

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Suellen Carvalho de Moura Braz

**Avaliação das células T regulatórias
CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas formas clínicas da doença de
Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos
recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

RECIFE
2011

Suellen Carvalho de Moura Braz

Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes

Co-orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B827a Braz, Suellen Carvalho de Moura.

Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3 nas formas clínicas da Doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* / Suellen Carvalho de Moura Braz. — Recife: S. C. M. Braz, 2011. 62 f.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes

Co-Orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.

1. Doença de Chagas. 2. Células T Regulatórias. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Gomes, Y. M. II. Lorena, V. M. B. III. Título.

CDU 616.937

Suellen Carvalho de Moura Braz

Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yara de Miranda Gomes
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Vláudia Maria Assis Costa
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho a meus pais que me propiciaram acesso ao conhecimento e
que tanto me ensinaram sobre a vida.

A memória de meu avô Moura que era um exemplo de caráter e, acima de tudo,
amor pelos seus semelhantes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de todas as coisas, por trazer esperança nos momentos mais difíceis. Só tenho a agradecer por todas as dádivas concedidas.

Aos meus familiares, alicerce de minha vida, em especial aos meus pais Anacleto e Izabel. Só agradecer não basta ao amor, carinho e dedicação com que conduzem nossa família.

A Dra Yara Gomes pela orientação e pelo exemplo profissional.

A Virginia Lorena pelo apoio e pela amizade, além da co-orientação que foi imprescindível para conclusão deste trabalho.

Aos grandes amigos que fiz na CPqAM/Fiocruz no decorrer do mestrado e que tanto colaboraram para a conclusão desta etapa profissional.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz) por disponibilizar a infra-instrutora necessária para o desenvolvimento do projeto.

A equipe do Ambulatório de doença de Chagas (HUOC/UPE) pela colaboração na seleção dos pacientes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

BRAZ, Suellen Carvalho de Moura. **Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

Muitos estudos têm associado à resposta imune do hospedeiro ao *Trypanosoma cruzi* com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Contudo, pouco se sabe sobre o papel das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ na infecção humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune específica de indivíduos portadores da doença de Chagas frente à CRA (Antígeno Repetitivo Citoplasmático) e FRA (Antígeno Repetitivo Flagelar), relacionando a presença dos linfócitos T regulatórios com formas clínicas crônicas da doença. A população do estudo foi selecionada no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/Universidade de Pernambuco, sendo constituída por portadores das formas cardíaca severa (FCS) (n=11) e indeterminada (FI)(n=20) da doença e de indivíduos não infectados (NI)(n=9). Células mononucleares de sangue periférico, obtidas do sangue coletado dos participantes, foram cultivadas na presença de CRA e FRA. A presença de linfócitos Tregs foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo. Portadores da FI apresentaram maiores níveis de células T CD4⁺CD25⁺ que os indivíduos com a FCS. Também verificamos maior frequência da molécula CD25 em linfócitos T CD4⁺ de pacientes com a FI. Não verificamos diferença na expressão de FoxP3 e na produção de IL10 por linfócitos T CD4⁺CD25⁺ entre os grupos avaliados. Entretanto, foi observada correlação positiva entre CD25 e IL10 no grupo de indivíduos portadores da FI, após estímulo com FRA. Nossos achados sugerem que linfócitos T CD4⁺CD25⁺ estão envolvidos no controle dos efeitos deletérios ocasionados pela resposta imune do hospedeiro contra o *T. cruzi*. Contudo, o mecanismo de ação das células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, específicas ao CRA e ao FRA, principalmente quanto a produção de citocinas, deve ser avaliado na doença de Chagas crônica.

Palavras chave: doença de Chagas, células T regulatórias, antígenos recombinantes

BRAZ, Suellen Carvalho de Moura. **Evaluation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in the forms of Chagas disease after *in vitro* stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*.** 2011. Dissertation (Academic Máster in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Several studies have associated host immune response to *Trypanosoma cruzi* with different clinical manifestations of chronic Chagas' disease. However, little is known about the role of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human infection. This study aimed to evaluate the specific immune response in individuals with Chagas disease against CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) and FRA (Flagellar Repetitive Antigen), relating the presence of regulatory T lymphocytes with clinical forms of chronic disease. The study population was selected in Chagas Disease Unit of the Oswaldo Cruz University Hospital/University of Pernambuco, constituted by patients with severe heart form (FCS) (N=11), indeterminate form (FI)(n=20) and uninfected individuals (NI)(n=9). Peripheral blood mononuclear cells, obtained from participants blood, are cultivated with CRA e FRA. Presence of regulatory T lymphocytes was measured by flow cytometry. Patients with FI showed highest level of CD4⁺CD25⁺ T cells that FCS individuals. We also found a higher frequency of CD25 molecule on CD4⁺ T cells of patients with FI. There was no difference in FoxP3 expression and IL10 production by CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes among groups. However, was observed a positive correlation between CD25 and IL10 in FI group, after stimulation with FRA. Our findings suggest that CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes are involved in control of deleterious effects occasioned by host immune response against *T. cruzi*. Nevertheless, the action mechanism of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells, specific to CRA and FRA, especially regarding cytokine production, should be evaluated in chronic Chagas' disease.

Keywords: Chagas disease, regulatory T cells, recombinant antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aquisição e análise dos linfócitos	30
Figura 2. Análise da expressão de FoxP3 e da produção de IL10 por linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺	31
Figura 3. Cinética para a detecção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ (A e B), CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ^{high} (C e D) e CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL10 ⁺ (E e F) em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	36
Figura 4. Detecção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	37
Figura 5. Detecção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ^{high} em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	38
Figura 6. Detecção de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL10 ⁺ em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	39
Figura 7. Comparação entre CRA e FRA quanto à proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ e IL10 ⁺ em portadores das formas cardíaca severa (■) e indeterminada (▣) da doença de Chagas	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Aloficocianina
Capex	Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior
CD	Grupos de diferenciação
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRA	Antígeno Repetitivo Citoplasmático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Forma cardíaca
FCS	Forma cardíaca severa
FD	Forma digestiva
FI	Forma indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FoxP3	Fator de transcrição da família <i>Forhead 3</i>
FRA	Antígeno Repetitivo Flagelar
FSC	Dispersão frontal
HEMOPE	Hemocentro de Pernambuco
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
NI	Grupo de indivíduos não infectado
NK	Células exterminadoras naturais
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina

RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	Dispersão lateral
TGF- β	Fator de crescimento beta e transformação
Th1	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 1
TNF-- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos clínicos da doença de Chagas	14
1.2 Mecanismos determinantes no desenvolvimento dos quadros clínicos na doença de Chagas: a resposta imune do hospedeiro	16
1.3 Imunorregulação na doença de Chagas: linfócitos T regulatórios	17
1.4 Antígenos recombinantes do <i>T. cruzi</i>: CRA e FRA	18
2 JUSTIFICATIVA	21
3 HIPÓTESE	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo geral	23
4.2 Objetivos específicos	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 População do estudo	24
5.2 Coleta de sangue	25
5.3 Sorologia para infecção pelo <i>T. cruzi</i>	25
5.4 Antígenos recombinantes – CRA e FRA	26
5.5 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)	26
5.6 Cultura celular	27
5.7 Marcação de superfície e citocinas intracitoplasmáticas	27
5.8 Citometria de Fluxo	28
5.8.1 Aquisição e análise dos linfócitos T regulatórios	29
5.9 Avaliação do perfil de células T regulatórias após estímulo com CRA e FRA	31
5.10 Análise estatística	32
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
7 RESULTADOS	35
7.1 Padronização da cinética do tempo de cultivo versus resposta .	35

7.2	Perfil de linfócitos T regulatórios em portadores crônicos da doença de Chagas após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	37
7.2.1	Linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	37
7.2.2	Linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ^{high} após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	38
7.2.3	Linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ IL10 ⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA.	39
7.3	Comparação entre o desempenho dos antígenos CRA e FRA em induzir a resposta de linfócitos T regulatórios e produção de IL10	39
7.4	Avaliação da frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	41
7.5	Correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	43
8	DISCUSSÃO	44
8.1	Avaliação do perfil de linfócitos T regulatórios após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	45
8.2	Comparação entre o desempenho dos antígenos CRA e FRA em induzir a resposta de linfócitos T regulatórios e produção de IL10	48
8.3	Avaliação da frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	49
8.4	Correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA	50
9	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente	60
	Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle	61
	Anexo A – Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz ...	62

1 INTRODUÇÃO

O médico Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em 1908 no município de Lassance (Minas Gerais), teve seu primeiro contato com o inseto hematófago vetor do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas. A partir de então o pesquisador conduziu trabalhos que permitiram a descrição de detalhes do ciclo de transmissão e as manifestações clínicas do primeiro caso humano, tornando um relato único na história da medicina (COUTINHO; DIAS, 1999; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve obrigatoriamente sua passagem por hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e invertebrados (vetores hematófagos pertencentes à família *Triatominae*). Contudo, outros mecanismos não-vetoriais estão envolvidos na transmissão da doença de Chagas. Dentre estes, às transmissões por transfusão de órgãos e hemoderivados, congênita, oral, por aleitamento materno e acidentes laboratoriais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA, 2002).

Com o objetivo de atuar frente à disseminação da doença de Chagas, na década de 1990 foi implantada a “Ação para eliminar o *Triatoma infestans*” pelos países do Cone Sul (SCHOFIELD; DIAS, 1999). Isto veio reforçar as ações para controle da transmissão desta enfermidade já existentes no Brasil desde 1975 (DIAS, 1987). Como conseqüência, em 2006, a Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde considerou o Brasil livre da transmissão da doença de Chagas através de seu principal vetor (*T. infestans*) e por transfusão de sangue e seus derivados (DIAS, 2006). No entanto, a presença de espécies consideradas vetores secundários como *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (OLIVEIRA FILHO, 1999), aliada a outras formas de transmissão (COURA et al., 2002; GONTIJO et al., 2009; PINTO et al., 2008), subsidiam a manutenção da doença de Chagas como problema mundial de saúde pública no Brasil e no mundo.

Mundialmente, esta endemia se encontra circunscrita do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile, apresenta de 15-16 milhões de infectados na América Latina, com cerca de 75-90 milhões de pessoas expostas à infecção (COURA; DIAS, 2009). Entretanto, tem-se evidenciado o aumento no número de

infectados em muitas partes da Europa e do oeste do Pacífico, ressaltando a expansão da doença para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS, 2007).

No Brasil, foram estimados cerca de dois milhões de indivíduos infectados em 2005, dado comparável ao total de casos estimados para toda a América Central no mesmo período (SCHMUNIS, 2007). Em levantamento realizado acerca do perfil de doadores de sangue no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), no período de 2002 a 2007, foi verificada prevalência de 0,17% para a doença de Chagas (MELO et al, 2009). Gontijo et al. (2009) ao realizarem inquérito sorológico em 63.673 neonatos do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, no período de 2005 a 2006, obtiveram prevalência para doença em puérperas de 0,5%, sendo o risco de transmissão vertical de 0,2% e a incidência congênita de 1,6/100.000 nascidos vivos. Aliados a tais dados, relatos de infecção oral em várias localidades do Brasil demonstram que, mesmo com o sucesso das medidas de controle aos vetores e aos hemoderivados implantadas no país, outras formas de transmissão têm permitido a circulação do *T. cruzi* (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2008; VALENTE et al., 1999).

1.1 Aspectos clínicos da doença de Chagas

Os portadores da doença de Chagas apresentam duas fases clínicas características. A fase aguda tem duração de dois a quatro meses, com elevado número de parasitas na corrente sanguínea e nos tecidos do hospedeiro (RASSI et al., 1992). A infecção aguda é acompanhada de ativação excessiva do sistema imune, com elevação dos níveis plasmáticos de citocinas e intensa ativação de linfócitos B e T (JUNQUEIRA et al., 2010). Os pacientes nesta fase da infecção podem ou não apresentar sintomas, que variam de febre e edema a linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, com miocardite e meningoencefalite em casos mais graves (COURA, 2007; JUNQUEIRA et al., 2010).

Cerca de dois a quatro meses após o término da fase aguda inicia-se a fase crônica da doença, caracterizada pela presença do parasita nos tecidos, redução da parasitemia e elevação de anticorpos anti-*T. cruzi* circulantes. No começo desta fase

a infecção é geralmente assintomática. Contudo, com a evolução da doença de Chagas, o curso clínico dos portadores varia da ausência de sintomas (forma indeterminada – FI) a doença grave com envolvimento cardiovascular (forma cardíaca - FC) e/ou digestivo (forma digestiva - FD). Cerca de 50-60% dos pacientes apresentam a FI da doença, 20-30% desenvolvem a FC e 8-10% apresentam alterações anatômicas e funcionais de esôfago e cólon, características da FD. Uma minoria dos infectados pelo *T. cruzi* pode demonstrar FC e FD simultaneamente (forma mista) ou acometimento do sistema nervoso (forma nervosa) (DIAS, 1989; RASSI; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Os pacientes com a FI são caracterizados pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG detectados por métodos sorológicos, eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais. Já os portadores das formas crônicas sintomáticas, além da soropositividade ao *T. cruzi*, demonstram alteração em um ou mais desses exames (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA, 2002).

A FC inclui amplo espectro de manifestações, que vão da presença de anormalidades silenciosas, até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária ou a morte súbita. A cardiopatia chagásica crônica é a principal responsável pela elevada morbidade-mortalidade da doença. Sendo assim, a presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença (BRASIL, 2005).

Na FD da doença, infiltração linfocítica focal e degeneração neuronal com desnervação são características no megaesôfago e no megacólon (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Pacientes soropositivos para a doença de Chagas que apresentam queixas clínicas relacionadas ao trato gastrointestinal demonstram fortes indícios de acometimento digestivo. A confirmação ocorre através de alterações reveladas no raio X do esôfago e do colón, na endoscopia, no enema opaco ou na colonoscopia. O megaesôfago causa disfagia combinada com dor epigástrica, regurgitação, ptialismo e desnutrição em casos mais severos. Por sua vez, o megacólon afeta o segmento sigmóide, reto ou cólon descendente, ou a combinação, e produz prolongada constipação, distensão abdominal e ocasionalmente obstrução do intestino grosso (BRASIL, 2005; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

1.2 Mecanismos determinantes no desenvolvimento dos quadros clínicos na doença de Chagas: a resposta imune do hospedeiro

Os mecanismos relacionados ao estabelecimento da variedade de quadros clínicos desenvolvida na fase crônica da doença de Chagas são multifatoriais, envolvendo aspectos ligados tanto ao parasita quanto ao hospedeiro (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Trabalhos demonstrando o polimorfismo do *T. cruzi* (BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003), bem como as distintas populações genéticas do parasita (VAGO et al., 2000), sugerem que a evolução clínica dos portadores crônicos seja influenciada pelo protozoário. Contudo, o isolamento de parasitas geneticamente semelhantes em indivíduos portadores das distintas formas clínicas (MACEDO et al., 2004; VAGO et al., 2000) associado a trabalhos que demonstram o papel da resposta imunológica na evolução da infecção, são indícios de que o *T. cruzi* não seja o principal fator desencadeador do dano tecidual (DUTRA et al., 1994; BARROS-MAZON et al., 2004; GOMES et al., 2003).

A teoria imune afirma que indivíduos com a FI são capazes de reduzir o número de parasitas na fase inicial da infecção, modulando a resposta imune e limitando assim o desenvolvimento de patologia. Por outro lado, o sistema imunológico dos portadores crônicos que não conseguem manter de forma eficiente os mecanismos imunoregulatórios, mesmo sendo capazes de controlar a parasitemia, permite o estabelecimento de inflamação persistente com desenvolvimento de quadro clínico sintomático (DUTRA; GOLLOB, 2008). O suporte a este conceito é a elevada frequência de células T ativadas encontrada em indivíduos com as formas indeterminada e cardíaca (DUTRA et al., 1994), evidenciando assim a importância na investigação das populações celulares, e conseqüentemente de seus produtos, no intuito de melhor compreender a gama de manifestações apresentadas na fase crônica.

Diversos fatores imunológicos têm sido descritos como importantes no desenvolvimento das formas clínicas graves da doença de Chagas. Experimentos utilizando amostras humanas constataram uma resposta imune citotóxica entre os indivíduos crônicos sintomáticos, com produção de células T CD8⁺ e citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IFN- γ (CARDOSO et al., 2006; MENEZES et al., 2004). Além disso, os elevados níveis de IFN- γ foram correlacionados com o nível de

severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução para a FC (GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010). Por sua vez, a alta frequência de linfócitos T CD4⁺ e de IL10, citocina antiinflamatória, em portadores da FI evidencia um ambiente imunológico regulatório (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003; MENEZES et al., 2004).

1.3 Imunorregulação na doença de Chagas: linfócitos T regulatórios

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro às doenças, uma linhagem específica de células T vem sendo estudada, os linfócitos T regulatórios (regs) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Trata-se de uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) (SAKAGUCHI et al., 1995). Esta população celular representa de 2 a 10% de células T CD4⁺, sendo normalmente procedentes do timo (SAKAGUCHI, 2004). Aliada a essa geração tímica, células T periféricas podem converter-se nestes linfócitos *in vivo* após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia. Para isso, adquirem a expressão do *forhead transcription factor 3* (FoxP3) (APOSTOLOU; VON BOEHMER, 2004; CUROTTO DE LAFAILLE et al., 2004; WALKER et al., 2003). O gene regulador FoxP3, expresso especificamente pelas células Tregs CD4⁺CD25⁺, controla o desenvolvimento e função destes linfócitos (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). Mutações neste gene levam a deficiência ou má função destas células, tendo como consequência o desenvolvimento de patologias autoimunes e/ou desordens inflamatórias (ZIEGLER, 2006).

Os linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ modulam a resposta imune a antígenos próprios, tumorais e exógenos, assim como agentes infecciosos através da supressão da produção e proliferação de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺, regulação da ativação e ação citolítica das células CD8⁺, além de modulação da resposta imune humoral (KOTNER; TARLETON, 2007). Suprimindo o efeito potencialmente patológico das células T efetoras durante a infecção, estas células

Tregs limitam o dano tecidual originado pela resposta imune exacerbada (BELKAID; ROUSE, 2005).

Poucos estudos têm mostrado o papel destas células na doença de Chagas humana. Avaliando amostras de sangue periférico de portadores da doença através da citometria de fluxo, Vitelli-Avelar et al. (2005) observaram maior frequência de células Tregs $CD4^+CD25^{high}$ na FI em comparação com indivíduos FC, FD e não-infectados. O valor de células Tregs $CD4^+CD25^{high}$ observado na FI foi significativamente maior em comparação a FC em crianças portadoras da doença de Chagas (VITELLI-AVELLAR et al., 2006). Araujo et al. (2007) também verificaram por citometria de fluxo que estes linfócitos apresentavam-se em maior porcentagem entre os indivíduos da FI quando comparados aos da FC e não-infectados após estímulo *in vitro* das amostras de sangue total com antígenos de epimastigota. Tais achados sugerem que a presença de linfócitos $CD4^+CD25^+$ na doença de Chagas estaria associada ao controle dos danos teciduais causados pela resposta imune, evitando assim o desenvolvimento de quadro clínico crônico sintomático.

Kotner e Tarleton (2007), não detectaram diferença na resposta das células T $CD8^+$ entre camundongos infectados cronicamente pelo *T. cruzi* após depleção de células Tregs e os animais controles. Também não foi verificada expressão de FoxP3 nos linfócitos oriundos de tecidos musculares e do baço desses camundongos infectados, demonstrando que possivelmente a regulação das células T $CD8^+$ não seja o principal mecanismo de atuação das Tregs na infecção em camundongos. Além disso, ainda não se encontra comprovado o mecanismo de ação destas células na infecção chagásica humana, podendo estas apresentarem formas distintas de atuação.

1.4 Antígenos recombinantes do *T. cruzi*: CRA e FRA

As divergências encontradas na literatura acerca dos padrões de resposta imune na doença de Chagas podem estar relacionadas ao emprego de preparações antigênicas solúveis do parasita. Por serem misturas complexas de antígenos de *T. cruzi*, estas preparações não permitem a detecção de uma resposta imune

específica. Diante disso, vem sendo dada grande importância a utilização de antígenos recombinantes específicos do parasito (LORCA et al., 1992).

Recentemente o nosso grupo tem avaliado o emprego de antígenos recombinantes na investigação de marcadores imunológicos de evolução das formas clínicas da doença de Chagas. Estes antígenos, CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen* ou antígeno citoplasmático repetitivo) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen* ou antígeno flagelar repetitivo) (KRIEGER et al., 1992; LAFAILLE et al., 1989), quando avaliados no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* (GADELHA et al., 2003; GOLDENBERG, 1991; GOMES et al., 2001; KRIEGER et al., 1992), no acompanhamento após o tratamento etiológico (SILVA et al., 2002) e em estudos acerca da resposta celular e humoral na doença de Chagas em camundongos (PEREIRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2005) e humanos (LORENA et al., 2008; LORENA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2010; VERÇOSA et al., 2007), demonstraram relevantes resultados.

Verçosa et al. (2007) avaliaram o perfil isotípico das Imunoglobulinas G em portadores crônicos da doença de Chagas frente a CRA e FRA utilizando a metodologia de *Enzyme Linked Immunesorbent Assay* (ELISA) indireto. O trabalho permitiu a diferenciação entre os portadores das FC e FI da doença de Chagas através do isotipo IgG2 anti-FRA, que após estudo de seguimento dos portadores da FI poderia ser considerado um marcador de evolução da doença de Chagas .

Investigação acerca da produção de citocinas no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com CRA e FRA demonstrou que apenas o CRA foi capaz de induzir a secreção de TNF- α e IFN- γ por indivíduos chagásicos quando comparados aos indivíduos não chagásicos. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os indivíduos portadores da FC e da FI da doença (LORENA et al., 2008).

Em estudo utilizando sangue total de pacientes chagásicos crônicos, Lorena et al. (2010) verificaram, após estímulo com CRA, que os linfócitos TCD8⁺ de indivíduos portadores da FC severa (cardiomiopatia dilatada) apresentaram maiores níveis de CD8⁺/TNF- α ⁺ e CD8⁺/INF- γ ⁺ que os portadores da FC leve e da FI. Tais achados indicam a ação destas citocinas inflamatórias na gravidade do dano tecidual, podendo funcionar como marcadores biológicos de evolução da doença de Chagas, após acompanhamento dos indivíduos portadores da FI. A produção de IL10 por linfócitos TCD4⁺, presente apenas em portadores da FI da doença após

estímulo com CRA, sugeriu que esta citocina poderia estar ligada a manutenção do estado assintomático destes pacientes.

Vasconcelos et al. (2010), investigando a presença de IgA específica para CRA e FRA verificaram que pacientes da FD apresentaram maiores níveis desta imunoglobulina que os indivíduos com FC e FI, sendo sua detecção uma potencial ferramenta para o acompanhamento destes pacientes, após realização de estudo de seguimento dos portadores da doença de Chagas.

Desse modo, descrições relacionadas ao papel do sistema imunológico na doença de Chagas, que utilizem antígenos recombinantes, demonstram ser de fundamental importância para o esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença por permitirem determinar a relação entre padrões celulares e as diferentes formas clínicas apresentadas pelos pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

A dificuldade em identificar a doença de Chagas na fase aguda faz com que muitos indivíduos apenas sejam diagnosticados quando a fase crônica da doença se encontra instalada, o que impossibilita o emprego do Benzonidazol, já que na fase crônica o *T. cruzi* encontra-se menos susceptível ao tratamento etiológico. Aliado a isso, portadores da FI da doença de Chagas, mesmo não apresentando manifestações clínicas, são estigmatizados e ditos incapazes, erroneamente, de exercerem suas funções no trabalho e atividades diárias. Neste caso, a detecção da infecção pelo *T. cruzi* resulta na recusa destes pacientes durante o processo de admissão ao emprego, o que gera um problema psico-social.

Diante disto, pesquisas que venham a estabelecer condutas para melhoria da qualidade de vida dos portadores crônicos da doença de Chagas tornam-se cada vez mais necessários, sendo recomendados pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005) e pelo Programa Integrado em Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz), do qual nosso grupo é participante ativo.

Estudos que avaliem os padrões celulares e as citocinas produzidas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas são de fundamental importância para que se possam compreender os mecanismos de desenvolvimento da patologia chagásica. A definição dos padrões celulares envolvidos no desenvolvimento clínico desta patologia irá permitir o estabelecimento de novos métodos prognósticos aliados a novas terapêuticas, possibilitando aos portadores da doença de Chagas direitos trabalhistas frente às empresas e ao INSS.

Considerando a importância atribuída por Vitelli-Avelar et al. (2005, 2006) e Araujo et al. (2007) aos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ no controle do dano tecidual na FI da doença, e o potencial valor prognóstico dos antígenos recombinantes CRA e FRA demonstrado por nosso grupo de pesquisa, nos propomos a avaliar a resposta imune específica de indivíduos portadores da doença de Chagas frente a CRA e FRA, relacionando a presença dos linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ com formas clínicas crônicas da doença.

3 HIPÓTESE

Indivíduos portadores da FI da doença de Chagas apresentarão maiores níveis de linfócitos T regulatórios $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ após estímulo com CRA e FRA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a população de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em pacientes portadores de formas clínicas crônicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi*, relacionando tais padrões com o desenvolvimento da patologia clínica.

4.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar as populações de células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} presentes em PBMC obtido de portadores crônicos da doença de Chagas, após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA;
- b) Relacionar o perfil da citocina IL10 produzida por células T CD4⁺CD25⁺, após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA;
- c) Comparar a capacidade de induzir a resposta de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} regulatórios e produção da citocina IL10 dos antígenos recombinantes CRA e FRA;
- d) Avaliar a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} e CD4⁺CD25⁺IL10⁺ entre os portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- e) Correlacionar as moléculas CD25, FoxP3 e IL10 de linfócitos T CD4⁺ após estímulo com CRA e FRA.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 População do estudo

A seleção do grupo de portadores da doença de Chagas foi realizada no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Osvaldo Cruz (HUOC), da Universidade de Pernambuco (UPE). Os pacientes foram selecionados através de três critérios:

1. Sorologia reagente para a infecção chagásica através da realização de dois ELISAs com preparações antigênicas diferentes ou dois testes com princípios metodológicos diferentes (ELISA e/ou hemaglutinação indireta e/ou imunofluorescência indireta) (dados obtidos no prontuário médico);
2. Exames clínicos para a caracterização das formas clínicas (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago e enema opaco quando necessário);
3. Não ter sido submetido ao tratamento etiológico.

Para caracterizar os pacientes quanto ao seu estado clínico, consultamos os médicos colaboradores deste projeto, sendo estes profissionais também responsáveis pelo acompanhamento e tratamento dos portadores da doença de Chagas. Foram selecionados indivíduos portadores da forma cardíaca severa (FCS) (n=11) e da forma indeterminada (FI) (n=20).

Os pacientes portadores de acometimento cardíaco foram classificados como FCS quando apresentaram alteração no ecocardiograma com fração de ejeção inferior a 40%, eletrocardiograma e/ou raio-X de tórax também alterados, ausência de dilatação do esôfago e de queixas digestivas (engasgos e constipação). Os portadores da doença de Chagas classificados como FI apresentaram-se assintomáticos na anamnese médica, com exames clínicos dentro da normalidade.

Um grupo de nove indivíduos voluntários não infectados (NI) foi composto para comparação com os portadores da doença de Chagas com o preenchimento de três critérios:

1. Ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas;

2. Nunca ter recebido transfusão de sangue;
3. Ter apresentado testes sorológicos não reagentes para a doença de Chagas.

5.2 Coleta de sangue

Para os ensaios de padronização da cinética tempo de cultivo *versus* resposta cerca de 45mL de sangue foram coletados em tubos à vácuo contendo heparina sódica (Vacuette), sendo o volume utilizado nos procedimentos pós-padronização de 15mL. Cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo seco (Vacuette) para obtenção de soro para realização dos testes sorológicos. O soro obtido após a coagulação e centrifugação (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente) das amostras foi aliquoteado, identificado e armazenado a temperatura de -20°C na Soroteca de doença de Chagas/Laboratório de Imunoparasitologia/CPqAM-Fiocruz.

5.3 Sorologia para infecção pelo *T. cruzi*

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica. Um constituído por mistura de antígenos do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III) proveniente de Bioschile Ingenieria Genetica S.A. O outro utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Imuno-ELISA Chagas) proveniente de Wama Diagnóstica. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentaram reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentaram reatividade (BRASIL, 2005).

5.4 Antígenos recombinantes – CRA e FRA

Os antígenos recombinantes CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz. Os perfis protéicos dos lotes foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (LAEMMILI, 1970) e coloração pelo corante para proteínas Comassie Blue. Contaminação por proteínas bacterianas foi verificada através da coloração pela prata (MORRISSEY, 1981). Verificamos que os lotes dos antígenos CRA e FRA utilizados no trabalho apresentaram boa conservação, não sendo verificada contaminação por outras proteínas.

5.5 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

No fluxo laminar, ao sangue heparinizado foi adicionado, na proporção de 1:1, meio RPMI 1640 (Sigma) acrescido de solução de Penicilina/ Estreptomicina a 1% (Sigma). Esta mistura foi então adicionada ao Ficoll-Paque (GE Healthcare) (proporção de 1:1) para obtenção do anel de PBMC através de gradiente de densidade após centrifugação (900 x g/ 30 min a 20°C). As células foram submetidas a duas lavagens com meio RPMI 1640 (proporção de 1:2), através de centrifugações (400 x g/ 10 min a 20°C). Após última centrifugação o *pellet* de PBMC foi então ressuspenso em meio RPMI 1640 suplementado (RPMI 1640, Solução de Penicilina/ Estreptomicina a 1%, soro bovino fetal a 10% - SIGMA), com as células sendo contadas em câmara de Neubauer (Loptik Labor) utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma) (diluição 1:10).

5.6 Cultura celular

As culturas celulares foram realizadas em tubos de polipropileno de 14mL (BD Systems) contendo meio RPMI 1640 suplementado, tendo volume final de 2mL. Para cada amostra foi realizado cultivo de 1×10^6 células/mL, sendo estimuladas separadamente com Fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO™/ Invitrogen Corporation) (5µg/mL) como controle positivo, CRA e FRA (2µg/mL), além de uma cultura sem estímulo (controle negativo). Os tubos foram incubados em estufa a 37°C com 5% CO₂. Para padronização da cinética tempo de cultivo *versus* resposta foram utilizadas amostras provenientes de 11 pacientes (FCS=5/FI=6) portadores da doença de Chagas para avaliação dos tempos de um, três e cinco dias de cultura, sendo escolhido para a execução do trabalho o tempo de três dias de cultivo.

5.7 Marcação de superfície e citocinas intracitoplasmáticas

Nas quatro horas que antecederam o término do tempo de cultivo foi adicionada em cada cultura 20µL de Brefeldina A (Sigma) (10µg/ml). A utilização desta substância assegura a retenção da citocina no interior celular, uma vez que interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do Complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991). Ao final do tempo de proliferação celular, 220µL de EDTA 20mM (Sigma) foram adicionados às culturas, com incubação de 15 minutos. As células foram então transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (BD Systems) devidamente identificados, sofrendo lavagem com PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma; azida sódica a 0,1% / Sigma) e centrifugação (300 x g por 5 minutos à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionada a marcação de superfície celular (anti-CD4-FITC/Caltag; anti-CD25-APC/Invitrogen), com posterior incubação por 30 minutos ao abrigo da luz. Com o término desta etapa, as células foram lavadas com PBS-Wash, centrifugadas (300 x g por 5 minutos à temperatura ambiente), com subsequente descarte do sobrenadante. Para fixação, as células foram tratadas com Tampão Human FoxP3 A 1X (Human FoxP3 Buffer Set - BD Biosciences®) por 10 minutos.

As etapas seguintes consistiram em lavagem com PBS-Wash, centrifugação (300 x g por 5 minutos à temperatura ambiente) e remoção do sobrenadante. Para permeabilização, foi adicionado Tampão FoxP3 C (Human FoxP3 Buffer Set - BD Biosciences®), com incubação de 30 minutos ao abrigo da luz. A amostra sofreu então nova lavagem com PBS-Wash, sendo então adicionados os anticorpos para marcação intracelular (anti-FoxP3-PE/ BD Pharmingen; anti-IL10-PE/Caltag). Ao final dos 30 minutos de incubação, foram realizadas novas etapas de lavagem, centrifugação (300 x g por 5 minutos à temperatura ambiente) e descarte do sobrenadante, sendo o procedimento finalizado com a fixação das células com 200µL de BD Cytotfix™ (BD Biosciences®). Os tubos foram estocados na geladeira a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

5.8 Citometria de Fluxo

A aquisição e análise das amostras foi realizada na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/CPqAM/Fiocruz. Através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems) podemos avaliar o tamanho (*Forward Scatter*-FSC) e granulosidade das células (*Side Scatter*-SSC), além das fluorescência tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. A análise dos dados adquiridos foi realizada no *software* CellQuestPro acoplado ao computador.

As aquisições e análises no citômetro de fluxo obedeceram às Normas de Boas Práticas de Laboratório instituídas no CPqAM/Fiocruz pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS/ Fiocruz).

5.8.1 Aquisição e análise dos linfócitos

A população de linfócitos foi selecionada através de *dot plot* FSC *versus* SSC, sendo adquiridos 30.000 eventos dentro da janela R1. Após a seleção da janela de interesse (R1), os linfócitos T CD4⁺ e T CD25⁺, bem como a citocina IL10 e o fator de transcrição FoxP3 foram analisados pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Tais gráficos possibilitaram estabelecer as modalidades FL1 (CD4-FITC) *versus* FL2 (FoxP3-PE ou IL10-PE), FL1 (CD4-FITC) *versus* FL4 (CD25-APC) e FL2 (FoxP3-PE ou IL10-PE) *versus* FL4 (CD25-APC) (Figura 1).

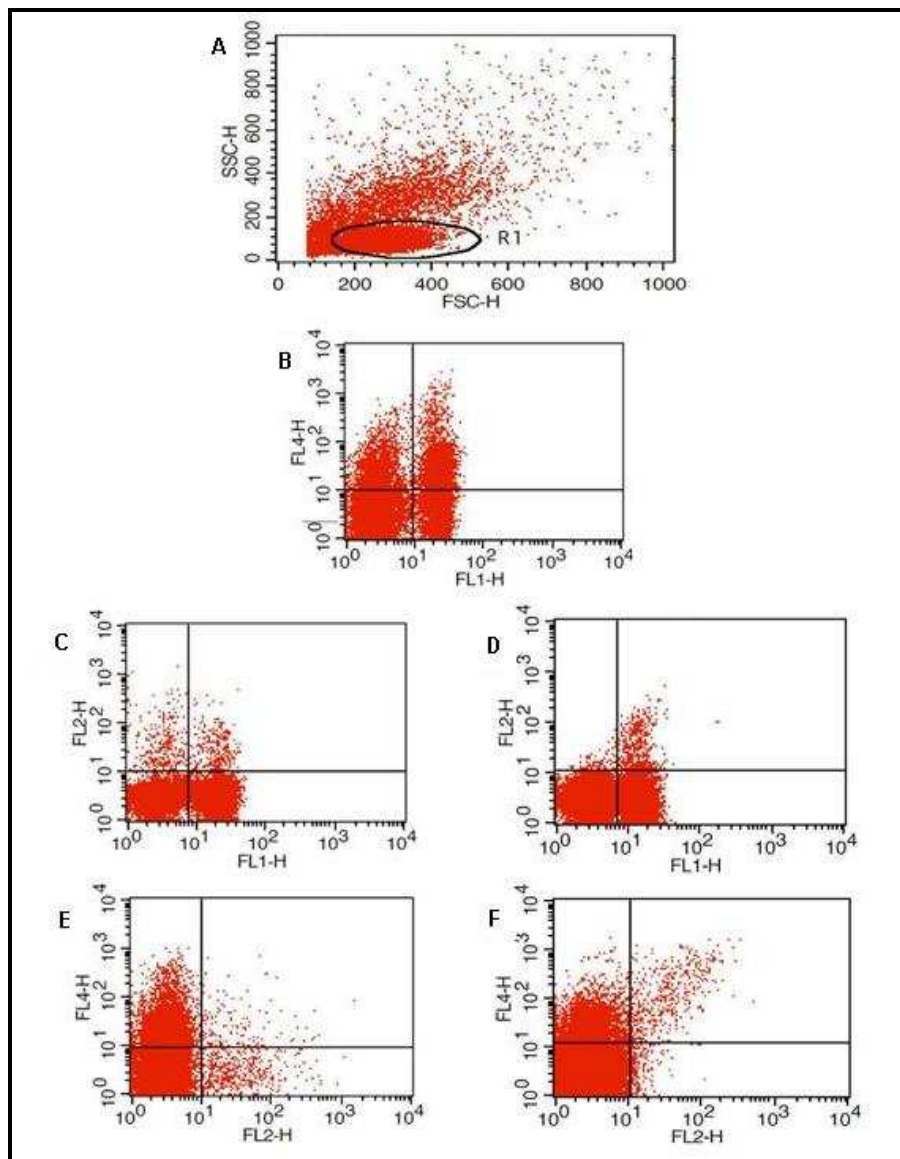


Figura 1. Aquisição e análise dos linfócitos.

Legenda: (A) FSC versus SSC; (B) CD4(FL1) versus CD25(FL4); (C) CD4(FL1) versus IL10(FL2); (D) CD4(FL1) versus FoxP3(FL2); (E) CD25(FL4) versus IL10(FL2); (F) CD25(FL4) versus FoxP3(FL2).

Para realizar a análise da expressão de FoxP3 e da produção de IL10 por linfócitos T $CD4^+CD25^+$ foi selecionada a janela de interesse (R2) no gráfico FL1 (CD4-FITC) *versus* FL4 (CD25-APC), obtendo gráficos bidimensionais FL2 (FoxP3-PE ou IL10-PE) *versus* FL4 (CD25-APC), representativos das células triplamente marcadas ($CD4^+CD25^+FoxP3^{high}$ e $CD4^+CD25^+IL10^+$) (Figura 2).

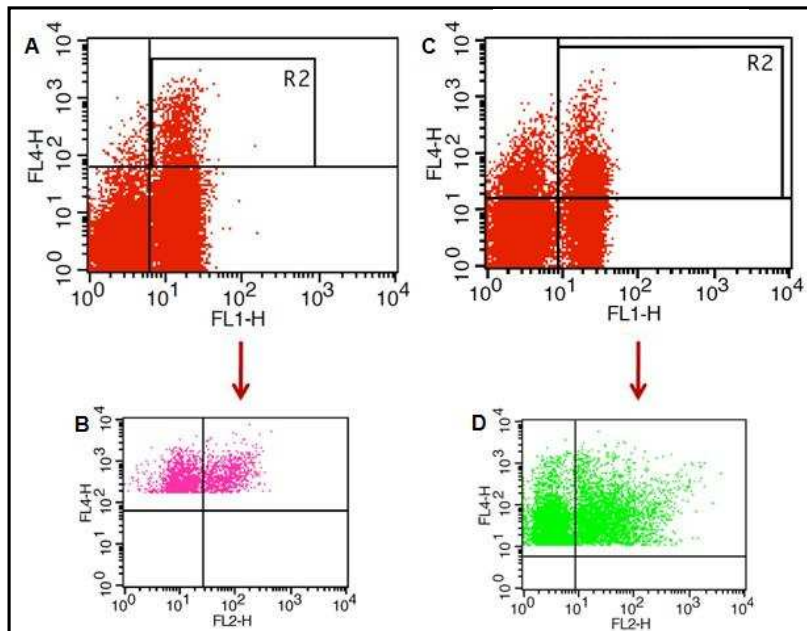


Figura 2. Análise da expressão de FoxP3 e da produção de IL10 por linfócitos T $CD4^+CD25^+$.

Legenda: (A) Dot plot CD4 *versus* CD25 marcado com anti-FoxP3; (B) Dot plot $CD4^+CD25^+FoxP3^{high}$; (C) Dot plot CD4 *versus* CD25 marcado com anti-IL10; (D) Dot plot. $CD4^+CD25^+IL10^+$.

5.9 Avaliação do perfil de células T regulatórias após estímulo com CRA e FRA

Os níveis de linfócitos T $CD4^+CD25^+$, bem como a expressão de FoxP3 e a produção de IL10 por estas células, foi obtida pelo quadrante estatístico fornecido pelo programa CellQuest e avaliada conforme descrito abaixo:

1. A média das porcentagens de células duplo-positivas (duas marcações de superfície) e triplo-positivas (duas marcação de superfície e uma intracitoplasmática)

dos indivíduos após estimulação com CRA e FRA foi comparada para verificar se existia diferença entre os grupos FCS, FI e NI;

2. A média das porcentagens de células duplo e triplo-positivas após cultivo com os antígenos recombinantes foi comparada em cada grupo de pacientes (FCS e FI) para verificar se existia diferença entre a estimulação com CRA e com FRA;

3. A média global para células T $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^{high}$ e $CD4^+CD25^+IL10^+$ foi obtida pela média dos valores apresentados pelos 40 indivíduos incluídos no estudo (FCS=11, FI=20, NI=9), segundo Vitelli-Avelar et al. (2008). Esta média foi estabelecida como um *cut-off*, permitindo avaliar a frequência das moléculas CD25 em células T $CD4^+$ e a frequência das moléculas Foxp3 e IL10 em células T $CD4^+CD25^+$;

4. Foram realizadas correlações entre as moléculas CD25, FoxP3 e IL10 de células T $CD4^+$ nos grupos de portadores das FCS e FI da doença de Chagas.

5.10 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de medidas descritivas como: média e desvio padrão. Na avaliação do tempo de cultivo *versus* resposta, a normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk seguido do teste T-Student. Quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para comparar as médias das células T $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^{high}$ e $CD4^+CD25^+IL10^+$ entre os grupos foi aplicado o teste de Bartlett para a homogeneidade de variâncias, sendo o valor de *p* obtido através do teste para médias Anova seguido do teste de Tukey. Para comparação entre CRA e FRA foi utilizado o teste T-Student, com a homogeneidade sendo testada através do teste de Bartlett seguido do teste de Bonferroni. Para avaliar a frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T $CD4^+$ realizamos o teste Qui-quadrado de proporções. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliação das correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 nas células T $CD4^+$. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000, GraphPad

Prism 5.0 e o Statistical R 2.9.0 (The R Project for Statistical Computing: www.r-project.org).

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B). Todas as informações sobre o projeto de pesquisa foram fornecidas, individualmente, antes da coleta de sangue, com o intuito de explicar os objetivos do trabalho e esclarecer que os indivíduos eram livres para se recusarem a participar do estudo, bem como se retirarem quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico feito no ambulatório.

A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (Parecer N°13/2009) (Anexo A).

7 RESULTADOS

7.1 Padronização da cinética do tempo de cultivo *versus* resposta

Realizamos uma cinética tempo *versus* resposta para avaliar a produção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, bem como a expressão de FoxP3 e IL10 por esta população celular, após um, três e cinco dias de cultivo na presença dos antígenos CRA e FRA (Figura 3). Foi observado que, após três e cinco dias de cultivo, portadores da FI da doença de Chagas apresentavam maiores médias de produção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ quando comparados com os portadores da FCS, com esta diferença sendo estatisticamente significativa na presença de FRA (Figura 3B). Não observamos diferença estatística entre os grupos FCS e FI em nenhum dos períodos de cultivo celular avaliados quanto a produção de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} (Figura 3C e D) e CD4⁺CD25⁺IL10⁺ (Figura 3E e F). Ao compararmos os tempos de cultivo, observamos diferença estatística entre um e três e entre um e cinco dias quanto à produção de células T CD4⁺CD25⁺IL10⁺ após estímulo com FRA apenas no grupo de portadores da FI (Figura 3F).

Diante dos resultados obtidos nos experimentos da cinética do tempo de cultivo *versus* resposta, optamos por utilizar o período de três dias para o cultivo celular. Esta escolha foi baseada no fato de não termos verificado diferença significativa entre os períodos de três e cinco de cultura celular, com o período de três dias sendo o que melhor se adequou para a execução dos experimentos.

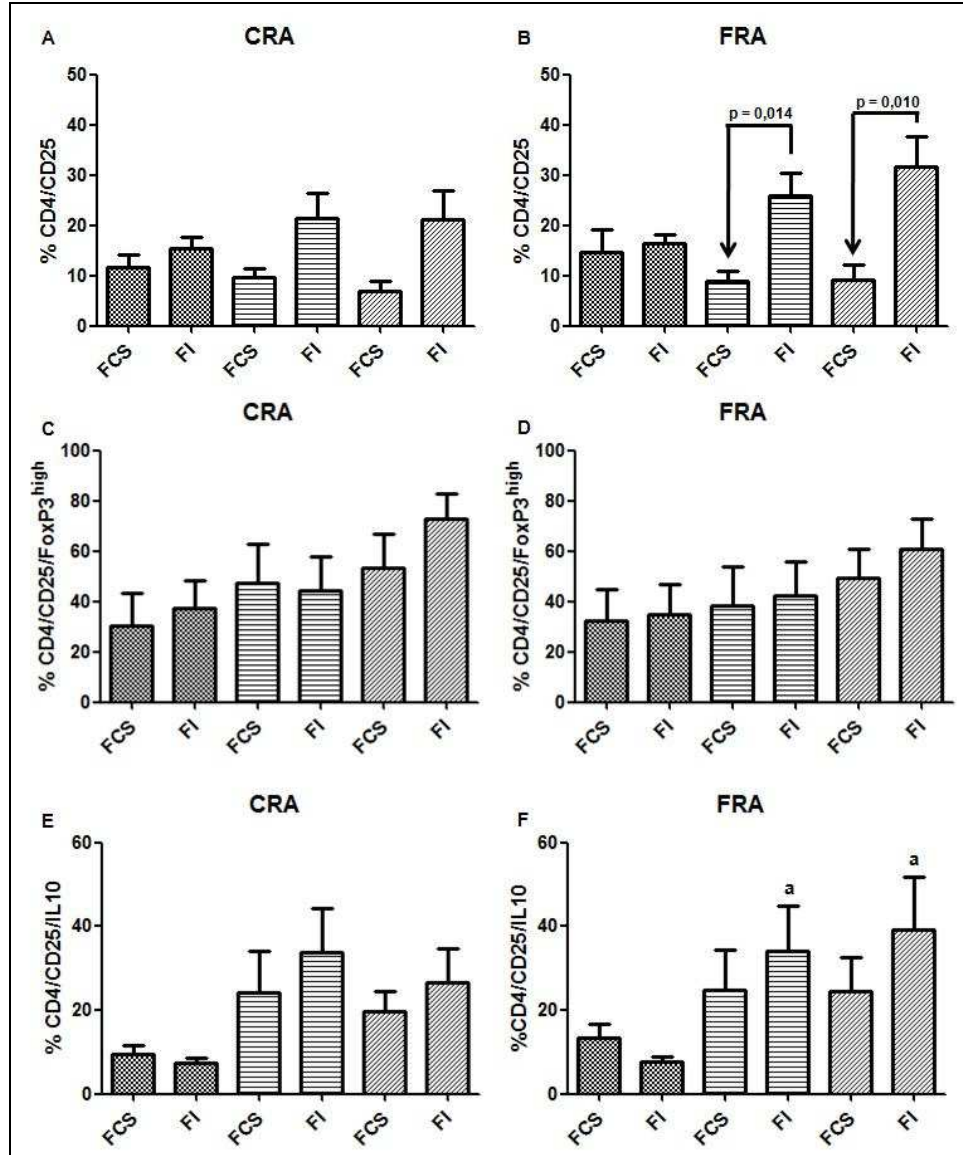


Figura 3. Cinética para a detecção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (A e B), CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} (C e D) e CD4⁺CD25⁺IL10⁺ (E e F) em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com CRA e FRA. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$. As diferenças estatísticas estão representadas pela letra 'a' para a comparação com um dia de cultivo.

Legenda: Um dia de cultivo (▣); Três dias de cultivo (▤); Cinco dias de cultivo (▥); (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*; (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença.

7.2 Perfil de linfócitos T regulatórios em portadores crônicos da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

7.2.1 Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Foi observado que na presença dos antígenos recombinantes CRA e FRA os indivíduos classificados na FI da doença de Chagas demonstraram maior média de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em relação aos indivíduos NI e aos portadores da FCS, sendo a diferença entre os dois grupos de pacientes (FI e FCS) estatisticamente significativa (Figura 4).

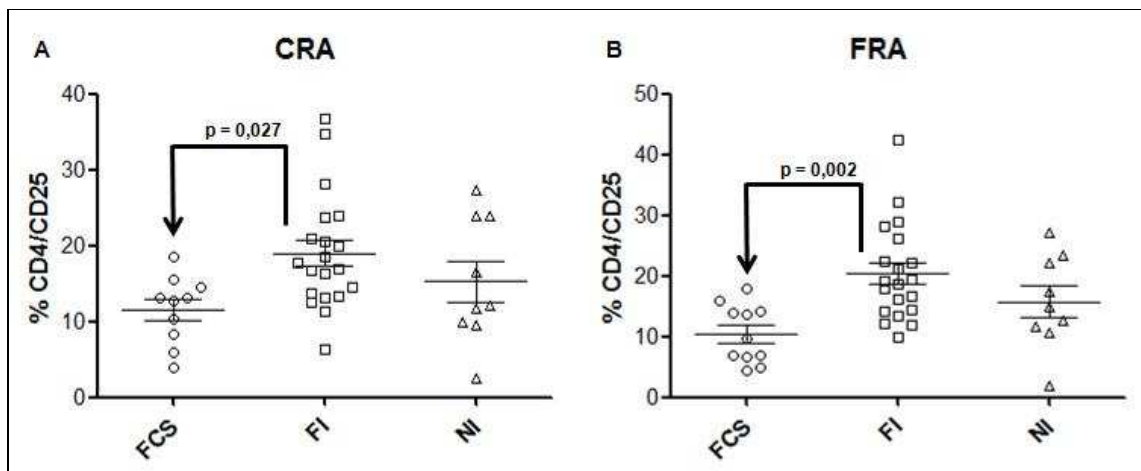


Figura 4. Detecção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo *in vitro* com CRA e FRA.

Legenda: (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença; (NI) Indivíduos não infectados; (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$.

7.2.2 Linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

A Figura 5 demonstra a detecção de células FoxP3^{high} entre os linfócitos T CD4⁺CD25⁺. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos. Contudo, os indivíduos portadores da FI doença de Chagas demonstraram maiores níveis de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} quando comparados aos grupos FCS e NI.

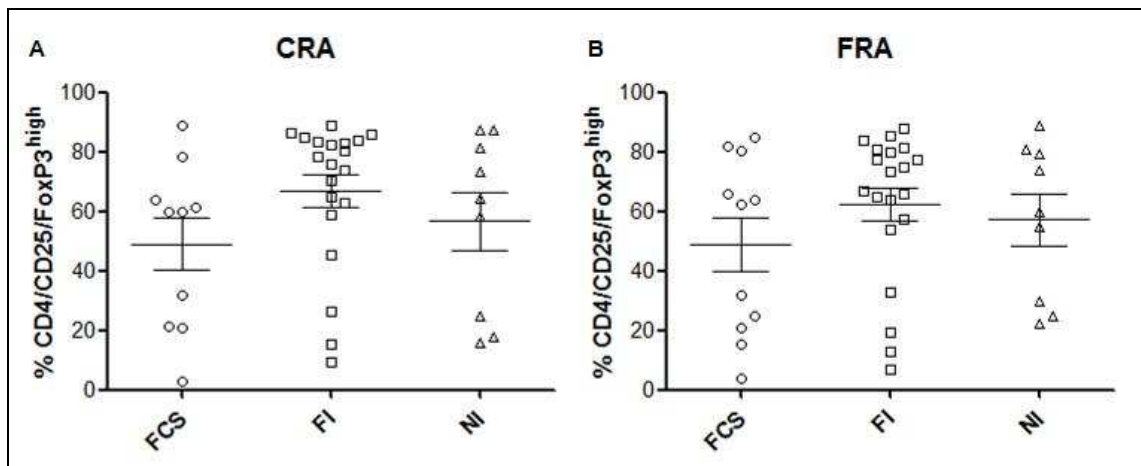


Figura 5. Detecção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo *in vitro* com CRA e FRA.

Legenda: (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença; (NI) Indivíduos não infectados; (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$.

7.2.3 Linfócitos T CD4⁺CD25⁺IL10⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Não foi verificada diferença estatística entre os grupos quanto à produção de IL10 por linfócitos T CD4⁺CD25⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA (Figura 6).

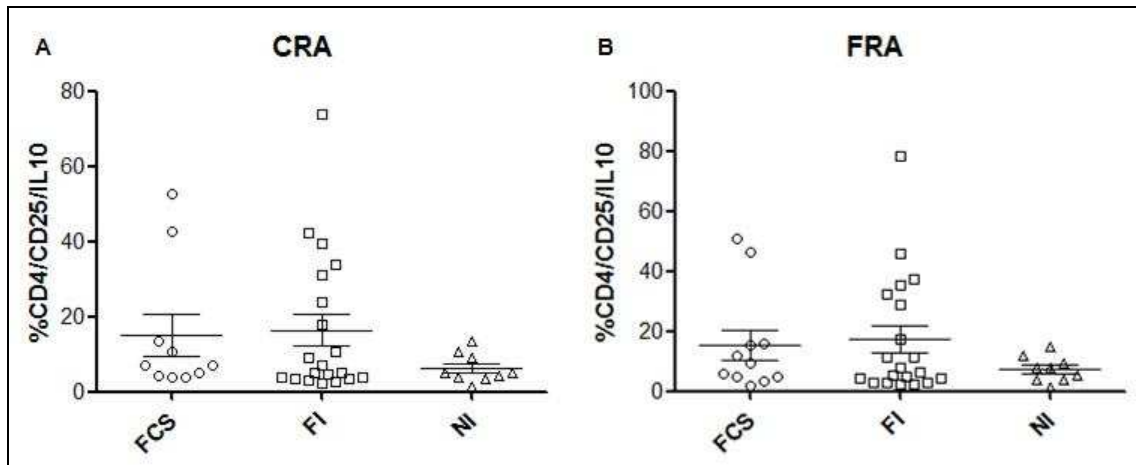


Figura 6. Detecção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺IL10⁺ em PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas e em indivíduos não infectados após estímulo *in vitro* com CRA e FRA.

(FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença; (NI) Indivíduos não infectados; (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*. As barras horizontais representam a média aritmética. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$.

7.3 Comparação entre o desempenho dos antígenos CRA e FRA em induzir a resposta de linfócitos T regulatórios e produção de IL10

Com o objetivo de avaliar os antígenos recombinantes de *T. cruzi*, realizamos uma análise comparativa entre CRA e FRA quanto às suas capacidades em estimular a geração de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ e IL10⁺ em cada grupo de pacientes portadores da doença de Chagas. Não verificamos diferença estatística entre os antígenos após a estimulação *in vitro* em nenhum dos grupos de portadores avaliados (Figura 7).

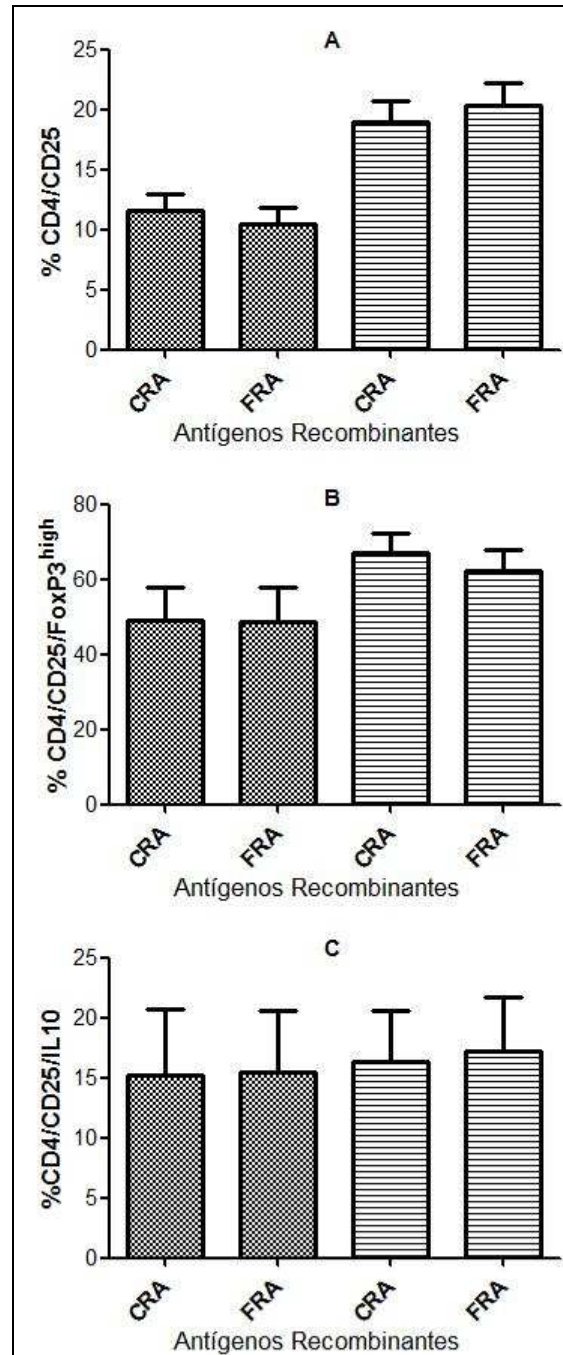


Figura 7. Comparação entre CRA e FRA quanto à proliferação de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ e IL10⁺ em portadores das formas cardíaca severa (■) e indeterminada (▨) da doença de Chagas. Legenda: (A) Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA; (B) Linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} após estímulo *in vitro* com CRA e FRA; (C) Linfócitos T CD4⁺CD25⁺IL10 após estímulo *in vitro* com CRA e FRA. (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*. (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença.

7.4 Avaliação da frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Ao avaliarmos a frequência de CD25 em células T CD4⁺ após estímulo com CRA, verificamos que a maioria dos indivíduos portadores da FI apresentou alta frequência da molécula CD25 em células T CD4⁺ após estímulo com CRA e FRA, sendo significativamente diferente da apresentada pelos pacientes com a FCS. Apesar de não ter sido observada nenhuma diferença estatística, o grupo NI apresentou 44,44% de seus indivíduos com alta frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ na presença de ambos os antígenos recombinantes, enquanto que os portadores da FCS demonstraram baixa frequência após estimulação com CRA (10%) e FRA (9,09%) (Tabela 1).

Quanto à frequência das moléculas FoxP3 e IL10 em células T CD4⁺CD25⁺, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos estudados tanto na presença de CRA quanto na de FRA (Tabela 1). Contudo, maior expressão de FoxP3 ocorreu entre pacientes da FI após estimulação com CRA (75%) e FRA (70%). Além disso, mesmo demonstrando maior frequência que os indivíduos NI, não foi verificada diferença na produção de IL10 entre os dois grupos de portadores da doença de Chagas.

Tabela 1. Frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA.

Linfócitos T CD4 ⁺	Média Global (<i>Cut-off</i>)	Frequência		
		FCS	FI	NI
CD25⁺				
CRA	16,23 (2,51 - 36,77)	10%	61% ^a	44,44%
FRA	16,60 (1,89 - 42,40)	9,09%	70% ^a	44,44%
CD25⁺FoxP3^{high}				
CRA	59,99 (2,65 - 88,96)	50%	75%	55,55%
FRA	57,42 (3,85 - 88,87)	54,54%	70%	55,55%
CD25⁺IL10⁺				
CRA	13,71 (1,65 - 74,06)	20%	40%	0%
FRA	14,48 (1,12 - 78,54)	36,36%	35%	11,11%

Nota: Os dados são expressos como a percentagem dos indivíduos que apresentam percentual de células igual ou maior que a média global (*cut-off*) calculada utilizando os dados de todos os grupos dentro das populações celulares avaliadas. (CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença; (NI) Indivíduos não infectados. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra 'a' para a comparação com a FCS.

7.5 Correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Os valores referentes às correlações entre CD25⁺, FoxP3⁺ e IL10⁺ em células T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA em amostras de portadores das FCS e da FI da doença de Chagas estão expressos na Tabela 3. Após estimulação com FRA, foi observada correlação positiva (0,58) estatisticamente significativa apenas entre IL10 e CD25 no grupo de portadores da FI da doença de Chagas. Por sua vez, quando correlacionamos FoxP3 com CD25 e IL10, observamos correlação negativa estatisticamente significativa tanto na presença de CRA quanto na de FRA dentro do grupo FI.

Tabela 2. Correlação entre CD25, FoxP3, IL10 e CD4⁺ após estímulo *in vitro* de PBMC com CRA e FRA em portadores das FCS e da FI da doença de Chagas.

Células T CD4 ⁺	Coeficiente de Correlação			
	FCS		FI	
	CRA	FRA	CRA	FRA
IL10 x CD25	-0,09	-0,02	0,41	0,58*
FoxP3 x CD25	-0,20	0,04	-0,49*	-0,64*
FoxP3 x IL10	0,16	-0,17	-0,70*	-0,62*

(CRA) *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*; (FRA) *Flagellar Repetitive Antigen*. (FCS) Pacientes portadores da forma cardíaca severa da doença; (FI) Pacientes portadores da forma indeterminada da doença. O * representa a diferença estatística com valor de $p \leq 0,05$.

8 DISCUSSÃO

A fase crônica da doença de Chagas apresenta como característica o desenvolvimento de quadros clínicos com morbidade variada, constituindo grande preocupação médica por seu caráter debilitante. O grande questionamento acerca destes quadros clínicos se encontra inserido na presença de portadores crônicos assintomáticos. Acredita-se que a ausência de sintomas esteja diretamente relacionada com o desenvolvimento de um equilíbrio na relação entre o parasita e o hospedeiro. Nesse sentido, diversos trabalhos têm demonstrado que o sistema imunológico do paciente estaria diretamente relacionado com a evolução para os quadros mórbidos desta patologia (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; BARROS-MAZON et al., 2004; CARDOSO et al., 2006; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010; MENEZES et al., 2004).

Tais estudos afirmam que a gravidade do quadro inflamatório tecidual na doença de Chagas estaria relacionado com um padrão citotóxico de resposta imune (CARDOSO et al., 2006; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010; MENEZES et al., 2004;), enquanto que a ausência de sintomas clínicos seria acompanhada por altos níveis de linfócitos T CD4 e citocinas antiinflamatórias (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010; MENEZES et al., 2004). Estes dados apóiam a hipótese de que um ambiente celular onde a resposta imune contra o *T. cruzi* é equilibrada conduz a manutenção de uma ambiente tecidual ausente de injúrias.

Uma linhagem específica de linfócitos T CD4 tem recebido destaque no meio científico quando se trata de melhor compreender as razões relacionadas à manutenção de uma resposta celular imunorregulada na doença de Chagas: as células Tregs. Contudo, mesmo diante dos relatos de sua função no controle da resposta inflamatória (BELKAID; ROUSE, 2005; FEHÉRVARI; SAKAGUCHI, 2004; SAKAGUCHI et al., 2008) e de sua presença em maiores níveis em indivíduos com a FI (ARAUJO et al., 2007; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006), ainda encontra-se obscuro seu real papel na resposta imune em portadores crônicos da doença de Chagas.

Ao identificar o tipo de resposta imune presente nos portadores da doença de Chagas, os grupos de pesquisa têm por objetivo não só compreender a

imunopatogênese desta parasitose, como definir padrões celulares que possam servir como marcadores biológicos no acompanhamento clínico dos pacientes. No entanto, ainda não foi atingido um consenso quanto aos padrões celulares de cada forma clínica da doença de Chagas (CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; VITELLI-AVELAR et al., 2005). Cogita-se que um fator que pode estar interferindo nesta definição é a utilização, em parte destes estudos, de antígenos complexos oriundos das diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (LORCA et al., 1992).

Os relevantes resultados obtidos de estudos que utilizaram CRA e FRA para a identificação do tipo de resposta imune entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (LORENA et al., 2008; LORENA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2010; VERÇOSA et al., 2007) juntamente com a necessidade em discriminar os linfócitos Tregs como atores no controle à patologia desta enfermidade conduziram este trabalho. Para tal, avaliamos a população de células T CD4⁺ quanto a expressão de CD25⁺ e FoxP3, além da produção de IL10 em pacientes portadores de formas clínicas crônicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com estes antígenos recombinantes de *T.cruzi*. O objetivo foi identificar um potencial marcador biológico para o acompanhamento clínico dos portadores crônicos da doença de Chagas. A definição de marcadores dessa natureza possibilitaria a identificação precoce do dano tecidual, direcionando intervenções de natureza preventiva (ARAUJO et al., 2007; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; LORENA et al., 2010).

8.1 Avaliação do perfil de linfócitos T regulatórios após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Observamos em nosso trabalho que portadores da FI demonstraram maior nível de células T CD4⁺CD25⁺ que os demais grupos após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA. Nossos achados corroboram com os obtidos por outros autores que avaliaram o papel destes linfócitos na imunorregulação da doença de Chagas através da citometria de fluxo (ARAUJO et al., 2007; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006).

Amostras de sangue total de portadores crônicos apresentaram, no contexto *ex vivo*, uma elevada frequência de células T CD4⁺CD25^{high} em indivíduos portadores

da FI da doença. Os autores também observaram correlação negativa entre a presença destes linfócitos e a frequência de células T CD8⁺ entre portadores sintomáticos e assintomáticos da doença de Chagas (VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006).

Araújo et al. (2007), não conseguiram reproduzir os achados de Vitelli-Avelar et al. (2005, 2006) quando avaliaram a presença destas células *ex vivo*. Contudo, indivíduos portadores da FI demonstraram elevada frequência de células T CD4⁺CD25^{high} quando comparados aos portadores de acometimento cardíaco e não-portadores da doença após cultivo de sangue total na presença de antígenos de epimastigota.

Em nosso estudo, um achado que merece discussão é a presença destas células no grupo controle, que demonstrou valor superior ao apresentado pelos portadores da FCS, mesmo não verificando diferença estatística. Emerge a hipótese de que os portadores de acometimento cardíaco, de alguma forma, devem ter perdido a capacidade de gerar a resposta celular necessária para evitar os danos teciduais oriundos da resposta imune contra o parasita. Acredita-se que a constante estimulação antigênica pela persistência do parasita nos tecidos conduza a uma exaustão celular (ALBAREDA et al., 2006, 2009).

Quanto a expressão de FoxP3 em linfócitos T CD4⁺CD25⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA, mesmo não obtendo diferença estatística, observamos que o grupo de indivíduos portadores da FI apresentou maior frequência deste fator de transcrição quando comparado aos demais grupos. Araujo et al. (2007) avaliaram a expressão de FoxP3 em célula T CD4⁺CD25^{high} de portadores crônicos da doença de Chagas (FI e FC) e em não infectados, verificando que este fator de transcrição era altamente expresso por estes linfócitos. Contudo, assim como em nosso estudo, não conseguiram diferenciar estatisticamente os grupos avaliados.

Silveira et al. (2009) averiguaram a presença de FoxP3 em paciente com e sem megacólon através de biópsia da camada muscular e da área do plexo neuronal do colón em portadores da doença de Chagas. Foi verificada alta concentração de células FoxP3⁺ em pacientes que não apresentavam quadro clínico digestivo da doença quando estes foram comparados com pacientes com a FD e com indivíduos não-infectados (SILVEIRA et al., 2009). Este relato, em conjunto com os dados obtidos em nosso trabalho, reforça a possível relação entre a expressão da proteína FoxP3 e os quadros clínicos apresentados na doença de Chagas.

A produção de citocinas imunorregulatórias, como IL10, já foi relatada como tendo grande importância na resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi*. A IL10 atua na regulação da ativação de macrófagos, com conseqüente inibição tanto da liberação de metabólitos tóxicos quanto na diferenciação de células Th1 (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; BRENER; GAZZINELLI, 1997; REED, 1988). A administração de anticorpos neutralizantes de IL10 aumentou a produção de IFN- γ em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992). Camundongos portadores deste parasita nocauteados para o gene de produção da IL10 apresentaram altos níveis de TNF- α , IL12 e IFN- γ em comparação com os animais do grupo controle (HUNTER et al., 1997).

Trabalhos acerca da IL10 na doença de Chagas crônica relatam que humanos portadores da FI produzem esta citocina em maior abundância, contribuindo para o controle do processo inflamatório desencadeador das manifestações das formas severas da doença (ARAÚJO et al., 2007; CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003; MENEZES et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Lorena et al. (2010) verificaram que apenas os indivíduos portadores da FI apresentaram níveis de CD4⁺/IL-10⁺ maiores que os indivíduos NI, sugerindo que a produção de IL10 por linfócitos T CD4⁺ pode realmente, estar exercendo um papel regulatório neste grupo de indivíduos.

Araújo et al. (2007) observaram elevada expressão de IL10 por linfócitos T CD4⁺CD25^{high} em portadores da FI quando comparada a produção em indivíduos não-infectados, não conseguindo diferenciar a FC da FI. Nos dados obtidos em nosso estudo, mesmo não demonstrando diferença estatística, verificamos que portadores da doença de Chagas demonstraram maior produção de IL10 por linfócitos T CD4⁺CD25⁺ quando comparado ao grupo de não-infectados. Mediante tais achados, acreditamos que os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ estejam entre as células responsáveis pela produção desta citocina na doença de Chagas

Contudo, o impasse acerca dos mecanismos definitivos de supressão através da células Tregs é complexo. Entre os possíveis mecanismos mediados por estes linfócitos encontra-se a morte de célula T efetora através do contato direto entre esta e a célula Treg, utilizando para isso mecanismos dependentes de granzimas ou perforinas (SAKAGUCHI et al., 2008; TANG; BLUESTONE, 2008). As células Tregs também podem modular negativamente a expressão de CD80/CD86, receptores de ativação celular, em células apresentadoras de antígenos. Para tal, os linfócitos

Tregs estimulam a produção da enzima idoleamina 2,3-dioxigenase. Esta enzima cataboliza o aminoácido essencial triptofano para quinureninas, que têm efeitos imunossupressor sobre as células apresentadoras de antígenos (CEDERBOM; HALL; IVARS, 2000; FEHÉRVARI; SAKAGUCHI, 2004; SAKAGUCHI et al., 2008).

Quanto ao possível papel das citocinas, o TGF- β produzido por linfócitos Tregs também tem sido relatado como relacionado a atividade supressora destes linfócitos. O bloqueio da capacidade supressora das células Tregs pela presença de anticorpos anti-TGF- β (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; POWRIE et al., 1996) juntamente com a elevada expressão desta citocina na superfície de células T CD4⁺CD25⁺ (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001), sugerem que a ação imunossupressora destes linfócitos ocorre através da interação célula-célula e não por fatores solúveis. Contudo, tais afirmações devem ser vistas com cautela, uma vez que relato de manutenção da supressão após neutralização do TGF- β (PICCIRILLO et al., 2002) é indicativo de que a ação supressora das células Tregs ocorre independentemente desta citocina.

8.2 Comparação entre o desempenho dos antígenos CRA e FRA em induzir a resposta de linfócitos T regulatórios e produção de IL10

A comparação do potencial de estimulação antigênica dos antígenos específicos do *T. cruzi* é uma etapa crucial na identificação das melhores ferramentas para definição dos padrões imunológicos na doença de Chagas. Diante do diferencial constitutivo entre CRA e FRA, nosso grupo vem investigando suas propriedades imunogênicas de forma dissociada, com o objetivo de verificar seu real potencial na diferenciação das formas clínicas da doença de Chagas através da resposta imune do hospedeiro.

Em trabalhos anteriores, podemos observar que apenas FRA possibilitou a diferenciação das formas cardíaca e indeterminada pela produção de IgG2 específica (VERÇOSA et al., 2007). Por sua vez, apenas CRA permitiu constatar maior produção de TNF- α ⁺ e IFN- γ ⁺ por células T CD8 de indivíduos com a FC mais severa da doença e elevada frequência de IL10 em linfócitos T CD4 nos portadores da FI comparado aos indivíduos NI (LORENA et al., 2010). Ambos os antígenos

recombinantes permitiram a diferenciação entre portadores da FD e as demais formas crônicas da doença através da elevada produção de IgA anti-CRA e anti-FRA entre os pacientes com megacólon e/ou megaesôfago (VASCONCELOS et al., 2010).

No presente trabalho, observamos que tanto CRA quanto FRA estimularam de forma semelhante às populações de células T CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD4⁺CD25⁺IL10⁺, nos dois grupos de portadores da doença de Chagas estudados (FCS e FI). Contudo, apenas após a realização de um estudo de seguimento de portadores da FI é que poderemos confirmar se estes antígenos recombinantes são adequados para o acompanhamento clínico dos pacientes através dos padrões de resposta regulatória específica.

8.3 Avaliação da frequência de CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Em conjunto com a definição do perfil de linfócitos Tregs em cada grupo de indivíduos analisados, a determinação da frequência de CD25⁺, CD25⁺FoxP3^{high} e CD25⁺IL10⁺ entre os linfócitos CD4⁺ detectados em cada grupo foi realizada com o objetivo de confirmar a relação entre estas células e os quadros clínicos da doença de Chagas. Para isso, estabelecemos um *cut-off* através da média global da produção de células entre todos os indivíduos incluídos no estudo (FCS + FI + NI) (VITELLI-AVELLAR et al., 2008), o que permitiu a identificação da frequência destas moléculas em linfócitos T CD4⁺ nos grupos estudados.

A frequência de células T CD4⁺CD25⁺ apresentada entre a maioria (61% e 70% após estímulo com CRA e FRA, respectivamente) dos portadores da FI, em comparação com a FCS, observada neste trabalho, ratifica a hipótese de que estes linfócitos possam estar relacionados com a manutenção do quadro clínico assintomático da doença de Chagas crônica. Reforçando a possível importância destas células no controle da morbidade dos pacientes, mesmo não apresentando diferença estatística, as células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ também foram mais frequentes no grupo FI na presença *in vitro* de CRA (75%) e FRA (70%).

No entanto, observamos que a maioria dos indivíduos estudados, tanto portadores da FCS quanto da FI, é baixo produtor da citocina IL10 por linfócitos T CD4⁺CD25⁺. Acreditamos que a maioria dos indivíduos portadores da FI da doença, que apresentam concomitantemente as moléculas CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, possam também estar apresentando níveis elevados de produção da IL10, o que poderia diferenciá-los dos demais grupos estudados. Esta análise não pôde ser realizada, devido à impossibilidade de fazer a marcação quádrupla no mesmo tubo do experimento de citometria.

8.4 Correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺ após estímulo *in vitro* com CRA e FRA

Ao avaliar as correlações entre CD25, FoxP3 e IL10 em linfócitos T CD4⁺, procuramos identificar as possíveis correlações entre estes marcadores e as formas clínicas da doença de Chagas avaliadas no presente estudo. A correlação positiva observada entre IL10 e CD25 no grupo FI, após estímulo com FRA, demonstra que de fato esta citocina pode estar envolvida no mecanismo de imunorregulação desenvolvido pelos linfócitos T CD4⁺CD25⁺ nesses indivíduos.

Por sua vez, o fato de termos obtido correlações negativas entre FoxP3 e CD25 e entre FoxP3 e IL10, no grupo FI, levanta questionamento sobre a relação entre os linfócitos Tregs e o controle da patologia na doença de Chagas, como já mencionado em trabalhos anteriores (KOTNER; TARLETON, 2007; MARIANO et al., 2008; SALES-JUNIOR et al., 2008). Contudo, ressaltamos que nos dados obtidos em nosso estudo acerca do perfil de linfócitos T regulatórios, observamos maior produção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3^{high} entre portadores crônicos da FI da doença de Chagas, mesmo não conseguindo diferenciar estatisticamente tais dados. Desta forma, tais afirmações só poderão ser confirmadas após estudo complementar de acompanhamento dos pacientes avaliados para determinação do papel destes linfócitos no desenvolvimento dos quadros clínicos sintomáticos da doença de Chagas.

9 CONCLUSÕES

a) A população de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ produzida após estímulo *in vitro* de PBMC com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T.cruzi* foi capaz de diferenciar os portadores da FI e da FCS da doença de Chagas, sendo promissor marcador imunológico para o acompanhamento clínico dos pacientes na fase crônica da doença de Chagas;

b) Os linfócitos Tregs apresentaram resposta antigênica similar na presença tanto de CRA quanto de FRA, demonstrando que ambos os antígenos recombinantes são adequados para a detecção da resposta regulatória específica ao *T. cruzi*;

c) Portadores da FI da doença de Chagas demonstraram maior frequência de CD25 em linfócitos T CD4⁺ em relação os pacientes com a FCS, ratificando a relação destes linfócitos com a manutenção do quadro clínico assintomático;

d) Mesmo diante destes resultados, não verificamos diferença na produção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ entre os grupos, sendo necessários estudos mais detalhados para o entendimento do papel destas células na imunopatogênese da doença de Chagas e sua utilização como marcadores biológicos de evolução clínica dos portadores crônicos.

e) A correlação positiva entre CD25 e IL10 na FI da doença de Chagas sugere que a citocina IL10 produzida por linfócitos T CD4⁺ esteja envolvida no desenvolvimento da doença de Chagas humana.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-12 regulate innate response and acquired immunity to infection. Experimental Parasitology, New York, v. 84, p. 231-244, 1996.

ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. International immunology, Oxford, v. 18, p. 465-471, 2006.

ALBAREDA, M. C. et al. Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence. The Journal of immunology, Bethesda, v.183, p.4103-4108, 2009.

APOSTOLOU, I.; VON BOEHMER, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. The Journal of experimental medicine, New York, v. 199, n. 10, p. 1401-1408, 2004.

ARAUJO, F. F. et al. Potencial role of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Frontiers in Bioscience, New York, v.12, p. 2797-806, 2007.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 127-131, 1998.

BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. Clinical Immunology, Orlando, v. 111, n. 1, p. 137-145, 2004.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nature Immunology, London, v.6, p.353-360, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, supl. 3, p. 1-29, 2005.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. International Archives of Allergy and Immunology, Basel, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. Microbes and Infection, Paris, v.5, p. 419-427, 2003.

CARDOSO, G. M. et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. Frontiers in Bioscience, New York, v. 11, p. 1158-1163, 2006.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cell down-regulate costimulatory molecules on antigen- presenting cells. European journal of immunology, Weinheim, v.30, p.1538-1543, 2000.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, p. 253-255, 1999.

COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends in parasitology, Oxford, v. 18, p. 171-176, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, sup. 1, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery, A systemic review. Acta Tropica, Netherlands, v. 113, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

COUTINHO, M.; DIAS, J. C. P. A reason to celebrate: The saga of Brazilian chagologists. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 51, p. 394-410, 1999.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. et al. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. Journal of immunology, New York, v. 173, n. 12, p. 7259-7268, 2004.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas disease in Brazil. Parasitology today, Amsterdam, v.3, p.336-341, 1987.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.

DIAS, J. C. P. Chagas disease: successes and challenges. Cadernos de saúde pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, 2006.

DUTRA, O. D.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases, London, v. 21, p. 287-292, 2008.

DUTRA, W. O. et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. International immunology, Oxford, v. 6, n. 4, p. 499-506, 1994.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. Trends Parasitology, New York, v.21, p.581-587, 2005.

FEHÉRVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4⁺ Tregs and immune control. The Journal of Clinical Investigation, New Haven, v. 114, n. 9, p. 1209-1217, 2004.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A; RUDENSKY A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. Nature Immunology, London, v. 4, p. 330-336, 2003.

GADELHA, A. A. M. et al. Chagas' s Disease Diagnosticis: Comparative Analysis of Recombinant ELISA with Convencional ELISA and Hemagglutination Test. Vox Sanguinis, Oxford, v. 85, p. 165-170, 2003.

GOLDENBERG, S. et al. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. Memórias do Instituto Butantan, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 71-76, 1991.

GOMES, Y. M. et al. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, 2001.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infection and Immunity, Bethesda, v. 71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

GONTIJO, E. D. et al. Triagem Neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 18, p. 243-254, 2009.

HUDSON, T. H.; GRILLO, F. G. Brefeldin-A Enhancement of Ricin A-chain Immunotoxins and Blockade of Intact Ricin, Modeccin, and Abri. The Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 266, n. 28, p. 18586-18592, 1991.

HUNTER, C. A. et al. IL-10 Is Required to Prevent Immune Hyperactivity During Infection with *Trypanosoma cruzi*. The Journal of immunology, Bethesda, v. 158, p. 3311-3316, 1997.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity; lessons for and beyond Chagas disease. Expert reviews in molecular medicine, Cambridge, v.12, p. 1-22, 2010.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Have a Limited Role in the Control of *Trypanosoma cruzi* in Mice. Infection and Immunity, Bethesda, p. 861-869, 2007.

KRIGGER, M. A. et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 46, n. 4, p. 427-434, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFAILLE, J. J. et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Molecular and Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, 1989.

LORCA, M. et al. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, 1992.

LORENA, V. M. B. et al. Cellular Immune Response from Chagasic Patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Clinical Laboratory Analysis, New York, v. 22, p. 91-98, 2008.

LORENA, V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. Scandinavian Journal of Immunology, Oxford, v.72, n.6, p.529-539, 2010.

MACEDO, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 1-12, 2004.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes and Infection, Paris, v. 10, p. 825-833, 2008.

MELO, A. S. et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 69-73, 2009.

MENEZES, C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clinical & Experimental Immunology, London, v. 137, n. 1, p. 129-138, 2004.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analytical Biochemistry, New York, v. 117, n.2, p. 307-310, 1981.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by cell surface-bound transforming growth factor β . The Journal of experimental medicine, New York, v.194, p.629-644, 2001.

OLIVEIRA FILHO, A. M. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, p. 425- 428, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series, Geneva, v. 905, p. 109, 2002.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003.

PEREIRA, V. R. A. et al. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. Parasitology, London, v. 129, n. 5, p. 563-570, 2004.

PEREIRA, V. R. A. et al. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology Research, Berlin, v. 96, n. 3, p. 154-161, 2005.

PINTO, A. Y. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 41, p. 602-614, 2008.

PICCIRILLO, C. A. et al. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor Function in the Absence of Transforming Growth Factor β 1 Production and Responsiveness. The Journal of experimental medicine, New York, v. 196, p. 237-245, 2002.

POWRIE, F. et al. A Critical Role for Transforming Growth Factor- β but Not Interleukin 4 in the Suppression of T Helper Type 1-mediated Colitis by CD45RBlow CD4 + T Cells. The Journal of experimental medicine, New York, v. 183, p. 2669-2674, 1996.

RASSI, A. et al. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. International Society of Blood Transfusion, São Paulo, v. 6, p. 81-101, 1992.

RASSI J. R. A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. Lancet, London, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN γ induces macrophage activation and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *T. cruzi* infection. The Journal of Immunology, Bethesda, v. 140, p. 4342-4347, 1988.

SAKAGUCHI, S. et al. 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. Journal of Immunology, New York, v.155, p.1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annual review of immunology, Palo Alto, v. 22, p.531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and Immune Tolerance. The Cell, New York, v.133, n.5, p.775-787, 2008.

SALES-JUNIOR, P. A. et al. The regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes and Infection, Paris, v. 10, p. 680-688, 2008.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, supl. 1, p. 75-85, 2007.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. Souther cone initiative against Chagas disease. Advances in parasitology, London, v. 42, p. 1-27, 1999.

SILVEIRA, A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3⁺ cells in chagasic patients with and without megacolon. Human immunology, New York, v. 70, p. 65-67, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and Interferon γ Regulation of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. The Journal of experimental medicine, New York, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, E. D. et al. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. Journal of Clinical Laboratory Analysis, New York, v. 16, p. 132-136, 2002.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 6, n. 1, p. 25-32, 2008.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nature, London, v. 9, p. 239-244, 2008.

VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. American Journal of Pathology, Rockville Pike, v.156, p.1805-1809, 2000.

VALENTE, S. A. S. et al. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 395-398, 1999.

VASCONCELOS, R. H. T. et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. Human Immunology, New York, 71:964–967, 2010.

VERÇOSA, A. F. A. et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis, New York, v. 21, p. 271-276, 2007.

VITELLI-AVELAR, D. M. 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. Scandinavian Journal of Immunology, Oxford, v.62, p.297-308, 2005.

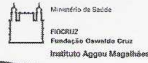
VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?. Clinical and experimental immunology, Oxford, v.145, p.81–92, 2006.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. Scandinavian Journal of Immunology, Oxford, v. 68, p. 516-525, 2008.

WALKER, M. R. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. The Journal of clinical investigation, New Haven, v. 112, n. 9, p.1437-1443, 2003.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: of mice and men. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v.24, p.209–226, 2006.

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

Título de projeto: Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, _____, RG _____, residente na _____, bairro _____, município _____, estado _____, usuário do telefone () _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar células da imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado que como portador da doença de Chagas terei três colheres de chá de meu sangue (15ml) coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha roxa (hematoma). Fui informado que a parte líquida do meu sangue (soro) será separada e guardada a -20°C no freezer do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM para depois ser avaliada quanto à dosagem de citocinas (uma substância envolvida no sistema de defesa contra doenças), e que meu sangue será avaliado quanto à produção destas citocinas e de uma substância presente dentro das células, quando em contato com as substâncias presentes no parasita. Fui informado ainda que se tais substâncias funcionarem como produtores de um padrão de citocinas será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que tanto meu soro quanto meu sangue serão utilizados apenas neste estudo, sendo sua utilização posterior dependente de uma nova autorização minha e que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão, que não terei comprometimento de meu tratamento e acompanhamento médico e que não receberei dinheiro para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Assinatura do Paciente

Data: __/__/__

Testemunha

Data: __/__/__

Assinatura do responsável pelo projeto

Data: __/__/__

Responsável pelo projeto:
Suellen Carvalho de Moura Braz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566

Médica responsável:
Dra Maria da Glória de Melo
Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz
Telefone para contato: 9976-5398

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O VOLUNTÁRIO CONTROLE

Título de projeto: Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, _____, RG _____, residente na _____, bairro _____, município _____, estado _____, usuário do telefone () _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar células da imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado que terei três colheres de chá de meu sangue (15ml) coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha roxa (hematoma). Fui informado que a parte líquida do meu sangue (soro) será separada e guardada a -20°C no freezer do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM para depois ser avaliada quanto à dosagem de citocinas (uma substância envolvida no sistema de defesa contra doenças), e que meu sangue será avaliado quanto à produção destas citocinas e de uma substância presente dentro das células, quando em contato com as substâncias presentes no parasita. Fui informado ainda que se tais substâncias funcionarem como produtores de um padrão de citocinas será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que tanto meu soro quanto meu sangue serão utilizados apenas neste estudo, sendo sua utilização posterior dependente de uma nova autorização minha e que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei dinheiro para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Assinatura do voluntário controle

Data: __/__/__

Testemunha

Data: __/__/__

Assinatura do responsável pelo projeto

Data: __/__/__

Responsável pelo projeto:

Suellen Carvalho de Moura Braz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566

Médica responsável:

Dra Maria da Glória de Melo
Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz
Telefone para contato: 9976-5398

Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/FiocruzComitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação das células T regulatórias CD4+CD25+FOXP3 nas formas clínicas da Doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanossoma cruzi*.

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 19/11/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 157/08

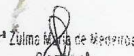
Registro no CAAE: 0155.0.095.000-08

PARECER Nº 13/2009

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 02 de abril de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 02 de abril de 2009.


Dr. Zulma de Medeiros
Biotecnóloga
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 02/04/2010.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br


Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde