in the control of morbidity development. In this study we present the first evidence suggesting that in humans, control of morbidity may be occurring via IL-10 induction/secretion.

3. PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

3.1. Recruitment of Subjects

The initial cohort of study subjects was recruited 8 years ago from the Referral Outpatient Center for Chagas Disease of the Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Brazil. All study participants provided written informed consent following the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais. The study protocol complied with the regulations of the Brazilian National Council on Research in Humans and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais under protocol COEP-ETIC 372/04. Individuals with systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, thyroid dysfunction, renal insufficiency, chronic obstructive pulmonary disease, hydroelectrolytic disorders, alcoholism, previous clinical history suggesting coronary artery obstruction and rheumatic disease, or who were unable to fulfill the study requirements for annual examinations were excluded from the study. Individuals were considered seropositive for *T. cruzi* infection if two or more standard tests (indirect immunofluorescence, ELISA, indirect haemagglutination) were positive. Study participants were evaluated annually for a range of clinical and immunological parameters related to Chagas disease (8).

For this study, we investigated the immune responses of 27 patients in the chronic phase of the infection who had completed the protocol described above. The patients infected with *T. cruzi* were classified as being in the indeterminate phase of Chagas disease (IND) or having the cardiac (CARD) form of the disease as previously reported (19). Individuals in the IND group ($n=14$) ranged in age from 30 to 67 years. These individuals had no significant alterations in the electrocardiography, chest x-ray, echocardiogram, esophagogram and barium enema. The CARD group ($n=13$) ranged in age from 25 to 70 years, and presented echocardiographic and/or clinical and radiological signs of heart enlargement, with a final diastolic diameter of the left ventricle of more than 55mm. The cardiac patients that participated in this study were classified as belonging to the group CARD V as previously reported (19). Eleven normal healthy individuals, ranging in age from 29 to 55 years, from an area that is not endemic for

Immunoregulation in Chagas disease

Chagas disease and who had negative serology for Chagas disease, were included as a control group (NI).

3.2. Antigens

Epimastigote (EPI) antigens were prepared by using the CL strain of *T. cruzi*. EPI were washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS), disrupted by repeated freezing at -70°C and thawing, and homogenized at 4 to 6°C in a Potter-Elvehjem centrifuge at 20,000 rpm five times for 60 seconds, with 30 seconds intervals at 4°C . The suspension was subsequently centrifuged at 40,000 x g for 60 minutes on ice. The clear supernatant was dialyzed for 24 hours at 4°C against PBS, filter sterilized on 0.2- μm -pore-size membranes, assayed for protein concentration, aliquoted, and stored at -20°C until use.

3.3. Flow cytometric analysis of peripheral blood

Whole blood was collected in Vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson) and 100 μl samples were mixed in tubes with 2 μl of undiluted monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or allophycocyanin (APC) for the following cell surface markers: CD4 (SK3), CD25 (MA251), HLA-DR (G466), CD45RA (HI100), CD45RO (UCHL-1), CD62L (DREG56), CD40L (TRAP1), CD54 (HA58), CD69 (FN50), IL-10R (3F9), CD152 [CTLA-4 (BNI3)]. The tubes were incubated in the dark for 30 minutes at room temperature. Following incubation, erythrocytes were lysed using 2ml of fluorescence-activated cell sorter (FACS) Lysing Solution. After incubation, the cells were washed twice with 2ml of phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide. The cells were then fixed in formaldehyde (4%) and permeabilized in saponin buffer (0.5%) (Sigma) for 15 minutes. Finally, the cells were incubated with monoclonal antibody reactive to FOXP3 (PCH101). After incubation the cells were fixed in 200 μl of FACS fix solution (10g/l paraformaldehyde, 1% sodium-cacodylate, 6.65g/l sodium chloride, 0.01% sodium azide). Phenotypic analyses were performed by flow cytometry with a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer, collecting data on 5×10^4 lymphocytes (gate by forward and side scatter properties) and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

3.4. Flow cytometric analysis of cells culture

Whole blood was stimulated with either medium alone (RPMI 1640 supplemented with 1.6% L-glutamine, 3% antibiotic-antimycotic, 5% of AB Rh-positive heat-inactivated normal human serum) or EPI (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 22 hours at 37°C and 5% CO_2 . During the last 4 hours of culture, Brefeldin A (SIGMA, St. Louis, MO, USA) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the cultures (20). Cultured cells were washed twice in PBS containing 1% bovine serum albumin and stained with monoclonal antibodies specific for several cell-surface markers conjugated with FITC or PE or APC (same described above). The cells were then fixed in formaldehyde (4%) and permeabilized in saponin buffer (0.5%) (Sigma) for 15 minutes. Finally, the cells were incubated with monoclonal antibodies reactive to IL-10 (JES3-9D7), IL-2 (MQ1-17H12), IFN- γ (B27), TNF- α (Mab11) and FOXP3 (PCH101). Phenotypic analyses were performed by flow cytometry with a Becton

Dickinson FACScalibur flow cytometer, and data on 5×10^4 lymphocytes collected (gate by forward and side scatter properties) and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

3.5. FACS analysis of surface markers and intracellular cytokine

Lymphocytes were analyzed for their intracellular cytokine expression patterns and frequencies as well as for cell surface markers using Cell Quest software. The frequency of cells was analyzed in four gates for each staining: gate 1 (R1), lymphocyte gate (Figure 1A); gate 2 (R1 and R2), T CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ lymphocytes gate; gate 3 (R1 and R3), T CD4 $^+$ CD25 $^{\text{low}}$ gate, and gate 4 (R1 and R4), T CD4 $^+$ CD25 $^-$ gate (Figure 1B). Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls. This approach allowed us to determine the frequency of populations in sub regions of mononuclear cells, taking advantage of the known position of T CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ lymphocytes based on their size and granularity profiles. The analyzed regulatory population presented strong positivity for CD25 cell marker. Moreover, this analytical approach allowed us to obtain a homogeneous and well-defined population. The following step was to build histograms used to quantify the percentage of the following markers: CD45RA, CD45RO, CD62L, CD40L, CD69, HLA-DR, CD54, CD152, IL10R, intracellular cytokines and FOXP3 on CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$, CD4 $^+$ CD25 $^{\text{low}}$ e CD4 $^+$ CD25 $^-$ T cells subpopulations (Figure 1C).

3.6. Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism version 3.0 software. The following nonparametric tests were performed: 1) Mann-Whitney test to compare two groups (NI x IND or NI x CARD or IND x CARD), 2) Kruskal-Wallis test to compare the three groups (NI x IND x CARD), and 3) Wilcoxon test to compare cultures stimulated and non stimulated. Differences were considered significant when a *P* value of less than 0.05 was obtained. The statistical analyses were performed using the median values of each group.

4. RESULTS

4.1. Human CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ regulatory T cells are elevated in individuals with the indeterminate form of Chagas disease

It has been demonstrated that within the CD4 $^+$ CD25 $^+$ T cells, both sub-populations expressing either low or high levels of CD25 exhibit regulatory functions in mice. However, in humans only CD4 $^+$ T cells expressing high levels of CD25 exhibit similar strong regulatory function (21). We utilized peripheral blood samples from patients with Chagas disease to determine whether CD4 $^+$ CD25 $^+$ cell subpopulations are correlated with the clinical forms of the disease. We evaluated the expression of this marker both before and after in vitro stimulation with parasite antigens. In Figure 2 we show the percentage of CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$, CD4 $^+$ CD25 $^{\text{low}}$ and CD4 $^+$ CD25 $^-$ cells in the peripheral blood of patients with the different clinical forms of the disease as well as in non-infected controls.

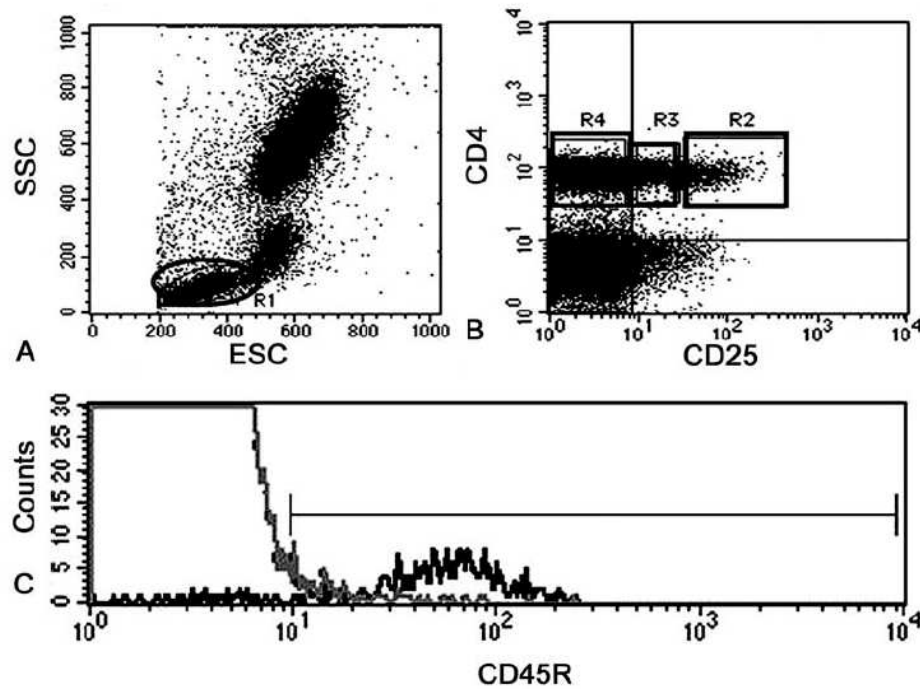


Figure 1. Identification of peripheral lymphocyte population in diagram of FSC x SSC (A). Dot plot of FL-3 x FL-4, displaying the frequency of CD4⁺CD25⁺ cells, after stimulation with EPI. The CD4⁺CD25^{high}(R2), CD4⁺CD25^{low}(R3) and CD4⁺CD25^{negative}(R4) populations were sorted using the indicated sorting gates (B). The histograms represent the expression of CD45RO in CD4⁺CD25^{high} T cells (C).

Our results show that CD4⁺CD25^{high} T cells comprise 1-5% of the total CD4⁺ T cell population in all individuals studied. After *in vitro* antigenic stimulation, we observed that patients with IND form of the disease had significantly higher percentages of CD4⁺CD25^{high} (p less than 0.05) when compared with non-infected individuals(NI) (Figure 2). No statistically significant differences were observed in CD4⁺CD25^{low} or CD4⁺CD25⁻ T cells between the groups studied (Figure 2).

Figure 3 shows the expression of FOXP3, a transcriptional repressor associated with the function of regulatory T cells, in blood from patients with the IND and CARD forms of Chagas disease and the NI group before and after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens. Flow cytometric analysis showed that FOXP3 was expressed by the majority of CD4⁺CD25^{high} T cells from the IND, CARD and NI groups when compared with the percentages of expression by CD4⁺CD25^{low} and CD4⁺CD25⁻ T cells.

4.2. Peripheral blood CD4⁺CD25^{high} cells from Chagasic patients express different levels of surface molecules

CD4⁺CD25^(high/low/negative) T cells from Chagasic patients were evaluated for expression of different cell surface markers in order to fully characterize this regulatory population in these patients. The different levels of expression of cell surface markers on T CD4⁺CD25^{high}, T CD4⁺CD25^{low}, T CD4⁺CD25⁻ subsets are shown in Table 1.

Some human T cells express CD45RA surface markers characterizing them as naive, whereas memory T cells express the CD45RO isoform. Our results show that the CD4⁺CD25^{high} T cells from Chagasic patients and non-infected individuals express low levels of CD45RA when compared to CD4⁺CD25^{low} or CD4⁺CD25⁻ subsets (Table 1). In contrast, CD45RO was expressed at significantly higher levels by CD4⁺CD25^{high} T cells than the CD4⁺CD25^{low} or CD4⁺CD25⁻ subsets. This higher expression of CD45RO on CD4⁺CD25^{high} regulatory cells was previously observed in healthy individuals (21).

We also observed that the expression of activation markers (HLA-DR, CD40L and CD69), the L-selectin CD62L, IL-10R, and the adhesion molecule (CD54/ICAM-1) on CD4⁺CD25^{high} T cells surface was increased when compared with CD4⁺CD25^{low} T cells and CD4⁺CD25⁻ T cells in all groups studied (Table 1). After stimulation with *T. cruzi* antigens we observed a decreased in the percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells in Chagasic patients expressing CD62L and IL-10R. However, the levels of HLA-DR, CD40L, CD54 and CD69 were higher on the surface of these cells in Chagasic patients when compared with non-infected individuals (Table 1). Our results show that CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells of Chagasic patients express a number of cell surface markers that are associated with activation, migration, and antigen presentation.

Immunoregulation in Chagas disease

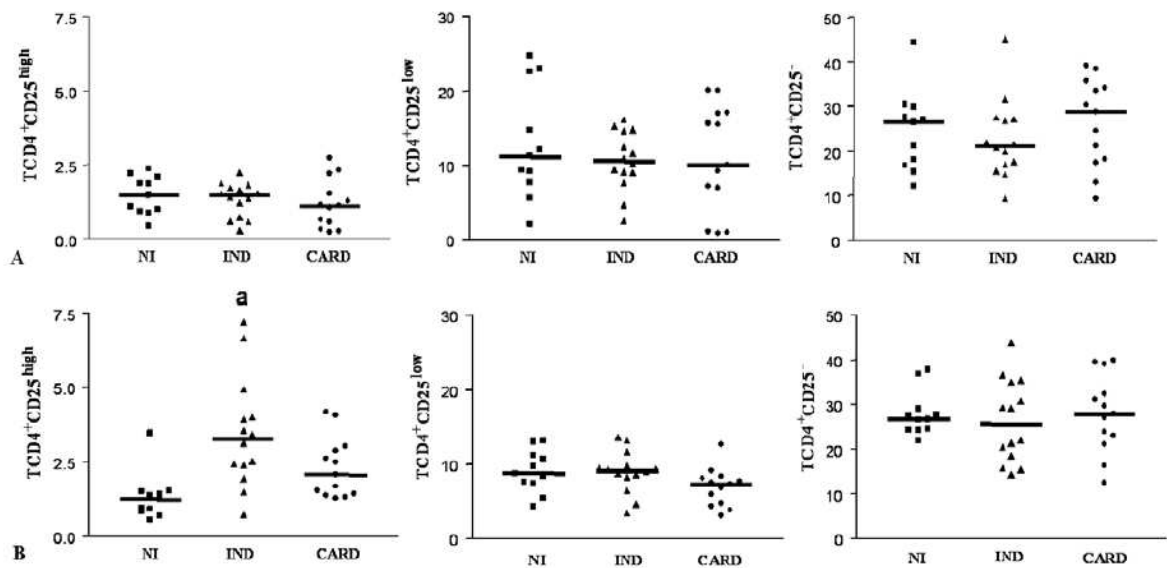


Figure 2. Percentages of CD4⁺CD25^{high} or CD4⁺CD25^{low} or CD4⁺CD25^{negative} T cells, evaluated by flow cytometry as described in Material and Methods. A) Representative *ex vivo* context. B) After stimulation with *T. cruzi* antigens (EPI). The differences between the groups are considered significant at p less than 0.05 and are represented by letters: a = different when compared to NI group

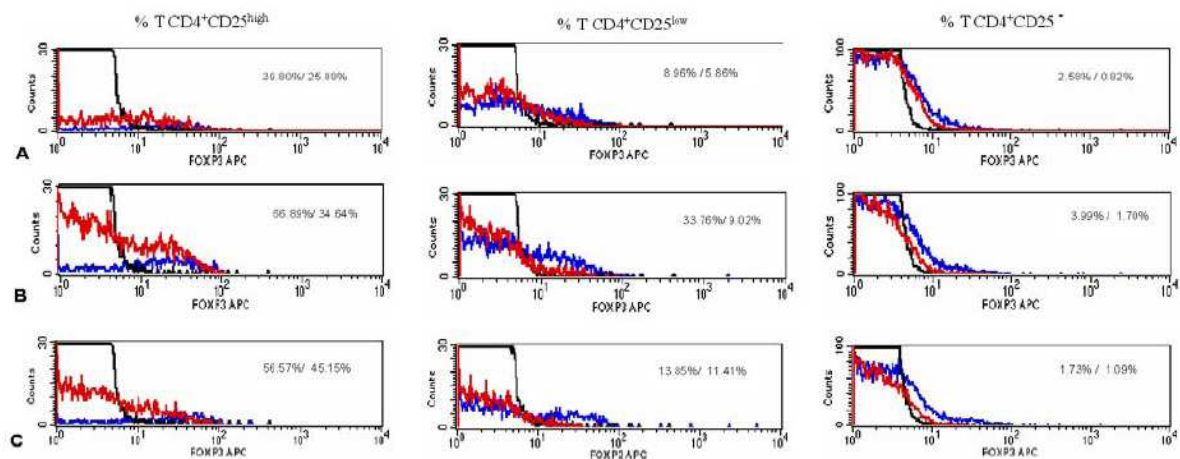


Figure 3. FOXP3 expression by CD4⁺CD25^{high} or CD4⁺CD25^{low} or CD4⁺CD25^{negative} T cells. A) Non-infected individuals. B) Patients with indeterminate form of the disease. C) Patients with cardiac form of the disease. The black line represent the isotype control, the blue line represents the *ex vivo* context and the red line represents the state after stimulation with *T. cruzi* antigens (EPI). The numbers represent the FOXP3 % of one individual or patient in *ex vivo* context and after stimulation with EPI antigens, respectively

4.3. Regulatory T cells from IND and CARD clinical forms of Chagas disease present different effector mechanism

The suppressive mechanisms by which CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells act are not yet clear. Some studies suggest that the immune suppressive activity is due to the secretion of cytokines (14). However, other investigators have suggested that suppression is due to cell-to-cell contact via CTLA-4 (21). In Figure 4, we show the expression of CTLA-4(CD152) and IL-10 on CD4⁺CD25^(high/low/negative) T cells from Chagasic patients after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens. Our results revealed a higher expression of IL-10 by CD4⁺CD25^{high} T cells in Chagasic patients, mainly in the IND group, when compared to the NI group (Figure 4). We also observed a higher frequency of CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ T cells in the CARD group when compared with NI group (Figure 4). There was no statistically significant difference in intracellular expression of IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma in CD4⁺CD25^(high/low/negative) T cells between Chagasic patients and NI individuals (data not shown).

Immunoregulation in Chagas disease

Table 1. Phenotypic analyses of CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{low} and CD4⁺CD25^{negative} T cells subsets

| Cell marker | <i>Ex vivo</i> / <i>In vitro</i> | CD25 ^{high} | CD25 ^{low} | CD25 ^{negative} |
|-------------|----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| CD45RA | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 5.97 ± 1.62 | 17.71 ± 3.53 | 35.55 ± 4.93 |
| | IND | 7.57 ± 1.91 | 21.47 ± 3.80 | 35.41 ± 4.97 |
| | CARD | 6.56 ± 2.15 | 13.66 ± 2.20 | 29.35 ± 3.79 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 5.25 ± 2.07 | 15.50 ± 2.63 | 28.49 ± 4.00 |
| CD45RO | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 90.77 ± 2.08 | 77.59 ± 3.09 | 55.29 ± 3.58 |
| | IND | 90.37 ± 2.39 | 80.05 ± 4.33 | 60.56 ± 4.75 |
| | CARD | 92.34 ± 1.83 | 82.95 ± 2.91 | 60.58 ± 3.75 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 89.88 ± 2.45 | 76.52 ± 3.11 | 59.07 ± 3.87 |
| HLA-DR | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 14.14 ± 1.80 | 3.04 ± 0.55 | 3.07 ± 1.29 |
| | IND | 14.05 ± 1.44 | 4.11 ± 1.15 | 4.52 ± 1.55 |
| | CARD | 16.82 ± 3.57 | 6.03 ± 2.37 | 4.34 ± 1.21 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 11.77 ± 1.33 | 2.28 ± 0.34 | 1.68 ± 0.34 |
| CD62L | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 91.24 ± 1.87 | 81.58 ± 2.17 | 83.03 ± 1.95 |
| | IND | 92.33 ± 1.34 | 79.35 ± 2.46 | 73.89 ± 4.28 |
| | CARD | 91.83 ± 2.02 | 77.85 ± 2.12 | 72.09 ± 3.08 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 93.30 ± 1.54 | 85.79 ± 1.62 | 86.87 ± 1.66 |
| CD40L | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 3.02 ± 1.52 | 1.47 ± 0.35 | 0.88 ± 0.18 |
| | IND | 5.17 ± 2.28 | 1.53 ± 0.41 | 0.92 ± 0.15 |
| | CARD | 4.12 ± 1.58 | 2.18 ± 0.59 | 1.03 ± 0.12 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 5.12 ± 1.24 | 4.44 ± 0.94 | 3.06 ± 0.71 |
| CD54 | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 35.92 ± 5.70 | 23.43 ± 5.00 | 12.71 ± 3.19 |
| | IND | 47.62 ± 5.42 | 38.10 ± 5.33 | 30.95 ± 4.68 ¹ |
| | CARD | 49.74 ± 7.13 | 40.41 ± 5.17 | 28.37 ± 3.27 ¹ |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 34.34 ± 5.43 | 23.58 ± 5.82 | 15.22 ± 4.60 |
| CD69 | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 0.52 ± 0.13 | 0.41 ± 0.07 | 0.23 ± 0.03 |
| | IND | 0.86 ± 0.19 | 0.44 ± 0.08 | 0.37 ± 0.07 |
| | CARD | 0.88 ± 0.40 | 0.94 ± 0.41 | 0.46 ± 0.13 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 1.47 ± 0.38 | 0.54 ± 0.15 | 0.22 ± 0.03 |
| IL-10R | <i>Ex vivo</i> | | | |
| | NI | 93.59 ± 1.66 | 72.67 ± 4.24 | 49.48 ± 4.29 |
| | IND | 91.18 ± 2.09 | 68.45 ± 4.91 | 54.73 ± 3.98 |
| | CARD | 93.76 ± 1.79 | 74.88 ± 4.17 | 52.28 ± 3.94 |
| | <i>In vitro</i> | | | |
| | NI | 20.69 ± 2.45 | 9.60 ± 1.28 | 6.48 ± 1.10 |

Values of human surface markers are expressed as % medium for each group. *Ex vivo* = before stimulation and *In vitro* = after stimulation. ¹Significantly different from NI (p less than 0.05).

5. DISCUSSION

The immunological mechanisms involved in the control of *T. cruzi* replication and in the development of

cardiac pathologies in Chagas disease are not well understood. Recent studies have determined that regulatory T cells are contained within the CD4⁺ T cell subset which control excessive or misdirected immune responses. Regulatory T cells represent approximately 10% of

Immunoregulation in Chagas disease

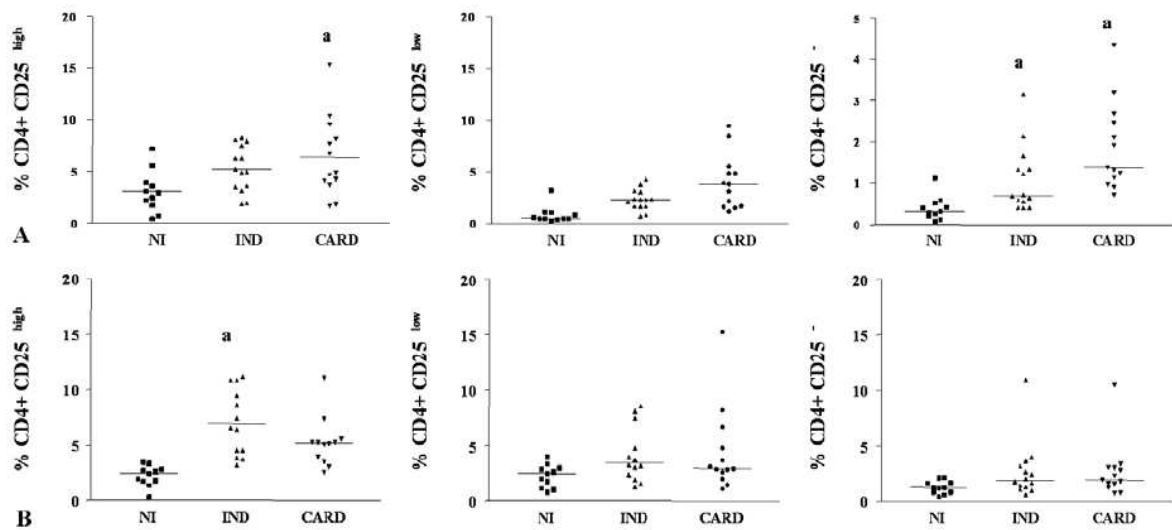


Figure 4. Percentage of CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{low} and CD4⁺CD25^{negative} T cells, evaluated by flow cytometry after a short *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigen (EPI) as described in Material and Methods. A) CTLA-4 expression. B) Intracellular cytokine IL-10 expression. The difference between a given group and the NI group is considered significant at p less than 0.05 and is indicated by the letter a placed on the graph above the group in question.

peripheral CD4⁺ cells in humans. These cells which express high levels of the cell-surface marker CD25 develop in the thymus and later enter peripheral tissues where they suppress the activation of other cells (13,22,23). Although the role of regulatory T cells has been assessed for a number of human diseases, little is known about their role in Chagas disease. Here, we show that there is an increase in the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells in the peripheral blood of patients with the IND form of the disease, suggesting that these cells could be involved in the control of morbidity in Chagas disease.

We also show that a higher percentage of CD4⁺CD25^{high} T cell population from patients with the IND form of the disease express FOXP3 and IL-10 when compared to the other groups of individuals evaluated (Figure 3 and 4). As previously described by Gomes *et al.*, 2003, IL-10 has a key role in regulating type 1 inflammatory response to infection and in the control of parasite replication in the heart and other host tissues during the chronic phase of the disease. This immunoregulatory cytokine has also been suggested to be involved in the mechanisms by which regulatory T cells exert their suppressive activity *in vivo* (24). The ability of regulatory T cells to inhibit Type 1 responses, especially IFN-gamma production, further support our previous results showing that PBMC from patients with the IND form of the disease produce low levels of IFN-gamma (8). This suggests that regulatory T cells may be involved in the regulation of the excessive Type 1 immune response observed in patients with the CARD form of the disease. Based on our results, and those previously published, it is possible that the regulatory role of IL-10 is due to an increase in the number of regulatory T cells.

Among the most important markers of regulatory T cells is the forkhead transcription factor FOXP3 (25). This marker plays a key role in regulatory T cell function and is a specific marker for these cells (26,27). Previously published studies have consistently reported that FOXP3 is predominantly expressed by both human and murine CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. We analyzed FOXP3 protein expression in peripheral blood before and after stimulation with *T. cruzi* antigens. Our data confirm that the majority of FOXP3 cells are indeed CD4⁺CD25^{high}. Although CD4⁺CD25^{high} have higher expression of FOXP3, low expression of this protein was also observed in CD4⁺CD25^{low} and CD4⁺CD25⁺ T cells. Similar results have been found for other infections (16,28,29). Whether low FOXP3 expression can modulate/suppress T cell and/or antigen-presenting cell activation or can convert non-regulatory CD4⁺ T cells into regulatory T cells is still not clear, and future studies are required to answer these questions. We also observed that, besides expression of FOXP3, the CD4⁺CD25^{high} cell population in Chagasic patients also expresses several other cell-surface markers that included CD45RO and CTLA-4 (Table 1, Figure 2 and 3), further supporting the role of CD4⁺CD25⁺ T cells as regulatory T cells.

Although CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are selected by high affinity interactions with self-peptide in the thymus, it is now apparent that these cells respond to numerous environmental stimuli in the periphery (30). Currently, the antigenic specificity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells remains unknown. However, there is evidence that they can mount a recall response to foreign antigens (30,31). It has been shown that CD4⁺CD25⁺ T cells isolated from the skin of *Leishmania major*-infected

Immunoregulation in Chagas disease

mice suppressed IFN-gamma production by *L. major* reactive CD4⁺CD25⁺ effector cells in the presence of *L. major* infected dendritic cells but not in uninfected animals (12). In the present study we observed that the percentage of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells, after *in vitro* stimulation with specific *T. cruzi* antigens, was higher in Chagasic patients. More importantly we show that this marker increase occurred mainly in cells from patients with the IND form of the disease also suggesting a role for CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in the control of pathology in *T. cruzi* infected individuals (Figure 2). To demonstrate the specificity of this, response cells from the same individuals were stimulated with unrelated antigens from *Schistosoma mansoni* or *L. major*, and the preliminary data show that the percentage of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells was lower (data not shown). Although these results support previous suggestions that regulatory T cells have a large repertoire capable of recognizing both self and foreign peptides, one cannot rule out the possibility that they react to heart specific antigens whose expression is regulated/elicited by infection with the *T. cruzi*.

It has been demonstrated that human T cells from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease present an increased expression of class II MHC molecules in the peripheral blood (32). We have shown that CD4⁺CD25^{high} T cells from Chagasic and NI individuals express HLA-DR. It has also been demonstrated that MHC-II expression on human CD4⁺CD25^{high} T cells identifies a functionally distinct population of T regulatory cells that induces early contact-dependent suppression associated with high FOXP3 expression (21).

The expression of CTLA-4 occurs in regulatory T cells (17,34,35) and it may be functionally important. Indeed, anti-CTLA-4 treatment abrogates the ability of regulatory T cells to inhibit colitis (17,34) and also induces the development of gastritis in normal mice (35). In our study we observed a high percentage of CD4⁺CD25^{high} T cells from patients with the CARD form of the disease expressing CTLA-4 (Figure 4A). Our results suggest that Type 1 immune response is the main immune mechanism involved in the genesis and/or maintenance of heart pathology in Chagas disease (8,9). Therefore, it is possible that the elevated expression of CTLA-4 may be the mechanism by which inhibition of IL-10 secretion by macrophages occurs, leading to development of severe heart disease.

In conclusion, CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells from the IND patients seem to reduce the severity of type 1 responses to *T. cruzi* infection. Thus, regulatory T cells, may be beneficial to patients with the IND form of the disease through expression of IL10 and maintenance of a balance among efficient effectors that kill the parasites. However, CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells from patients with the CARD form of the disease could contribute to the development of severe heart pathology through CTLA-4 and suppression of anti-pathogen protective immune responses. Therefore, the differences in host-parasite interaction may be influenced by the ratio of regulatory to effector T cells.

The results presented in this paper provide the first evidence that *T. cruzi* infection induces the presence of regulatory T cells. This finding raises several important questions such as how do regulatory mechanisms by CD4⁺CD25^{high} abrogate the development of heart damage in some patients and allow the development of pathology in others. Functional studies to characterize this population are being conducted and may provide a better understanding of the immunological complexities that control the course of indeterminate clinical form of Chagas disease and determine whether a patient will remain at the indeterminate stage of the disease or progress to the cardiac and/or digestive forms of the disease.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Fernanda Fortes Aratijo and Juliana Assis Silva Gomes contributed equally to this manuscript. This work was supported by CAPES, CNPq, FIOCRUZ and NIH HL66480-02. We thank Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz for excellent technical assistance in flow cytometry and Dr. Flávio Guimarães da Fonseca and Dra. Joseli Lannes Vieira for critical review of the manuscript.

7. REFERENCES

1. World Health Organization Programme Report of the UNDP/World Bank/Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, (Geneva, Switzerland) (2002)
2. Dias J.C.P and J. Coura: Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, (1997)
3. Jones E.M, D.G. Colley, S. Tostes, E.R. Lopes, C.L. Vnencak, Jones, T.L. McCurley: Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human Chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48(3), 348. 357 (1993)
4. Brener Z, R.T. Gazzinelli: Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114(2),103. 110 (1997)
5. Higuchi M.D., M.M. Reis, V.D. Aiello, L.A. Benvenuti, P.S. Gutierrez, G. Bellotti, F.Pileggi: Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, Chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 56(5), 485. 489 (1997)
6. Hunter C.A, L.A. Ellis. Neyes, T. Slifer, S. Kanaly, G. Grunig, M. Fort, D. Rennick and F.G.Araujo: IL. 10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol* 158, 3311. 3316 (1997)
7. Golgher D, R.T. Gazzinelli: Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37(5), 399. 409 (2004)
8. Gomes J.A, L.M. Bahia. Oliveira, M.O. Rocha, O.A. Martins. Filho, G. Gazzinelli, R. Correa. Oliveira: Evidence

Immunoregulation in Chagas disease

- that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1. specific immune response. *Infect Immun* 71(3), 1185. 1193 (2003)
9. Gomes J.A, L.M. Bahia, Oliveira, M.O. Rocha, S.C. Busek, M.M. Teixeira, J.S. Silva, R. Correa. Oliveira: Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 73(12), 7960. 7966 (2005)
10. Bach J.F: Non. Th2 regulatory T cell control of Th1 autoimmunity. *Scand. J. Immunol* 54, 21 (2001)
11. Sacks D and N. Noben. Trauth: The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol* 2, 845 (2002)
12. Belkaid Y, C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, D.L. Sacks: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420(6915), 502. 507 (2002)
13. Mills K.H: Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4(11), 841. 55 (2004)
14. Liu H, B. Hu, D. Xu & F.Y. Liew: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL. 10, TGF. beta and CTLA. 4. *J. Immunol* 171, 5012. 5017 (2003)
15. Powrie F, J. Cartino, M.W. Leach, S. Mauze and R.L. Coffman: A critical role for transforming growth factor. beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1. mediated colitis by CD45RBlowCD4⁺ T cells. *J. Exp. Med* 183, 2669. 2674 (1996)
16. Fontenot J.D, M.A. Gavin and A.Y. Rudensky: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunol* 4, 330. 336 (2003)
17. Read S, V. Malmstrom and F. Powrie: Cytotoxic T lymphocyte. associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192, 295. 302 (2000)
18. Hara M, C.I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S.E. Turvey, A.R. Bushell, P.J. Morris, F. Powrie, K.J. Wood: IL. 10 is required for t cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J.Immunol* 166, 3789. 3796 (2001)
19. Cardoso G.M, M.J.Morato, J.A.Gomes, M.O. Rocha, I.P. Bonfim, S. Williams. Blangero, J.L. VandeBerg, M.R. Reis, E.F. Magalhaes, R.Correa. Oliveira: Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci* 11, 1158. 1163 (2006)
20. Jung T, U. Schauer, C. Heusser, C. Neumann and C. Rieger: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol Methods* 159, 197. 207 (1993)
21. Baecher. Allan C, J.A. Brown, G.J. Freeman, D.A. Hafler: CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167(3), 1245. 1253 (2001)
22. Cozzo C, J. Larkin and A.J. Caton: Self. peptides drive the peripheral expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 5878. 5882 (2003)
23. Bluestone J.A and A.K. Abbas: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Rev. Immunol* 3, 253. 257 (2003)
24. O'Garra A, P.L.Vieira, P.Vieira, A.E.Goldfeld: IL. 10. producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Investig* 114, 1372. 1378 (2004)
25. Fontenot J.D and A.Y. Rudensky: A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor FOXP3. *Nature Immunol* 6(4), 331. 337 (2005)
26. Hori S, T. Nomura, S. Sakaguchi: Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3. *Science* 299,1057. 1061 (2003)
27. Ramsdell F: FOXP3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19, 165. 168 (2003)
28. Furtado G.C, M.A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, J.J. Lafaille: Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196, 851. 857 (2002)
29. Kaestner K.H, W. Knochel, D.E. Martinez: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14, 142. 146 (2000)
30. Thompson C & F. Powrie: Regulatory T cells. *Current Opinion in Pharmacology* 4,408. 414 (2004)
31. Belkaid Y & B.T. Rouse: Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology* 6, 353. 360 (2005)
32. Dutra W.O, Z.M.P. da Luz, J.R. Cançado, M.E. Pereira, R.M. Brigido. Nunes, L.M.C. Galvão, D.G. Colley, Z. Brener, G. Gazzinelli & J.F. Carvalho. Parra: Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from Chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunol* 18, 1. 7 (1996)
33. Baecher. Allan C, E. Wolf, D.A. Hafler: MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *J Immunol* 176(8), 4622. 4631 (2006)
34. Salomon B, D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, J.A. Bluestone: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431. 440 (2000)
35. Takahashi T, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, S. Sakaguchi. Immunologic self. tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte. associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303. 310 (2000)

Immunoregulation in Chagas disease

Key Words: Chagas disease, Regulatory T cells, Cytokines, *Trypanosoma cruzi*

Send correspondence to: Dr. Rodrigo Correa-Oliveira, Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Tel: 55-31-33497777 Fax: 55-31-32953566, E-mail: correa@cpqrr.fiocruz.br

<http://www.bioscience.org/current/vol12.htm>



Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Characterization of the presence and distribution of Foxp3⁺ cells in chagasic patients with and without megacolon

Alexandre B.M. da Silveira ^{a,*}, Fernanda Fortes de Araújo ^b, Michelle A. Ribeiro Freitas ^c, Juliana Assis Silva Gomes ^b, Ana Thereza Chaves ^b, Enio C. de Oliveira ^d, Salustiano G. Neto ^d, Alejandro O. Luquetti ^d, Gilmar da Cunha Souza ^a, Roberto Bernardino Júnior ^a, Ricardo Fujiwara ^b, Débora d'Ávila Reis ^e, Rodrigo Correa-Oliveira ^b

^a Human Anatomy Sector, Biomedical Institut Sciences, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^b Research Center Renê Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil

^c Parasitology Sector, Biomedical Institut Sciences, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

^d Department of Surgery, Medical School, Universidade Federal de Goiás, Brazil

^e Department of Morphology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2008

Received in revised form 16 October 2008

Accepted 22 October 2008

Available online 18 November 2008

Keywords:

Chagas's disease

Chagasic megacolon

Inflammatory process

Foxp3 cells

ABSTRACT

Patients with Chagas's disease in the chronic phase regularly present with the chagasic megacolon. This form is characterized by inflammation, neuronal destruction, and organ dilatation. Chagasic patients with megacolon always present with inflammatory process near the enteric plexuses of the colon, as previously demonstrated. The aim of this study is to characterize the presence and distribution of Foxp3⁺ cells in the muscle layers and neuronal plexuses area of the colon from chagasic patients with and without megacolon. Our results demonstrated that chagasic patients without megacolon presented with an increased concentration of Foxp3⁺ cells in all colon layers compared with chagasic patients with megacolon and noninfected individuals. These cells were situated mainly near the blood vessels and rarely were associated with the inflammatory foci. We believe that the presence of Foxp3⁺ cells may help to control the inflammatory process through the management of lymphocyte migration and, consequently, prevent neuronal destruction and chagasic megacolon development.

© 2009 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Chagas's disease, or American trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma cruzi*, is one of the most important endemic diseases in Brazil and Latin America, with more than 11 million infected individuals on the South American continent and 120 million at risk of acquiring the disease [1]. This infection has a variable clinical course, with most individuals with the indeterminate form remaining free of alterations. However, other patients may progress to the severe chronic form, with involvement of the heart or digestive tract (mainly the megaesophagus and megacolon). Megacolon is the second most frequent and important digestive manifestation and might be present alone or in association with dilatations of other parts of the digestive tract. This form of Chagas's disease preferentially affects the sigmoid colon and can extend as far as the rectum in 80% of cases [2].

The inflammatory processes found in the muscle layers and neuronal plexuses of the colon are associated with a substantial reduction in the number of neurons [3]. This loss of neurons has been thought to underlie the clinical findings in megasyndromes. Although neuronal ganglionitis and myositis have been described in the colon of chagasic patients, the phenotypes of inflammatory cells associated with the lesions have not been extensively studied [4,5]. Evidence for active T-cell-mediated regulatory mechanisms was found in the 1970s with the discovery of "suppressor T cells," or T regulatory cells (Treg) [6,7]. The best used Treg marker is a transcription factor called Foxp3. In 2003, three independent groups reported that Foxp3 is highly expressed in the CD4⁺ CD25⁺ T-cell subset. Further analyses have confirmed Foxp3 as a key gene for Treg generation and maintenance [8,9]. Moreover, previous studies of Chagas's disease demonstrated that chagasic patients with indeterminate form presented a high concentration of CD4⁺ CD25⁺ T-cell subset compared with that of chagasic patients with the severe form of cardiopathy [10].

* Corresponding author.

E-mail address: alec@icbim.ufu.br (A.B.M. da Silveira).

For that reason, the objective of this study was to use the peroxidase immunohistochemistry technique to characterize the presence and distribution of Foxp3⁺ cells in colon layers from chagasic patients with and without chagasic megacolon and noninfected individuals. Samples of full-thickness colon wall tissue were obtained from 12 chagasic patients with megacolon, 12 chagasic patients without megacolon, and 14 control individuals submitted for necropsy or surgical procedures at the Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Minas Gerais, Brazil). Patients' details are described in Table 1. All chagasic patients have been followed for many years because of Chagas's disease infection and they were selected for this study because they developed only the megacolon form of the disease. Reasons for tissue resection included colon complications caused by Chagas's disease, whereas noninfected individuals had adenocarcinoma or diverticular disease as the main reasons. All surgical specimens were collected from the same topographic region of the colon (rectum and sigmoid) and the patients were submitted to low anterior resection or Duhamel procedure. Patients did not receive any parasite-specific treatment. Informed consent was obtained from the patient or family members prior to tissue procurement and this work was approved by the UFMG Research

Ethics Committee (ETIC No. 127/03). Tissue samples were collected from the rectosigmoid region, fixed in 4% neutral buffered formaldehyde solution, and embedded in paraffin blocks. Paraffin sections were performed and deparaffinized using xylene and rehydrated through graded alcohols. The hematoxylin and eosin (H&E) coloration technique was applied in each case for the evaluation of inflammatory processes. The inflammation degree was measured according to the followed scale: no inflammation = 0, sparse inflammatory foci = 1, moderate inflammation = 2, intense inflammation = 3. Endogenous peroxidase was inhibited and the slides were then incubated with 2% normal swine serum (Sigma, San Diego, CA) in phosphate-buffered saline for 30 minutes and subsequently with anti-human Foxp3 (eBioscience, code 14-4776, Los Angeles, CA). Subsequently, the tissue sections were incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse antibodies (Dako, Los Angeles, CA) for 45 minutes, and peroxidase activity was detected by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) and hydrogen peroxide for 10 minutes. Slides were counterstained with Gill's hematoxylin (Sigma), dehydrated in graded alcohols, and mounted in synthetic mounting medium. Negative control slides without primary antibody were examined for each case. The enumeration of Foxp3⁺ cells was carried out in the muscle layers and in the submucosal and myenteric plexuses by counting 20 randomly selected fields per studied layer (total area 1066 μm^2) on a single slide per patient. All sections used in this study were randomly chosen. In the beginning of the study, all patients were coded and the analyses were performed in a double-blinded manner; the readers did not know whether the slide came from a noninfected or a megacolon patient. Only at the end of the analyses were the patients put together. Pictures were prepared using CorelDraw 13 (Microsoft) and statistical analysis among the different groups was performed using one-way analysis of variance. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

By H&E histology, it was observed that whereas noninfected individuals did not present with inflammatory processes (Figure 1A), chagasic patients without megacolon presented with light inflammatory foci (Figure 1B) and chagasic patients with megacolon presented with intense inflammatory foci in several sites (Figure 1C). Noninfected individuals did not present with any sign of inflammation. The inflammatory process was concentrated mainly near the neuronal ganglia, as previously reported [3]. Statistical analyses of the presence of Foxp3⁺ T cells demonstrated that chagasic patients without megacolon displayed a significantly increased concentration of Foxp3⁺ cells (Table 2) compared with the chagasic patients with megacolon (Figures 1E and F) and noninfected individuals (Figure 1D). It is interesting to note that Foxp3⁺ cells were located mainly near blood vessels (Figure 1E), whereas these same cells were not reported in inflammatory foci (Figure 1F).

Foxp3 is a master regulator of immune homeostasis expressed specifically in CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells, controlling their growth, development, and function, and Foxp3 cells are generally accepted as expressed in both mouse and human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [8]. Foxp3⁺ cells play an important role in intestinal homeostasis. Strikingly, previous studies demonstrated that these cells can also be involved in the cure of established colitis, which is associated with their proliferation in the intestine [11]. However, several factors have been identified as critical for Foxp3⁺ cell functions, including interleukin (IL)-10, IL-2, transforming growth factor- β , and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. A micro-environment is necessary for these cells act as regulatory T cells [12,13]. One of the main causes of megacolon development is the denervation caused by inflammatory processes. Our results indicate that the presence of Foxp3 cells has a direct relation with a

Table 1
Patient and tissue characteristics

| Patients | Age/Gender | Inflammatory process intensity |
|--|------------|--------------------------------|
| Non infected individuals | | |
| Code 1 | 62/M | 0 |
| Code 3 | 55/M | 0 |
| Code 5 | 71/F | 0 |
| Code 6 | 56/F | 0 |
| Code 8 | 52/M | 0 |
| Code 10 | 48/F | 0 |
| Code 13 | 66/F | 0 |
| Code 17 | 62/F | 0 |
| Code 19 | 57/M | 0 |
| Code 20 | 59/M | 0 |
| Code 22 | 62/M | 0 |
| Code 29 | 68/F | 0 |
| Code 31 | 67/F | 0 |
| Code 32 | 66/M | 0 |
| Chagasic patients without megacolon | | |
| Code 9 | 54/F | 1 |
| Code 11 | 67/M | 1 |
| Code 12 | 65/F | 1 |
| Code 15 | 66/F | 2 |
| Code 21 | 69/F | 1 |
| Code 25 | 71/M | 2 |
| Code 27 | 63/F | 1 |
| Code 30 | 74/M | 1 |
| Code 33 | 72/M | 2 |
| Code 36 | 64/F | 2 |
| Code 37 | 60/M | 1 |
| Code 38 | 59/F | 1 |
| Chagasic patients with megacolon | | |
| Code 2 | 65/M | 3 |
| Code 4 | 62/M | 3 |
| Code 7 | 52/F | 3 |
| Code 14 | 62/M | 3 |
| Code 16 | 59/M | 3 |
| Code 18 | 48/F | 3 |
| Code 23 | 61/F | 3 |
| Code 24 | 75/F | 3 |
| Code 26 | 52/M | 3 |
| Code 28 | 53/M | 3 |
| Code 34 | 59/F | 3 |
| Code 35 | 63/M | 3 |

The patients were coded randomly before the tissue study and the results were analyzed in a double-blinded manner. The degree of inflammatory process was graded using the followed scale: no inflammation = 0, sparse inflammatory foci = 1, moderate inflammation = 2, intense inflammation = 3.

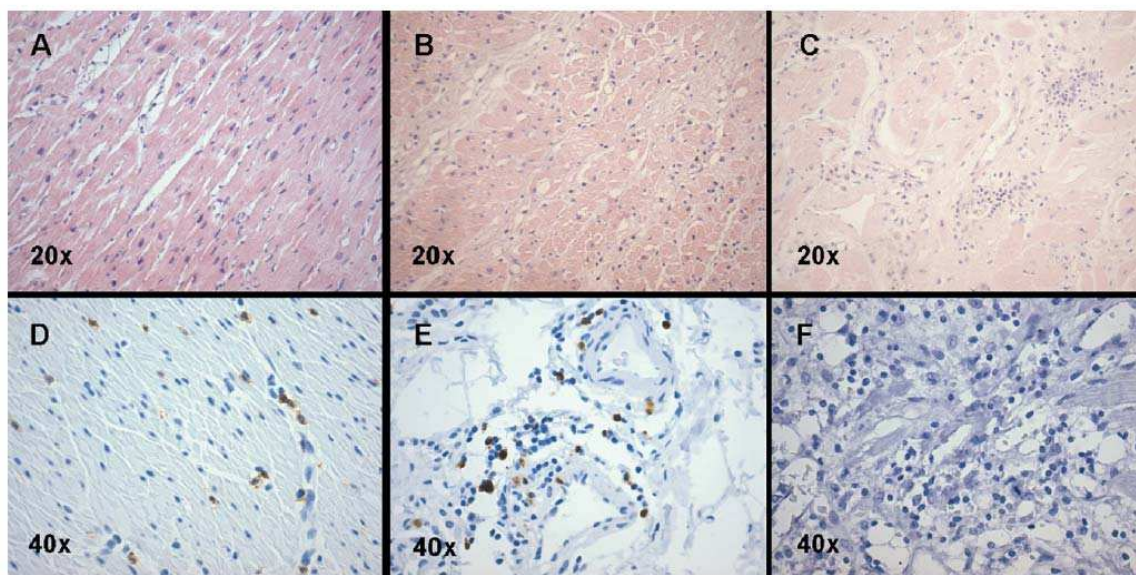


Figure 1. H&E coloration and immunohistochemistry of Foxp3⁺ cells in the colons of chagasic patients and noninfected individuals. H&E staining demonstrated the absence of inflammatory processes in noninfected individuals (A), a mild inflammatory process in chagasic patients without chagasic megacolon (B), and an intense process in patients with chagasic megacolon (C). Foxp3 immunohistochemistry demonstrated that noninfected individuals present with a low presence of Foxp3⁺ cells (D), whereas chagasic patients without megacolon demonstrate a high concentration of these cells near the blood vessels (E). Lymphocytes were almost nonexistent in chagasic patients with megacolon and they were not found in the inflammatory foci (F).

moderate inflammatory process in chagasic patients. Knowing that Foxp3 cells are involved with inflammation control and that chagasic patients without megacolon present with an increased concentration of these cells, we can suggest that these cells may represent a mechanism used in chagasic patients to prevent exacerbation of the inflammation and consequently avoid megacolon development. For this reason, chagasic patients who present with a large number of Foxp3⁺ cells remain at a low inflammatory grade, which may represent a fortification against megacolon development in this group. We believe that a new field of research on Chagas's disease has been opened. The next step in immunological research on chagasic megacolon will be to compare the presence of these cells in the affected tissue and in the peripheral blood of the same patients. Characterization of IL-10, IL-2, transforming growth factor- β , and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 may help to elucidate the participation of Foxp3⁺ cells in the establishment of chagasic megacolon. In the future, these data may provide a basis for new treatments in Chagas's disease.

Table 2
Mean number of Foxp3 cells in the colons of chagasic patients with and without megacolon and noninfected individuals

| Mean number of Foxp3 cells in the colon of chagasic patients with and without megacolon and non infected individuals | |
|--|-----------------------------|
| Patients | Mean number of Foxp3+ cells |
| Non infected individuals | 15 \pm 3 |
| Chagasic patients without megacolon | 92 ^{ab} \pm 7 |
| Chagasic patients with megacolon | 19 \pm 3 |

^aStatistically significant difference between this group and noninfected individuals;

^bStatistically significant difference between this group and chagasic patients with megacolon. All statistical analyzes were performed with using one-way analysis of variance ($p < 0.05$).

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Programa de Apoio a Pesquisa Estrategica em Saude, Fiocruz, Ministério da Saude, Brazil.

References

- [1] Dias JC. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica* 2006;22:2020–1.
- [2] Koberle G. [Chagas disease in domestic animals. Quantitative studies of the ganglion cells of the plexus myentericus]. *Z Tropenmed Parasitol* 1968;19:83–94.
- [3] da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* 2007;38:1256–64.
- [4] da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology* 2007;134:789–96.
- [5] Corbett CE, Ribeiro U Jr, Prianti MG, Haber-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum* 2001;44:993–8.
- [6] Gershon RK. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26:170–85.
- [7] Pillai V, Karandikar NJ. Human regulatory T cells: a unique, stable thymic subset or a reversible peripheral state of differentiation? *Immunol Lett* 2007;114:9–15.
- [8] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
- [9] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
- [10] Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al. Potential role of CD4+CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 2007;12:2797–806.
- [11] Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852–60.
- [12] Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111–9.
- [13] Arantes RM, Marche HH, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Pathol* 2004;164:1361.



Correspondence

Expression of caspase-3 in enteric cells is related to development of chagasic megacolon

Chagas disease is endemic in many regions of Brazil as in most countries of Latin America. The World Health Organization estimates that there are 11 million infected people in Latin America and 2 to 3 million patients with chronic complications of the disease. Microscopically, a common observation in chagasic megacolon is the neuronal loss in both plexuses [1]. We believe that the denervation observed in chagasic megacolon can be caused by both parasite injury and by apoptosis.

Apoptosis is a form of programmed cell death and involves a series of biochemical events leading to characteristic cell morphology and death. The process of apoptosis is controlled by a diverse range of cell signals, which may originate in either extracellular or intracellular areas. The apoptosis cascade is always initiated by activation of caspase-3. This protein is activated in apoptotic conditions and executes the apoptosis process [2]. In the digestive form of Chagas disease, as in the immune system, the parasite has a role in neuronal death [3]. Our hypothesis is that the apoptosis mechanisms may be involved in the development of chagasic megacolon.

To evaluate this, our group used a peroxidase immunohistochemistry technique to analyze caspase-3 expression in colon samples from full-thickness colon wall tissue obtained from 12 chagasic patients with megacolon, 12 chagasic patients without megacolon, and 14 control individuals submitted to necropsy or surgical procedures at Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Minas Gerais, Brazil). Patients did not receive any parasite-specific treatment. Informed consent was obtained from the patient or family members prior to tissue procurement, and this work was approved by the UFMG Research Ethics Committee (ETIC no 127/03). Tissue samples were prepared according to the methods described in da Silveira et al 2008 [4]. To localize the apoptotic cells, the antihuman caspase-3 (IMGENEX, Cod. IMG-144A, San Diego, CA) was used. The immunohistochemistry protocol and the data analysis methods were performed according to the methods described in da Silveira et al 2008 [4]. The hematoxylin-eosin staining technique was applied in each case to evaluate the inflammatory process.

The study of hematoxylin-eosin histological sections revealed that the inflammatory process is intense in chagasic patients with megacolon, light in chagasic patients without megacolon, and absent in noninfected individuals, as reported earlier [5]. Nevertheless, the immunohistochemistry results revealed that the number of apoptotic neurons and muscle cells was statistically greater in chagasic patients without megacolon compared with the other groups.

It is well known that chagasic megacolon is a result of intense neuronal destruction, and it is related to dilatation, intensification of the inflammatory process, and sometimes to intestinal constipation [5]. We believe that apoptosis of infected cells (neurons, enterogial cells, muscle cells, and inflammatory cells) may avoid magnification of the inflammatory process, preventing destruction of neurons and development of megacolon. In previous studies, our group demonstrated that Foxp3⁺ cells are present in high concentrations in chagasic patients without megacolon [4] and are probably involved in the activation of apoptosis in damaged cells, which represents a defense against Chagas disease evolution.

Alexandre B.M. da Silveira PhD
*Human Anatomy Sector
Biomedical Institut Sciences
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil
E-mail address: alec@icbim.ufu.br*

Ana Thereza Chaves
Fernanda Fortes de Araújo
Juliana Assis Silva Gomes
Rodrigo Correa-Oliveira
Ricardo Toshio Fujiwara
*Research Center René Rachou
Fundação Oswaldo Cruz
Belo Horizonte, Brazil*

Michelle A. Ribeiro Freitas
*Parasitology Sector
Biomedical Institut Sciences*

*Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil*

Enio C. de Oliveira
Salustiano G. Neto
Alejandro O. Luquetti
*Department of Surgery
Medical School
Universidade Federal de Goiás, Brazil*

Débora d'Ávila Reis
*Department of Morphology
ICB, Universidade Federal de Minas Gerais
Brazil*

doi:10.1016/j.humpath.2008.12.018

References

- [1] Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41:193-6.
- [2] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008;27:6194-206.
- [3] da Silveira AB, Arantes RM, Vago AR, et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 2005;131:627-34.
- [4] da Silveira AB, Fortes de Araujo F, Freitas MA, et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol* 2008.
- [5] da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *HUM PATHOL* 2007; 38:1256-64.

Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease

Jacqueline Araújo Fiuza^{1,2}, Ricardo Toshio Fujiwara^{1,3}, Juliana Assis Silva Gomes¹, Manoel Otávio das Costa Rocha⁴, Ana Thereza Chaves^{1,2}, Fernanda Fortes de Araújo¹, Rafaelle Christine Gomes Fares¹, Andrea Teixeira-Carvalho¹, Olindo de Assis Martins-Filho¹, Guilherme Grossi Lopes Cançado³, Rodrigo Correa-Oliveira^{1*}

1 Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil, **2** Santa Casa de Misericórdia de BH, Pós-graduação em Biomedicina e Clínica Médica, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil, **4** Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil

Abstract

Background: Chronic Chagas disease presents several different clinical manifestations ranging from asymptomatic to severe cardiac and/or digestive clinical forms. Several studies have demonstrated that immunoregulatory mechanisms are important processes for the control of the intense immune activity observed in the chronic phase. T cells play a critical role in parasite specific and non-specific immune response elicited by the host against *Trypanosoma cruzi*. Specifically, memory T cells, which are basically classified as central and effector memory cells, might have a distinct migratory activity, role and function during the human Chagas disease.

Methodology/Principal Findings: Based on the hypothesis that the disease severity in humans is correlated to the quality of immune responses against *T. cruzi*, we evaluated the memory profile of peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes as well as its cytokine secretion before and after *in vitro* antigenic stimulation. We evaluated cellular response from non-infected individuals (NI), patients with indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. The expression of CD45RA, CD45RO and CCR7 surface molecules was determined on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes; the pattern of intracellular cytokines (IFN- γ , IL-10) synthesized by naive and memory cells was determined by flow cytometry. Our results revealed that IND and CARD patients have relatively lower percentages of naive (CD45RA^{high}) CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, statistical analysis of *ex-vivo* profiles of CD4⁺ T cells showed that IND have lower percentage of CD45RA^{high} in relation to non-infected individuals, but not in relation to CARD. Elevated percentages of memory (CD45RO^{high}) CD4⁺ T cells were also demonstrated in infected individuals, although statistically significant differences were only observed between IND and NI groups. Furthermore, when we analyzed the profile of secreted cytokines, we observed that CARD patients presented a significantly higher percentage of CD8⁺CD45RA^{high} IFN- γ -producing cells in control cultures and after antigen pulsing with soluble epimastigote antigens.

Conclusions: Based on a correlation between the frequency of IFN- γ producing CD8⁺ T cells in the T cell memory compartment and the chronic chagasic myocarditis, we propose that memory T cells can be involved in the induction of the development of the severe clinical forms of the Chagas disease by mechanisms modulated by IFN- γ . Furthermore, we showed that individuals from IND group presented more T_{CM} CD4⁺ T cells, which may induce a regulatory mechanism to protect the host against the exacerbated inflammatory response elicited by the infection.

Citation: Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JAS, Rocha MOdC, Chaves AT, et al. (2009) Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis 3(9): e512. doi:10.1371/journal.pntd.0000512

Editor: Ana Rodriguez, New York University School of Medicine, United States of America

Received: March 26, 2009; **Accepted:** August 4, 2009; **Published:** September 9, 2009

Copyright: © 2009 Fiuza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Sources of support was provided by CNPq, FAPEMIG, PAPES IV-FIOCRUZ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: correa@cpqrr.fiocruz.br

Introduction

Infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi* is a major cause of morbidity and mortality in Central and South America, accounting for 12,500 deaths per year [1,2]. The acute phase of infection is characterized by intense and evident blood parasitemia and may result in death. Upon infection, both the innate and adaptive immune responses lead to the control of parasite levels in the acute

phase of the infection, but are insufficient for complete clearance of the *T. cruzi*. However, this phase is generally followed by an asymptomatic or indeterminate phase, during which there are no clinical symptoms or clear evidence of the presence of the parasite. The asymptomatic phase may last months to decades. Thus, most individuals are infected for life, with parasites persisting primarily in muscle cells, and approximately 30% of the individuals developing cardiac clinical form of Chagas disease [3,4].

Author Summary

Chagas disease is a parasitic infection caused by protozoan *Trypanosoma cruzi* that affects approximately 11 million people in Latin America. The involvement of the host's immune response on the development of severe forms of Chagas disease has not been fully elucidated. Studies on the immune response against *T. cruzi* infection show that the immunoregulatory mechanisms are necessary to prevent the deleterious effect of excessive immune response stimulation and consequently the fatal outcome of the disease. A recall response against parasite antigens observed in *in vitro* peripheral blood cell culture clearly demonstrates that memory response is generated during infection. Memory T cells are heterogeneous and differ in both the ability to migrate and exert their effector function. This heterogeneity is reflected in the definition of central (T_{CM}) and effector memory (T_{EM}) T cells. Our results suggest that a balance between regulatory and effectors T cells may be important for the progression and development of the disease. Furthermore, the high percentage of central memory $CD4^+$ T cells in indeterminate patients after stimulation suggests that these cells may modulate host's inflammatory response by controlling cell migration to tissues and their effector role during chronic phase of the disease.

The scarce parasitism during the chronic phase, the prolonged latent period that precedes morbidity, and the intriguing existence of different clinical forms as well as a clear involvement of the immune response, have led several authors to evaluate the involvement of auto-immune factors in the pathogenesis of the disease. Some authors have pointed out the existence of cross-reactions between host tissues and *T. cruzi* antigens [5–14]. However, the demonstration of the presence of *T. cruzi* or its antigens by immunohistochemical techniques or of *T. cruzi* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in inflamed myocardial tissues suggest that parasite antigens may be necessary to trigger the inflammatory process [15–17]. Therefore, both processes may be involved on the development of the severe clinical forms of the disease and may act synergistically as the disease progresses.

Although a significant percentage of the patients will develop the severe forms of the disease, a larger proportion remains asymptomatic throughout life. These observations have stimulated several investigators to study the processes involved on the development of severe pathology as well as on the maintenance of the asymptomatic forms of Chagas disease. In fact, many studies have demonstrated that immunoregulatory mechanisms are important for the control of infection, possibly affecting disease morbidity in chronic clinical forms [18–20]. We have recently observed that patients with the indeterminate (IND) clinical form of chronic Chagas disease have higher percentages of $CD4^+CD25^{high}$ T cell population secreting IL-10 expressing FOXP3 [18]. These data suggest that an increase in the secretion of IL-10 by regulatory T cells during the chronic phase of the disease may be associated with protection of the host against the severe pathology induced by type 1 immune response [18,21,22].

Immunity to *T. cruzi* is complex, minimally involving a substantial antibody response and the activation of appropriate $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses. The role of $CD8^+$ and $CD4^+$ T lymphocytes in resistance to *T. cruzi* and in the severity of clinical disease remains unclear. In our laboratory, we have previously demonstrated that patients with the cardiac clinical form (CARD) of chronic Chagas disease elicit a robust immune response against the parasite, with high levels of IFN- γ and low levels of IL-10

[21,22] and that this response is associated with severe cardiac pathology. Similarly, Abel et al. suggests that the ability to mount a vigorous IFN- γ -response may be associated with the development of cardiomyopathy [23]. However, Laucella et al. showed that patients with mild disease display substantial amounts of IFN- γ -producing T cells, suggesting that severe disease is prevented, rather than caused, by an immune response dominated by type-1 cytokine production [24]. Additionally, Garg and Tarleton demonstrated that enhancing type 1 immune responses through genetic immunization can substantially reduce the severity of disease in persistently infected mice (Garg and Tarleton, 2002).

Heterogeneity of the response is a hallmark of antigen-specific T cells. $CD4^+$ T cells may develop into T helper cell 1 (TH1), TH2, or TH17 cells and likewise become antigen-specific regulatory cells [25–27]. According to the model proposed by Lanzavecchia and Sallusto [28], protective memory is mediated by effector memory T cells (T_{EM}) that migrate to inflamed peripheral tissues and display immediate effector function, whereas reactive memory cell development is mediated by central memory T cells (T_{CM}) that home to T cell areas of secondary lymphoid organs, have little or no effector function, but readily proliferate and differentiate into effector cells in response to antigenic stimulation. In fact, human T_{CM} are $CD45RO$ memory cells that constitutively express CCR7 and CD62L, two receptors that are also characteristic of naive T cells, which are required for cell extravasation through high endothelial venules and migration to lymphoid organs [29–31]. Differently, human T_{EM} are memory cells that have lost the constitutive expression of CCR7, are heterogeneous for CD62L expression, and display characteristic sets of chemokine receptors and adhesion molecules that are required for homing to inflamed tissues [31].

In addition to the repertoire of cytokine secretion, effector $CD4^+$ T cells exhibit diversity in the homing process, such as migration to peripheral nonlymphoid tissue and transit to lymph node follicles [32]. Furthermore, heterogeneity of $CD8^+$ T cell effector gene expression has also been described [33], although it is not clear whether this represents physiologically distinct cell fates or simply fluctuation in activation state. Memory T cells are heterogeneous, with central memory cells patrolling secondary lymphoid tissues, recapitulating the surveillance of their naive progenitor, and effector memory cells acting as sentinels at frontline barriers [34]. Although the role and function of effector and memory subsets in protection or pathology and the nature of polarizing signals required for their differentiation are becoming increasingly clear, there are still outstanding questions that need to be addressed, which are mainly related to the mechanism of T cell fate. Many of these questions deal with fundamental uncertainties that are common to many areas of blood cell differentiation, such as the extent of fate diversity, the ontogeny and lineage relationship between opposing and kindred fates, and the degree of natural and therapeutic plasticity at different stages of differentiation. In the experimental mouse model, Martin and Tarleton [35] observed that antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells maintain a T_{EM} phenotype during persistent *T. cruzi* infection. Interestingly, it was observed that $T_{CM}CD8^+$ memory T cells can be generated and maintained despite pathogen persistence in *T. cruzi* infection. Furthermore, it was demonstrated that complete pathogen clearance through benznidazole treatment results in stable, antigen-independent and protective T cell memory, despite the potentially exhausting effects of prior long-term exposure to antigen in chronic infection [36,37]. On the other hand, Tzelepis and colleagues [38] showed that the differentiation and expansion of *T. cruzi*-specific $CD8^+$ cytotoxic T cells (T_{EM} T cells) is dependent on parasite multiplication. In humans, an increase in total effector/memory $CD8^+$ T cells ($CD45RA^-CCR7^-$) was observed in CARD patients

[39]. However, the role of these subtypes of memory cells is still not completely understood in human Chagas disease. In the present study, we evaluated the profile of peripheral blood subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing naive/memory markers (CD45RA^{high}/RO^{high}), memory cell subtypes (T_{CM}[−]CD45RO^{high}CCR7⁺ and T_{EM}[−]CD45RO^{high}CCR7[−]) and production of cytokines by peripheral blood cells after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens to evaluate a possible relationship between the presence of these cells and the development of different clinical forms of the disease.

Materials and Methods

Recruitment of subjects

The initial cohort of study subjects was recruited 8 years ago at the Outpatient Referral Center for Chagas Disease of the Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Brazil. All study participants provided a written informed consent following the guidelines of the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais. The study protocol complied with the regulations of the Brazilian National Council on Research in Humans and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais under the protocol COEP/UFMG-372/04. Individuals with systemic arterial hypertension, *diabetes mellitus*, thyroid dysfunction, renal insufficiency, chronic obstructive pulmonary disease, hydroelectrolytic disorders, alcoholism, previous clinical history suggesting coronary artery obstruction and rheumatic disease, or who were unable to fulfill the study requirements for annual examinations were excluded from the study. Individuals were considered seropositive for *T. cruzi* infection if two or more of the standard tests performed, indirect immunofluorescence, ELISA or indirect haemagglutination, were positive. Study participants were evaluated annually for a range of clinical and immunological parameters related to Chagas disease [22].

In this study, we investigated the immune response of 23 patients, who fulfilled the protocol described above, all in the chronic phase of the infection. The patients infected with *T. cruzi* were classified as being in the indeterminate phase of Chagas (IND) or having the cardiac (CARD) form of the disease as previously reported [18]. Individuals in the IND group (n=9) ranged from 30 to 68 years of age. These individuals had no significant alterations in the electrocardiography, chest x-ray, echocardiogram, esophagogram and barium enema. The CARD group age (n=14) ranged from 29 to 73 years, and presented echocardiographic and/or clinical and radiological signs of heart enlargement, with a final diastolic diameter of the left ventricle greater than 55 mm. The cardiac patients that participated in this study were classified as belonging to the group CARD V, as previously reported [18]. Twelve healthy individuals, 29 to 61 years old, from a non-endemic area for Chagas disease, and who had negative serology for Chagas disease, were included in the control group (NI).

Antigens

Epimastigote (EPI) antigens were prepared by using the CL strain of *T. cruzi* as previously described [18,21,22]. Briefly, EPI were washed three times in cold phosphate-buffered saline (PBS), disrupted by repeated freezing at -70°C and thawing, homogenized at 4 to 6°C in a Potter-Elvehjem (Vir Tis-Precise Wisconsin, USA) and centrifuged at 20,000×g five times at 4°C for 60 seconds, with 30 seconds intervals. The suspension was subsequently centrifuged at 40,000×g for 60 minutes in the cold. The clear supernatant was dialyzed for 24 hours at 4°C against PBS, filter sterilized on 0.22-μm pore-size membranes, assayed for protein concentration, aliquoted, and stored at -70°C until needed.

Flow cytometric analysis of peripheral blood

Whole blood was collected in Vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson, USA) and 100 μL samples were mixed in tubes with 2 μL of undiluted monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), R-phycoerythrin coupled to the cyanine dye Cy5TM (PE Cy5) or allophycocyanin (APC) for the following cell surface markers: CD4 (RPA-T4), CD8 (RPA-T8), CD62L (DREG56), CD45RA (HI100), CD45RO (UCHL-1), CCR7 (3D12) (all from BD Pharmingen, USA). After adding the antibodies, the cells were incubated in the dark for 30 minutes at room temperature.

Following incubation, erythrocytes were lysed using 2 mL of FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA) and washed twice with 2 mL of phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide. The cells were then fixed in formaldehyde (4%) and permeabilized with saponin buffer (0.5%) (SIGMA, USA) for 15 minutes. After incubation, the cells were fixed in 200 μL of fixative solution (10 g/L paraformaldehyde, 1% sodium-cacodylate, 6.65 g/L sodium chloride, 0.01% sodium azide). Phenotypic analyses were performed by flow cytometry with a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Data were collected on 1×10^5 lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences, USA).

Flow cytometric analysis of cells culture

Whole blood was stimulated *in vitro* with EPI (25 μg/mL) antigens in RPMI 1640 media supplemented with 1.6% L-glutamine, 3% antibiotic-antimycotic, 5% of AB Rh-positive heat inactivated normal human serum, for 22 hours at 37°C and 5% CO₂. Control cultures were maintained in culture media for the same period of time. During the last 4 hours of culture, Brefeldin A (SIGMA, St. Louis, MO, USA) (10 μg/mL) was added to the cultures [18]. Cultured cells were washed twice in PBS containing 1% bovine serum albumin and stained with monoclonal antibodies specific for the different cell-surface markers, as described above. The cells were then fixed in formaldehyde (4%) and permeabilized in saponin buffer (0.5%) for 15 minutes. Finally, the cells were incubated with monoclonal antibodies reactive to IL-10 (JES3-9D7) and IFN-γ (B27) (both from BD Pharmingen, USA). Phenotypic analyses were performed in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA), and data collected on 1×10^5 lymphocytes and analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences, USA).

FACS analysis of surface markers and intracellular cytokine

Lymphocytes were analyzed for their intracellular cytokine expression patterns and frequencies as well as for cell surface markers using Cell Quest software. The frequency of cells was analyzed in four gates for each staining procedure: gate 1 (R1), lymphocyte gate (Supplementary Figure S1A); gate R2, T CD4⁺ and CD8⁺ expressing CD45RA^{high} and CD45RO^{high} lymphocytes (Supplementary Figure S1B); gate R3, T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes (Supplementary Figure S1C); gate R4, T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing CD45RO^{high}/CCR7⁺ (Supplementary Figure S1D); gate R5, T CD4⁺ and CD8⁺ CD45RA^{high}/CD45RO^{high} lymphocytes secreting IFN-γ and IL-10 (Supplementary Figure S1E). Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls.

Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software Inc, USA). The nonparametric tests

Kruskal-Wallis test was used to compare the three clinical groups (NI×IND×CARD), followed by Dunns test to compare all pairs of columns. Mann-Whitney nonparametric test was used to evaluate the significance of the cytokine production and compare the pairs of columns (NI×IND) (NI×CARD) (IND×CARD), comparing all Differences were considered significant when a p value of less than 0.05 was obtained.

Results

Individuals with the indeterminate form of Chagas disease have lower percentage of CD4⁺ and CD8⁺ naive (CD45RA^{high}) and elevated percentages of memory (CD45RO^{high}) T cells

The results show that the expression of CD45RA^{high} in CD4⁺ T cells, molecule expressed by naive T cells, was significantly lower (p<0.05) in IND patients when compared to NI individuals *ex vivo* (Figure 1A). We did not observe a significant difference between the infected groups when evaluated *ex vivo*. Furthermore, the percentage of CD8⁺CD45RA^{high} T cells in CARD patients, after culture in the absence of EPI antigens, was significantly lower (p<0.05) when compared to NI individuals (Figure 1B). Similarly, IND and CARD patients had a significantly lower percentage of CD8⁺CD45RA^{high} T cells, p<0.05 and p<0.01 respectively,

when compared to NI individuals in *in vitro* cultures in the presence of EPI antigens (Figure 1B).

Our results also showed that the expression of CD45RO^{high} by CD4⁺ T cells, (memory lymphocytes), was not statistically different between NI, IND and CARD groups *ex vivo* and in culture of whole blood in the absence and presence of EPI antigens (Figure 1C and D). However, the percentage of CD45RO^{high} CD4⁺ T cells in the IND group was significantly higher (p<0.05) than in the NI group after culture without antigen stimulation (Figure 1C).

When we evaluated the expression of CD45RO^{high} by CD8⁺ T cells, the data did not reveal statistically significant differences between NI, IND and CARD groups, both *ex vivo* and in control cultures (Figure 1D). However, the CARD group showed a tendency to have higher percentages of these cells *ex vivo* when compared to the other groups (Figure 1D). Note worthy, after *in vitro* culture in the presence or not of EPI antigens, CARD patients presented a decrease in the percentage of these cells (Figure 1D).

Chronic patients have an elevated percentage of T cells secreting cytokines

The presence of intracytoplasmatic cytokines IFN-γ and IL-10 in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing either CD45RA^{high} or CD45RO^{high} surface markers was evaluated in NI, IND and

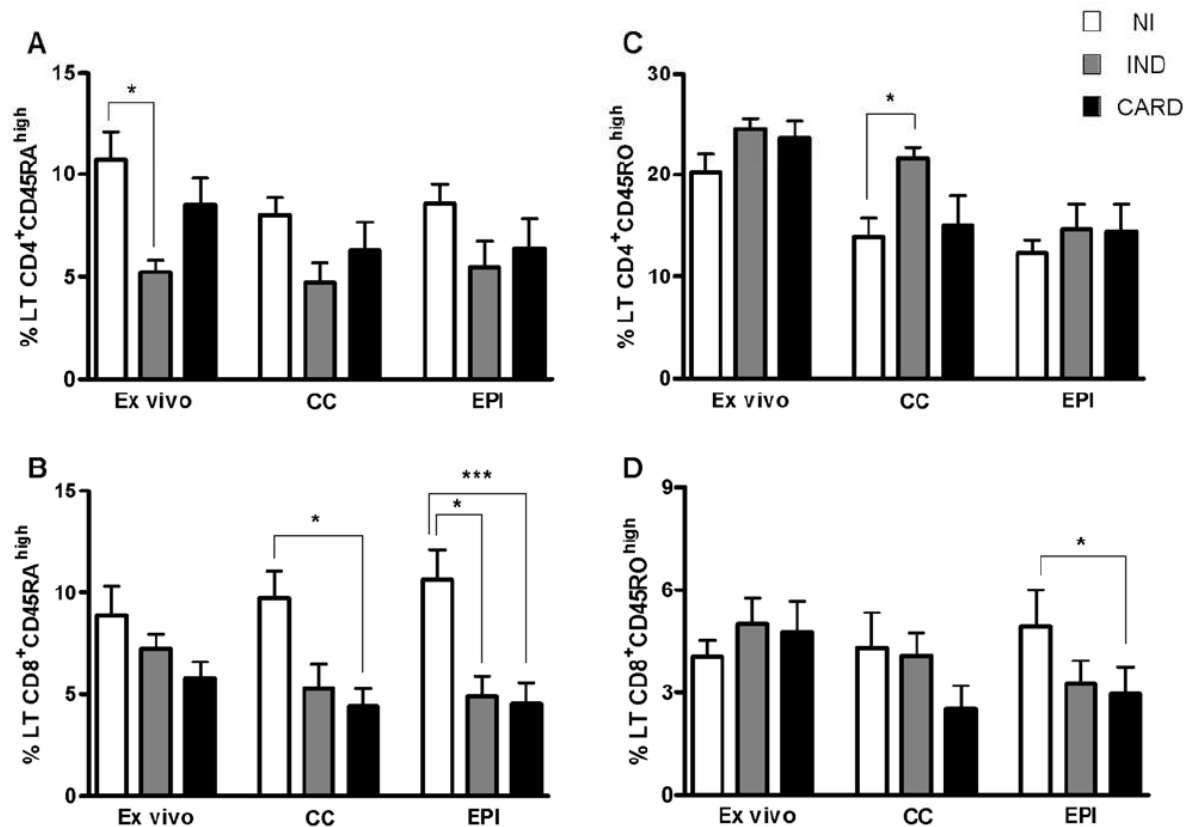


Figure 1. Naive and memory T cells. Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, evaluated by flow cytometry before and after a short *in vitro* stimulation with *T.cruzi* antigen (EPI) as described in Material and Methods. A and B) CD45RA^{high} expression. C and D) CD45RO^{high} expression. *Ex vivo* =before stimulation, CC = culture non estimated and EPI = culture after stimulation. The differences between the groups are considered significant at p less than 0.05 and are represented by * p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001. doi:10.1371/journal.pntd.0000512.g001

CARD groups in the absence or presence of *in vitro* stimulation by EPI crude extract.

The data showed that CARD patients presented a significantly higher percentage ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) of $CD8^+CD45RA^{high}$ IFN- γ -producing cells in control cultures (absence of antigen stimulation) when compared to IND patients and NI individuals. This percentage was also significantly higher in CARD group than in NI individuals ($p < 0.01$) after antigen pulsing with EPI (Figure 2A). No significant differences were observed when we evaluated the percentage of $CD8^+CD45RA^{high}$ cells producing

IL-10 in cultures in the absence or presence of EPI antigens (data not shown).

Data analysis revealed a significant increase ($p < 0.01$) of IFN- γ^+ $CD4^+CD45RO^{high}$ cells in whole blood samples from chagasic patients in comparison to NI individuals, after culture in the presence of EPI antigens (Figure 2B). There were no statistically significant differences among all studied groups evaluated after culture in the absence of antigenic stimulation (Figure 2B).

Analysis of IL-10 $^+$ $CD4^+CD45RO^{high}$ T cells showed a significant higher ($p < 0.05$) percentage of these cells in CARD

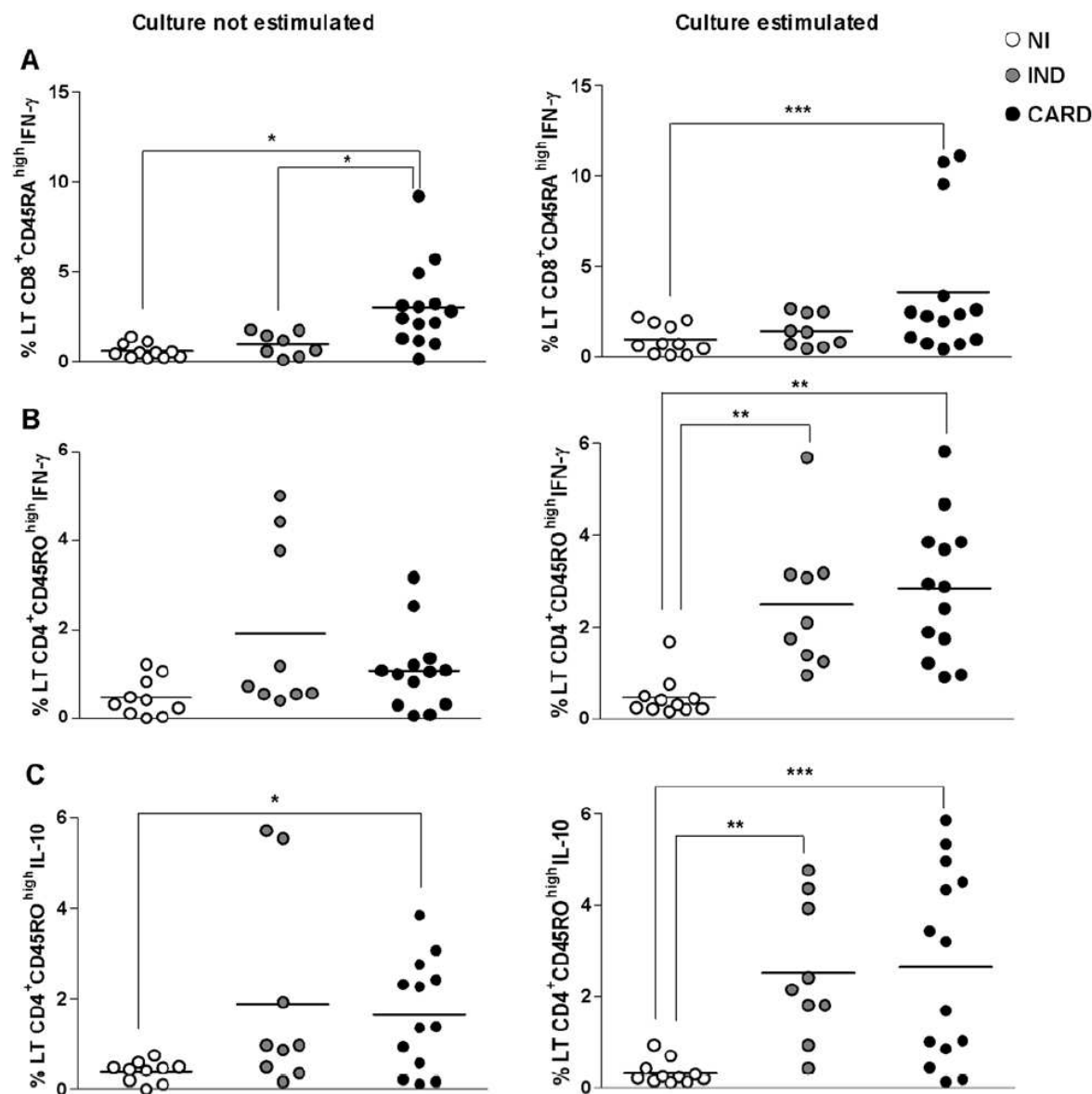


Figure 2. Cytokines secreted by naive and memory T cells. Percentage of $CD8^+CD45RA^{high}$, $CD4^+CD45RO^{high}$ and $CD8^+CD45RO^{high}$ T cells, evaluated by flow cytometry after a short *in vitro* stimulation *without* or with *T. cruzi* antigen (EPI) as described in Material and Methods. A and B) Intracellular cytokine IFN- γ expression. C) Intracellular cytokine IL-10 expression. CC = culture non estimated and EPI = culture after stimulation. The differences between the groups are considered significant at p less than 0.05 and are represented by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pntd.0000512.g002

patients when compared to NI individuals after culture in the absence of antigenic stimulation (Figure 2C). The results showed that there is a significantly higher percentage of CD4⁺CD45RO^{high} T lymphocytes secreting IL-10 in CARD and IND patients ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), after culture in the presence of antigens of EPI, when compared to NI group (Figure 2C).

Data analysis of the expression of cytokines IFN- γ and IL-10 by CD8⁺CD45RO^{high} T cells did not show any significant difference between the groups, after *in vitro* culture (data not shown).

Identification of human CD4⁺ and CD8⁺ T cell memory subsets

Triple labeling of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from peripheral blood with the molecules CD45RA, CD45RO and CCR7 allowed us to evaluate the process of recirculation of lymphocytes (percentage of cells migrating to/from secondary lymphoid organs).

We classified human CD4⁺ and CD8⁺ T cells by using two markers, CD45RO and CCR7. Three-color flow cytometry analysis demonstrated two major populations of human CD4⁺ and CD8⁺ T cells, i.e. CCR7⁺CD45RO^{high} and CCR7⁻CD45RO^{high}.

The assessment of the percentage of CD4⁺CD45RO^{high}CCR7⁺ T cells demonstrated that CARD patients have significantly lower percentage ($p < 0.05$) of this sub-population *ex vivo* when compared

to NI individuals (Figure 3A). There were no significant differences in the analysis of these cells after culture (Figure 3A). In the analysis of CD4⁺ cells CD45RO^{high}CCR7⁻, we did not find any differences on the percentage of cells between the groups, before or after stimulation (Figure 3B).

The expression of the CD45RO^{high}CCR7⁺ phenotype by CD8⁺ cells, IND and CARD groups showed a significantly higher percentage of these cells ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) in comparison to NI individuals in *ex vivo* (Figure 3A). The evaluation of these cells after culture did not show any statistically significant differences between the studied groups. (Figure 3A). When the percentage of CD8⁺CD45RO^{high}CCR7⁻ T cells was assessed, we observed that CARD group presented a higher percentage ($p < 0.05$) than the IND group *ex vivo*. A decrease on this percentage of this cell population was demonstrated after *in vitro* culture (Figure 3B). However, it was not statistically significant.

Discussion

Most mature peripheral T cells are at rest and can be divided into naive and memory cells. This division is based on their response to antigens in a secondary response [40]. In addition to the functional activity, several markers have been identified to allow the distinction of these cell populations. Naive T cells, which

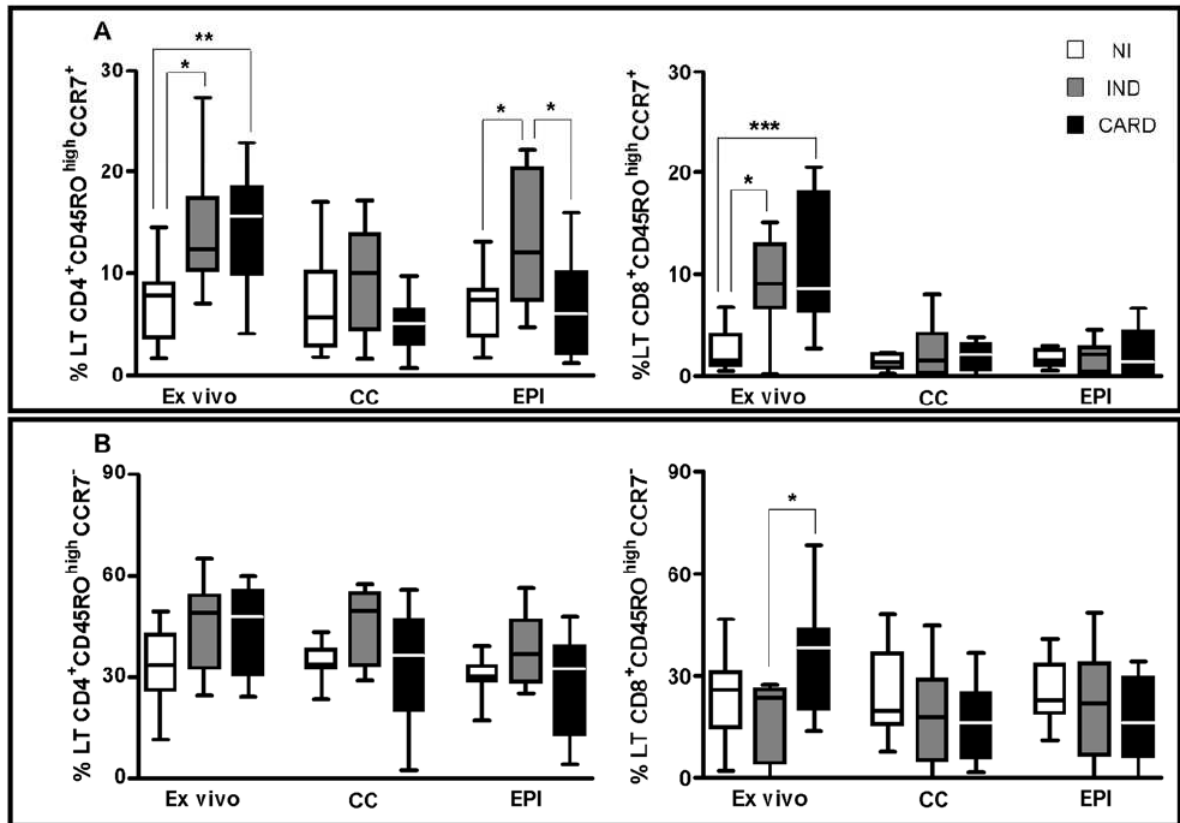


Figure 3. Analyses of central and effector memory T cells. Percentage of CD45RO^{high}CCR7⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells, evaluated by flow cytometry before and after a short *in vitro* stimulation with *T. cruzi* antigens (EPI) as described in Material and Methods. A) CD45RO^{high}CCR7⁺ expression (T_{CM}). B) CD45RO^{high}CCR7⁻ expression (T_{EM}). Ex vivo = before stimulation, CC = culture non estimated and EPI = culture after stimulation. The differences between the groups are considered significant at p less than 0.05 and are represented by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pntd.0000512.g003

have not encountered antigens, express high levels of CD45RA and L-selectin on its surface, and do not express activation markers such as CD25, CD44 and CD69 [40]. In contrast, memory T cells, which were previously stimulated by an antigen, express high levels of CD45RO and low levels of L-selectin [41]. In this study, we demonstrate that IND and CARD patients have less naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells, demonstrated by decreased expression of CD45RA, as well as lower levels of CD8⁺ memory T cells when compared to NI (control) individuals. Similar results have been demonstrated by other study, in which patients in the chronic phase of Chagas disease presented the same expression profile of CD45RA^{low} in both CD4⁺ and CD8⁺ peripheral T cells [42]. Moreover, using an experimental model, another study demonstrated that splenic CD8⁺ T cells from *T. cruzi*-infected animals show lower expression of CD45RA than cells from non-infected mice [43]. The reduction of naive and increase of memory T cells may occur during the chronic phase of the disease. This might indicate a clonal T cell exhaustion due to continuous antigenic stimulation by persistent parasites, and may be associated with increased disease severity [42,44–46]. The reduction in the expression of CD45RA is a direct result of the exchange of the CD45 isoform from A to C, possibly leading to an easier association with the TCR complex [47,48]. The C isoform allows the cell to be activated by lower antigen stimulation and co-stimulation [49]. The evaluation of CD4⁺ T cells expressing CD45RO^{high} showed a higher percentage of these cells in IND group when compared to NI individuals after culture without antigenic stimulation. In fact, several studies have shown that altering the combination of CD45 isoforms dramatically affects immune function and disease severity in autoimmune models. Available data also show that this mechanism is related to an altered threshold for TCR signaling, altered cytokine production and response. This indicates that manipulating the patterns of CD45 expression or signaling pathways that it modulates might be a potential immunoregulatory strategy [47,48,50–52].

The mechanisms involved on the development of different clinical forms of Chagas disease are still poorly understood, suggesting that multiple factors may be involved in its establishment, such as cytokine production and profile of activation or differentiation status defined by subsets of memory [53]. The most studied cytokines in Chagas disease are IFN- γ and IL-10. Several studies have described some of the main cell populations involved in the production of these cytokines, and their relationship with pathology or regulation of immune responses during this infection [18,22,23,54–60]. Our previous studies suggest a dual role for IFN- γ during human Chagas disease, which is observed during the different stages of the infection (acute and chronic phases) or in the presence or absence of treatment [22,54]. It has been shown that during the acute phase of experimental mouse infection, IFN- γ participates in the elimination the parasite [55]. Furthermore, the protective role of IFN- γ has also been postulated in humans, as individuals submitted to treatment show a strong cellular response with secretion of high levels of this cytokine after *in vitro* stimulation of PBMC [54]. On the other hand, studies on human chronic Chagas disease have also shown that IFN- γ production may be harmful to the organism, since its unregulated production in the heart tissue may promote the destruction of the myocardium due to its cytotoxic effects. [23,54,61]. However, Laucella et al. showed a linkage between increased *T. cruzi*-specific T cell-mediated IFN- γ responses and decreased disease severity. [24]. Indeed, there are several important differences between all these studies, which might contribute to discrepancies in interpretation. Therefore, a long-term immunological follow-up of *T. cruzi*-infected patients may provide valuable information on the real role and contribution of IFN- γ

responses to parasite control and disease development. In this paper, we evaluate the secretion of IFN- γ and IL-10 by CD4⁺ and CD8⁺ naive (CD45RA^{high}) and memory (CD45RO^{high}) T cells. We observed that the subjects from the CARD group presented higher percentage of naive CD8⁺ T cells secreting IFN- γ . This result suggests that naive CD8⁺ T cells might be associated with the development of the cardiac clinical form of the disease, probably as activated cells. Bourreau et al. [62], when evaluating the immune response of PBMCs from the NI individuals after *in vitro* stimulation with *L. guyanensis* antigens, demonstrated that CD8⁺CD45RA⁺ T cells producing IFN- γ are CD62L⁻CCR7⁻, while those producing IL-10 are CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻CD62L⁺ T cells, which are migrating to the inflammatory foci but are not yet activated. Our group has also shown that in Chagas disease, patients from CARD group develop a strong response against *T. cruzi* antigens, presenting high levels of IFN- γ and low levels of IL-10 [22]. Interestingly, here we observed that chronic patients have more CD4⁺CD45RO^{high} T cells secreting both IFN- γ and IL-10. Similarly, Antonelli et al. (2004) [63] demonstrated that PBMC from patients infected with *L. braziliensis* show high frequencies of memory CD4⁺ T cells producing both inflammatory (IFN- γ) and regulatory (IL-10) cytokines. This result suggests that these cells may not be the main source of these cytokines, since they are producing both IL-10 and IFN- γ cytokines. Therefore, they may not be so relevant on the development of the inflammatory process caused by protozoan infections.

Moreover, some studies have shown that memory T cells may be involved in the protection and development of Chagas disease [35–37,39]. Nonetheless, a detailed evaluation of the cell populations involved in recall responses in human Chagas disease is still necessary. Memory T cells can be divided into two subpopulations, based on their heterogeneity, effector functions and response to the antigen or cytokines. Once activated, a fraction of primed T lymphocytes persists as circulating memory cells that can lead to protection and, upon secondary challenge, result in a qualitatively different and quantitatively enhanced response [31,64–68]. The central memory (T_{CM}) human T cells express CD45RO and also CCR7 and CD62L molecules, two important receptors related to the migration of T cells to peripheral lymphoid organs [30,69]. When compared to naive T cells, T_{CM} have higher sensitivity to antigen stimulation, are less dependent on co-stimulation and provide efficient feedback for stimulation of dendritic and B cells. After evaluation of memory subtypes, we observed that chronic patients have more CD4⁺ and CD8⁺ T_{CM} cells *ex vivo*. However, after stimulation with EPI antigens, only the IND group showed more T_{CM} CD4⁺ T cells. These data suggest that when the overall T cell compartment is eventually driven to exhaustion, it exhibits a low frequency of competent parasite-specific CD8⁺ T cells and predisposes the subject for disease progression; this profile is presented by CARD patients with persistence of antigens or re-infection by *T. cruzi*. Recently, using the mouse model of *T. cruzi* infection, an increase in CD8⁺ T_{CM} cells was observed during long-term persistent infection [36]. Of note, these CD8⁺ T_{CM} cells were capable of antigen-independent survival after being transferred into naive mice, and were maintained despite the presence of persistent antigen stimulation. Similarly, Bustamante et al. documented the development of stable, antigen-independent CD8⁺ T cell memory after benznidazole-induced cure of chronic infected mice [37].

It has been shown in mice that antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype (T_{EM} CD8⁺ T cells) during persistent *T. cruzi* infection [35,38], suggesting that these cells may play an important role in the pathogenesis of the Chagas disease. However, the process of cell development and differentiation from naive into

T_{CM} or T_{EM} is still not clearly understood. Studies with patients infected with HIV (human immunodeficiency virus) or LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) suggested that T cells go through the process of differentiation from **naive**→ T_{CM} → T_{EM} [70,71]. On the other hand, several authors suggest that the T_{CM} and T_{EM} cells are actually independent subpopulations which develop according to the biological environment, (eg.: presence of different cytokines or the anatomical region of activation) are independently maintained [71–73]. Finally, other studies on the infection LCMV T_{CM} show that the cells proliferate and/or convert into T_{EM} after re-exposure to the antigen, suggesting an alternative model of $CD8^+$ T cell differentiation: **naive**→ T_{EM} → T_{CM} [74]. However, our data suggest that the type of differentiation is **naive**→ T_{CM} → T_{EM} [70,75]. In fact, IND patients seem to have some regulation that prevents T_{CM} cells from becoming T_{EM} , but further studies are still needed to elucidate this question. Previous studies have attempted to clarify the role of different subtypes of memory cells using the experimental mouse model and the CD45RA as a cell marker [39,76]. In the current study, we evaluated the memory profile using $CD45RO^{high}CCR7^+$ phenotype as a marker for T_{CM} and $CD45RO^{high}CCR7^-$ for T_{EM} T cells.

In conclusion, our results showed that CARD patients have more naive $CD8^+$ T cells secreting IFN- γ and T_{EM} $CD8^+$ T cells than IND and NI groups. Based on a correlation between the frequency of IFN- γ producing $CD8^+$ T cells in the T cell memory compartment and the chronic chagasic myocarditis, we propose that memory T cells might be involved in the induction of the development of the severe clinical forms of the Chagas disease by mechanisms modulated by IFN- γ . Conversely, some authors have demonstrated that high levels of IFN- γ are inversely correlated with disease severity [24,39]. In this way, the role of IFN- γ in human Chagas disease progression is not clear and should be

further elucidated by large follow-up studies. Moreover, we demonstrated that individuals from IND group presented higher levels of T_{CM} $CD4^+$ T cells, which could induce immunoregulatory mechanisms to protect the host against the exacerbated inflammatory response elicited by *T. cruzi* infection. Studies of subtypes of immunological memory are still important for understanding the role of these cells in Chagas disease (immunoregulatory or pathogenic). Therefore, additional longitudinal studies of changes in $CD8^+$ T cell sub-populations in chronically infected subjects may reveal specific markers for progression to severe disease.

Supporting Information

Figure S1 FACS analysis. (A) Identification of peripheral lymphocytes population from CARD patients in diagram of FSC×SSC. (B) Dot plot of FL-1×FL-4, displaying the frequency of $CD4^+CD45RO^+$ cells, after stimulation with EPI. The $CD4^+CD45RO^{high}$ (R2) populations were sorted using the indicated sorting gates. (C) Dot plot of FL-1×SSC, displaying the frequency of $CD4^+$ (R3). (D) Dot plot of FL-4×FL-2, displaying the frequency of $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^+$ (UR). (E) Dot plot of FL-4×FL-2, displaying the frequency of $CD4^+CD45RO^{high}IFN-\gamma^+$ (UR).

Found at: doi:10.1371/journal.pntd.0000512.s001 (0.33 MB DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JAF RTF JASG ATC OdAMF RCO. Performed the experiments: JAF JASG ATC FFA RCGF. Analyzed the data: JAF RTF ATC FFA RCGF ATC OdAMF GGLC RCO. Contributed reagents/materials/analysis tools: JAF JASG MOCR RCO. Wrote the paper: JAF RTF GGLC RCO.

References

- WHO (2007) Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 905: 1–109.
- Dias JC (2007) [Globalization, inequity and Chagas disease]. Cad Saude Publica 23 Suppl 1: S13–22.
- Zhang L, Tarleton RL (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis 180: 480–486.
- Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, et al. (1995) Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. Lancet 346: 1370–1371.
- Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, et al. (1974) Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation 50: 1252–1259.
- Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. Nature 296: 34–38.
- Acosta AM, Santos-Buch GA (1985) Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. Circulation 71: 1255–1261.
- Kierszenbaum F (1986) Autoimmunity in Chagas' disease. J Parasitol 72: 201–211.
- Kierszenbaum F (1999) Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev 12: 210–223.
- Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. Clin Exp Immunol 85: 413–417.
- Cunha-Neto E, Kall J (1995) Autoimmunity in Chagas' heart disease. Sao Paulo Med J 113: 757–766.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, et al. (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest 98: 1709–1712.
- Al-Sabbagh A, Garcia CA, Diaz-Bardales BM, Zaccarias C, Sakurada JK, et al. (1998) Evidence for cross-reactivity between antigen derived from Trypanosoma cruzi and myelin basic protein in experimental Chagas disease. Exp Parasitol 89: 304–311.
- Leon JS, Engman DM (2001) Autoimmunity in Chagas heart disease. Int J Parasitol 31: 555–561.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, et al. (1993) Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Med Hyg 48: 348–357.
- Brener Z, Gazzinelli RT (1997) Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol 114: 103–110.
- Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, et al. (1997) Association of an increase in $CD8^+$ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg 56: 485–489.
- Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, et al. (2007) Potential role of $CD4^+CD25^{HIGH}$ regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Front Biosci 12: 2797–2806.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, et al. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating $CD3^+CD16^-CD56^+$ natural killer T cells and $CD4^+CD25^{High}$ regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol 62: 297–308.
- Zuniga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KI, Rabinovich GA (2001) Regulated expression and effect of galectin-1 on Trypanosoma cruzi-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. Infect Immun 69: 6804–6812.
- Games JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, et al. (2005) Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. Infect Immun 73: 7960–7966.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, et al. (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun 71: 1185–1193.
- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, et al. (2001) Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. J Autoimmun 17: 99–107.
- Lauella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, et al. (2004) Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J Infect Dis 189: 909–918.
- Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. Nat Rev Immunol 2: 933–944.
- Sakaguchi S, Powrie F (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. Science 317: 627–629.
- Stockinger B, Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol 19: 281–286.

28. Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290: 92–97.
29. Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, et al. (1998) 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol* 141: 1053–1059.
30. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, et al. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23–33.
31. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745–763.
32. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR (2005) Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5: 853–865.
33. Peixoto A, Evaristo C, Munitic I, Monteiro M, Charbit A, et al. (2007) CD8 single-cell gene coexpression reveals three different effector types present at distinct phases of the immune response. *J Exp Med* 204: 1193–1205.
34. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708–712.
35. Martin DL, Tarleton RL (2005) Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 174: 1594–1601.
36. Bixby LM, Tarleton RL (2008) Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 181: 2644–2650.
37. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL (2008) Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 14: 542–550.
38. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, et al. (2006) Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun* 74: 2477–2481.
39. Albarada MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armentis AH, Bertochi G, et al. (2006) *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18: 465–471.
40. Linton PJ, Haynes L, Tsui L, Zhang X, Swain S (1997) From naive to effector—alterations with aging. *Immunol Rev* 160: 9–18.
41. Croft M, Duncan DD, Swain SL (1992) Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med* 176: 1431–1437.
42. Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, et al. (1994) Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 6: 499–506.
43. Grisotto MG, D'Imperio Lima MR, Marinho CR, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA, et al. (2001) Most parasite-specific CD8+ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha and CD8 molecules. *Immunology* 102: 209–217.
44. Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, et al. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol* 24: 661–668.
45. el Cheikh MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A, Minoprio P (1992) CD5 B cells. Potential role in the (auto)immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann N Y Acad Sci* 651: 557–563.
46. d'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A (1986) Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 137: 353–356.
47. Dianzani U, Luqman M, Rojo J, Yagi J, Baron JL, et al. (1990) Molecular associations on the T cell surface correlate with immunological memory. *Eur J Immunol* 20: 2249–2257.
48. Leitenberg D, Boutin Y, Lu DD, Bottomly K (1999) Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10: 701–711.
49. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8: 89–95.
50. Dawes R, Petrova S, Liu Z, Wraith D, Beverley PC, et al. (2006) Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol* 176: 3417–3425.
51. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A (2003) CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107–137.
52. Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ (2001) CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2: 389–396.
53. Strutt TM, McKinstry KK, Swain SL (2009) Functionally diverse subsets in CD4 T cell responses against influenza. *J Clin Immunol* 29: 145–150.
54. Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cancado JR, Ferrari TC, Lemos EM, et al. (2000) Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. *J Infect Dis* 182: 634–638.
55. Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira I, Pereira ME, Ferreira LR, et al. (1998) Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2549–2556.
56. Tarleton RL, Zhang L (1999) Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94–99.
57. Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* 73: 547–559.
58. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, et al. (1997) An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 83: 165–172.
59. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, et al. (1992) Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 175: 169–174.
60. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, et al. (2008) Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 68: 516–525.
61. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, et al. (2005) Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 167: 305–313.
62. Bourreau E, Prevot G, Gardon J, Pradinaud R, Hasagewa H, et al. (2002) LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 70: 3122–3129.
63. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ (2004) Antigen correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136: 341–348.
64. Ahmed R, Gray D (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272: 54–60.
65. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, et al. (1996) On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14: 333–367.
66. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL (1998) T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16: 201–223.
67. Sallusto F (1999) The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica* 84 Suppl EHA-4: 28–31.
68. Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A (2000) Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 251: 167–171.
69. Campbell DJ, Shastri N (1998) Bacterial surface proteins recognized by CD4+ T cells during murine infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 161: 2339–2347.
70. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, et al. (2001) Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410: 106–111.
71. Masopust D, Lefrancois L (2003) CD8 T-cell memory: the other half of the story. *Microbes Infect* 5: 221–226.
72. Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley MA, et al. (2001) Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 108: 871–878.
73. Baron V, Bouneaud C, Cumano A, Lim A, Arstila TP, et al. (2003) The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity* 18: 193–204.
74. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, et al. (2003) Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4: 225–234.
75. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klennerman P, Gillespie GM, et al. (2002) Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8: 379–385.
76. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003) Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101: 4260–4266.

9 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-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Autoimmun 2001;17:99-107.

Abraham C, Griffith J, Miller J. The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. J Immunol 1999;162:4399-4405.

Abraham C, Miller J. Molecular mechanisms of IL-2 gene regulation following costimulation through LFA-1. J Immunol 2001;167:5193-5201.

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- α , 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.

Akbar AN, Vukmanovic-Stejić M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. Nat Rev Immunol 2007;7:231-237.

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. Pathogenesis of Chagas' disease. Res Immunol 1991;142:126-129.

Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996;348:1407-1413.

Andrade ZA. Patologia da Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. P. 201-213.

Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Silva SA, Aires AI, Soussumi LM, et al. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:594-597.

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:726-735.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization and mechanism of suppression of CD4⁺CD25⁺ human thymocytes. *J Exp Med* 2002;196: 379-387.

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 FG. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. *Infect Immun* 1989;57:2246-2248.

Araújo 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 Biosc* 2007;12:2797-2806.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin-10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190:995-1004.

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 JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253.

Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell function. *J Immunol* 2002;169:6210-6217.

Baecher-Allan C, Viglietta V & Hafler DA. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004;16:89-98.

Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, et al. IFN-gamma in human Chagas disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res* 1998;31:127-131.

Bahia- Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrari T, Lemos EM, Luz ZMP, et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 2000;182:634-638.

Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Ban Y, Jacobson EM, Concepcion ES, et al. The regulatory T cell gene Foxp3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *J Autoimmun* 2007;28:201-207.

Barreto MP. *Epidemiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979.

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

Barry M, Heibein 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.

Battaglia M, Blazar BR, Roncarolo MG. The puzzling world of murine T regulatory cells. *Microbes Infect* 2002;4:559-566.

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, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002;42:502-507.

Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:875-885.

Belkaid Y & Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005;6:353-360.

Belkaid Y, Sun CM, Bouladoux N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2006;18:406-12.

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

Berlin-Rufenach, C, Otto F, Mathies M, Westermann J, Owen MJ, Hamann A, et al. Lymphocytes migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 1999;189:1467-1478.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2005; 816 p.

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.

Bittencourt AL. Congenital Chagas disease. *Am J Dis Child* 1976;130: 97-103.

Bystry RS, Aluvihare V, Welch ka, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001;2:1126–1132.

Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-1071.

Campbell DJ, Ziegler S. Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7:305-310.

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;64:128-134.

Cerisola JA, Silva NN, Prata A, Schenone H, Rohwedder R. Evaluación mediante xenodiagnostico de la efectividad del nifurtimox en la infección chagásica crónica humana. *Bol Chil Parasitol* 1977;32:51-62.

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

Chaves AT. Avaliação do papel da apoptose nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Biomedicina e Clínica Médica] - Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte; 2009.

Coura JR, Brindeiro PJ, Ferreira I. Benznidazole in the treatment of Chagas disease. *Current Chemotherapy* 1978;1:161-162.

Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3–24.

Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:113-117.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin - specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3541-3545.

Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res 1998;31:133-141.

Dai Z, Li Q, Wang Y, Gao G, Diggs LS, Tellides G, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress allograft rejection mediated by memory CD8⁺ T cells via a CD30-dependent mechanism. J Clin Invest 2004;113:310-317.

Darmon AJ, Pinkoski MJ, Bleackley RC. Granule-mediated cytotoxicity. Results Probl Cell Differ 1999;23:103-125.

De Castro SL. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 1993;53:83-98.

De Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Chiari E, Galvão LM. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol Res 2006;99:379-383.

D'imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J Immunol 1986;137:353-356.

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 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-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 48.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. *Ex vivo* isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-1310.
- Dos santos PV, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*- elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 2001;3:971-984.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Dias JCP, Brener Z, Freeman GL, et al. 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, Reis DD, et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:208-218.
- Fabbro De Suasnábar D, Arias E, Streiger M, Piacenza M, Ingaramo M, Del Barco M, et al. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42:99-109.

Fahlén L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:737-746.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:1206-1212.

Ferreira HO. Ensaio terapêutico-clínico com benzonidazol na doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop* 1976;18:357-364.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.

Fragata Filho AA, Boianain E, Silva MAD, Correia EB, Borges Filho R, Martins C, et al. Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benzonidazol. *Arq Bras Cardiol* 1995;65:71.

Gallerano RH, Sosa RR. Resultados de estudio a largo plazo con drogas antiparasitarias em infectados chagásicos crônicos. *Rev Fed Arg Cardiol* 2001;30:289-296.

Galvão LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:220-223.

Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation. Polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of Foxp3, a critical regulator of T cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:430-435.

Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1521-1528.

Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 2007;109:2058-2065.

Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* 2003;15:690-696.

Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. VIII. Differential *in vitro* cellular responsiveness to adult worm and schistosomular tegumental preparations. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32:326-333.

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.

Gershon RK, Eardley DD, Durum S, Green DR, Shen FW, Yamauchi K, et al. Contr suppression. A novel immunoregulatory activity. *J Exp Med* 1981;153:1533-1546.

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

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;71:1185-1193.

Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting Edge: Contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005;174:1783-1786.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004;21:589-601.

Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, et al. IL-10 is required for T cells to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. *J Immunol* 2001;166:3789-3796.

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

Hardy B, 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.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172:3157-3166.

Higuchi ML, De Brito T, Reis MM, Barbosa A., Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. 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. Endomyocardial biopsy in Chagas heart disease: pathogenetic contributions. *Rev Paulista Med* 1995;113:821-825.

Higuchi ML, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. 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;60:96-107.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med* 2004;10:29-30.

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.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.

Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004;6:745-751.

Hotenbeyrie-Joskowicz M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Res Immunol* 1991;142:141-143.

Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 2005;26:632-636.

Iellem A, Colantonio L, D'ambrosio D. Skinversus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1488–1496.

Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-60.

Jung TM, Gallatin WM, Weissman IL, Dailey MO. Down regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol* 1988;141:4110-4117.

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

Kandula S, Abraham C. LFA-1 on CD4⁺ T cells is required for optimal antigen-dependent activation *in vivo*. *J Immunol* 2004;173:4443-4444.

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-342.

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

Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:210-223.

Laguens RP, Cabeza-Meckert PM, Chambó JG & Gelpi R. Chronic Chagas disease in the

mouse. II- Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina* 1981;41:40-43.

Laranja FS. Clinical aspects of Chagas' disease. *Rev Bras Med* 1953;10:482-491.

Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008;180:5916-5926.

Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta and CTLA-4. *J Immunol* 2003;171:5012-5017.

Lepault F & Gagnerault MC. Characterization of peripheral regulatory CD4⁺ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2000;164:240-247.

Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25(+)CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001;193:1295-1302.

Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002;196:1335-1346.

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.

Lub M, Van K, Figdor CG. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 1995;16:479-483.

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

Macedo VO, Silveira CA. Perspectivas da terapêutica específica na doença de Chagas. Experiências na forma indeterminada. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987;20: 24-26.

Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Dias, JCP (org.); Coura, JR (org.). Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997.p-135.

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.

Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2:816-822.

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, et al. The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 2008;10:825-833.

Marin-Neto JA, Rassi AJr, Avezum AJr, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:319-324.

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

Mccabe RE, Remington JS, Araujo FG, Dekker M. Enhancement of resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by recombinant IFN- γ Interf nonviral path 1988;203-216.

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 Disease* 1991;163:912-915.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.

McKee AS, Pearce EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* 2004;173:1224-1231.

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004;200:201-210.

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;137:129-38.

Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, et al. Interleukin-12 enhances *in vivo* parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;10:2549-2556.

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;71:3165-3171.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-855.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol* 1986; 24:661-668.

Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J Immunol* 1987;139:545-50.

Miranda L, Miranda L, Campos G, Marins N, Lobo V. História natural da forma crônica da doença de Chagas x tratamento específico. *RECOC*. 1994;1:25-29.

Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, et al. B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol* 2002;169:6298-6308.

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.

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.

Muriglian SJ, Ramirez-Montagut T, Alpdogan O, Van Huystee TW, Eng JM, Hubbard VM, et al. GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2004;200:149-157.

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

Pandiyani P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353-1362.

Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4⁺CD25⁻ T cells. *Int Immunol* 2004;16:1203-1213.

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002;196:237-246.

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

Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Cell Immunol 1999;193:90-98.

Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4⁺ T cells. J Exp Med 1996;183:2669-74

Rassi A, Rassi AJr, Rassi GG. Fase aguda. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 2000; p.231-245.

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

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med 2000;192:295-302.

Reed SG. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol 1988;140:4342-4347.

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

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Gazzinelli G, Colley DG, Mccurley T. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alpha⁺ cells and dominance of Granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. Am J Trop Med Hyg 1993a;43:637-644.

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1993b;49:192-200.

Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. Clin Immunol and Immunopath 1997;830:165-172.

Rezende JM. Forma digestiva da moléstia de Chagas. Rev Goiana Med. 1959;5:197.

Rezende JM, Rassi A. Doença de Chagas. In: Castro LP, Cunha AS, Rezende JM. Protozooses Humanas. São Paulo: Fundo Editorial Byk; 1994. p. 38-77.

Ribeiro Dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med 1992;175:29-39.

Rottenberg ME, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Orn A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. Scand J Immunol 1988;28:573-582.

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

Rouse BT. Regulatory T cells in health and disease. J Intern Med 2007;262:78-95.

Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. Annu Rev Med 1997;48:267-281.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995;155:1151-1164.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell 2000;101:455-458.

Sanchez E, Rueda B, Orozco G, Oliver J, Vilchez JR, Paco L, et al. Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the *foxp3/scurfin* gene in autoimmune diseases. *Hum Immunol* 2005;66:869-873.

Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowicz M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of *Foxp3*⁺ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Medicine* 2007;204:1335-1347.

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, et al. 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;10:103-113

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

Schmunis GA. Tripanossomíase America: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: Dias JCP (org.), Coura JR (org.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p.11-24.

Shevach EM. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 2004;50:2721-2724.

Shevach EM, Stephens GL. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 2006;6:613-618.

Shevach EM. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-645.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-142.

Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, Ghani S, Haubold U, Dankof A, et al. Migration matters: regulatory T cell compartmentalization determines suppressive activity *in vivo*. *Blood* 2005;106:3097-3104.

Silva NN, Kuhn G, Santos JFC, Von Eye G, Chaer JAB. Eficácia e tolerância do nitrofurfurilidene na fase crônica da moléstia de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1974;88:325-334.

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.

Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:526-529.


Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob 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.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-10.


Tang Q, Krummel MF Imaging the function of regulatory T cells *in vivo*. *Curr Opin Immunol* 2006;18:496-502.

Tarleton RL. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 1990; 144:717-724.

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

Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31:550-554.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD25⁺CD4⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.

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

Tostes SJr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araújo Pereira G, Rodrigues VJr. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol* 2005;99:233-237.

Urbina J. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med* 1999;77:332-338.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003;19:495-501.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996;149:2153-2159.

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.

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.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-979.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994;127:151-162.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic CD with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006; 144:724-734.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁻CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2005;62:297-308.

Wan YY, Flavell RA. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:271-276.

Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002;39:537-545.

Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8:277-284.

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

World Health Organization. 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. 2003;p.125.

Wu Y. Foxp3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126:375-387.

Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8:457-462.

Ziegler SF. Foxp3: of mice and men. *Ann Rev Immunol* 2006;24:209-226.