Beatriz Villas Bôas

Análise fenotípico-funcional das células TCD4⁺FoxP3⁺
(Treguladoras) na fase aguda da infecção murina pelo
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Beatriz Villas Bôas

Análise fenotípico-funcional das células TCD4⁺FoxP3⁺
(Treguladoras) na fase aguda da infecção murina pelo
Trypanosoma cruzi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Villas Bôas, Beatriz.

Análise fenotípico funcional das células TCD4⁺FoxP3⁺ (T reguladoras) na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* / Beatriz Villas Bôas. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia na doença de Chagas.

Versão do título para o Inglês: Phenotypic and functional analysis of TCD4⁺FoxP3⁺ regulatory cells (T regulatory) in the early phase of murine infection with *Trypanosoma cruzi*.

1. Doença de Chagas 2. Células T reguladoras 3. *Trypanosoma cruzi* 4. Regulação 5. Fase aguda 6. Células TCD4⁺FoxP3⁺ I. Mosig, Prof. Dr. José Maria Alvarez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB049/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Beatriz Villas Bôas.

Título da Dissertação: Análise fenotípico funcional das células TCD4⁺FoxP3⁺ (T reguladoras) na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (88) (011) 3091.7733 - e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **140** nas fls. **94** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Maria Álvares Mosig**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi clone Sylvio X10/4: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e na patologia cardíaca crônica** do qual participam o(s) alunos **André L. Bombeiro, Christian E. Jorquera-Rosas, Giovana Giacomini, Rafael Moyses Salgado**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **23.11.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2416 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

SOLICITAÇÃO PARA INCLUSÃO DE ALUNO EM PROTOCOLO APROVADO - CEEA

Ilmo Sr.

Prof. Dr. Wolthar Tavares de Lima

DD. Coordenador da Comissão de Ética no Uso Animal

ICB/USP

Protocolo 140/10
MP. 23/11/10

Prezado(a) Senhor(a)

Solicito as medidas necessárias à Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP para que seja incluído o aluno "Beatriz Villas Bôas" ao protocolo de experimentação animal nº140 referente ao projeto intitulado "A INFECÇÃO MURINA PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* CLONE SYLVIO X10/4: MECANISMOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE DO PARASITA E NA PATOLOGIA CARDÍACA CRÔNICA" aprovado em 23/11/2010, sob minha responsabilidade. Declaro que não houve alteração de metodologia experimental nem das técnicas descritas inicialmente quando da aprovação do referido protocolo de experimentação animal. Estamos cientes e de acordo com as regras adotadas pela CEEA. Consultamos os "links" indicados no protocolo e comprometemo-nos a proceder conforme as informações aqui fornecidas. Estamos cientes de que as regras adotadas pela CEEA estão de acordo com a legislação nacional e internacional vigente.

São Paulo, 10/12/2010

Beatriz Villas Bôas

Assinatura do aluno:

Prof. Dr.
Coordenador da linha de Pesquisa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela constante presença em minha trajetória, agradeço pelas vitórias conquistadas e por me transmitir calma, compreensão e força nos momentos difíceis, essenciais para meu crescimento e importantes para a conclusão de mais uma etapa.

Agradeço a minha família por todo o suporte e apoio incondicional em todos esses anos.

Agradeço ao Prof. José Maria Alvarez Mosig pela confiança depositada em mim, pela paciência nesses dois anos de trabalho e pela grande orientação durante o processo de execução, análise e conclusão desse trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório Christian, Giovana, Isabelle, Rafael, Raissa, Alexandra, Eduardo, Érika, Fernanda, Flávia, Genóilson, Henrique, Maria, Sheyla, Daniela, Luana, Michelle, e aos colegas do Departamento de Parasitologia Aramys, Keitty, Jamile, Leandro, Renato e Rodrigo. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, e, sobretudo, muito obrigada pela amizade de todos!

Aos técnicos Rogério, Mariana, Jéssica e Aurea por todo o apoio.

Agradeço a professora Maria Regina D'Império Lima pela contribuição neste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do departamento de Imunologia pelo apoio institucional.

Agradeço também, a todos os professores que fizeram parte da minha formação, pois todos tiveram uma pequena contribuição nessa caminhada. Agradeço aos professores presentes, à minha banca de qualificação: Sandro de Almeida, Alexandre Keller e Jean-Pierre pelas sugestões essenciais na complementação ao meu trabalho.

Finalmente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos aqueles de alguma forma, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos vocês muito obrigada!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), projeto número 2010/04564-8, do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão, uma gota d’água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Villas-Bôas B. Análise fenotípico-funcional das células TCD4⁺FoxP3⁺ (T_{reg} reguladoras) na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Recentemente, no nosso laboratório foi observado que na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) o número de células T reguladoras (T_{REG}) no baço sofre aumento muito discreto, e que o tratamento destes animais com monoclonal anti-CD25 (PC61), para remover as células T_{REG}, resulta em curvas de parasitemia e patologia, não diferentes daquelas observadas nos animais tratados com monoclonal irrelevante. Estes resultados, apesar de não serem conclusivos, sugerem que as células T_{REG} não operam no controle da resposta ao *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção. No presente trabalho, utilizando camundongos C57BL/6 e camundongos FoxP3GFPKI, estudamos as mudanças quantitativas e qualitativas na população de células T_{REG} no decurso da fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e verificamos se a atividade supressora destas células é mantida. Foram realizados estudos cinéticos do baço de animais C57BL/6 e FoxP3GFPKI infectados por parasitas do clone Sylvio X10/4 e animais controles, estimando o peso, número total de células, número e frequência de células CD4⁺FoxP3⁻ e CD4⁺FoxP3⁺, assim como a expressão de alguns marcadores tidos como parte do perfil molecular das células T_{REG}. Aumentos no peso e celularidade do baço, assim como no número de células CD4⁺ totais e CD4⁺FoxP3⁻ foram observados, com pico no 11º dia de infecção. No decorrer do período analisado não foram detectadas, entretanto, grandes alterações no número de células CD4⁺FoxP3⁺, o que traduziu-se em uma diminuição na frequência dessa população em relação ao total de CD4⁺. Ao analisarmos, através de PCR - real time, se a queda na frequência das células T_{REG} esplênicas do animal infectado estaria relacionada à sua migração a possíveis órgãos alvos da infecção, não observamos diferença na transcrição do gene FoxP3 nos órgãos avaliados de animais infectados e controles. Um pequeno aumento na frequência de blastos foi observado nas células CD4⁺FoxP3⁺, contudo muito inferior daquele observado na população CD4⁺FoxP3⁻. Em relação à expressão (MFI) de marcadores, foi observado nas células CD4⁺FoxP3⁺ dos animais infectados aumentos na expressão das moléculas FoxP3, Fas, Fas-L, ICOS, GITR, CD25 e CD69, não se observando mudanças na expressão das moléculas CD127, OX40 e CTLA-4. Já com relação às células CD4⁺FoxP3⁻, observamos aumento da expressão de Fas, ICOS, OX40, GITR, CTLA-4 e CD25, mas não constatamos alterações das moléculas CD127 e Fas-L. Vimos que há uma co-expressão dos marcadores Fas, ICOS e CD69 que apresentaram uma maior expressão em uma subpopulação. Estudos funcionais realizados *ex vivo* com populações purificadas por citometria de fluxo, mostraram que no dia 7º p.i. a atividade supressora das células T_{REG} é mantida, com ação supressora equivalente à das T_{REG} purificadas de animais controle não infectados. Além disso, os níveis de INF- γ produzidos pelas células respondedoras na presença de T_{REG} do dia 7 p.i., acompanham os observados na presença de T_{REGs} de animais controle.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Células T reguladoras. *Trypanosoma cruzi*. Regulação. Fase Aguda. Células TCD4⁺FoxP3⁺.

ABSTRACT

Villas-Bôas B. Phenotypic and functional analysis of TCD4⁺FoxP3⁺ regulatory cells (T_{REG}) in the early phase of murine infection with *Trypanosoma cruzi*. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Recently, it was observed in our laboratory that during the acute phase of murine infection with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) the number of T regulatory cells (T_{REG}) suffers very discrete increases in the spleen, and that treatment of these animals with anti-CD25 monoclonal antibody (PC61) to remove T_{REG} cells results in curves of parasitaemia and pathology not different from those observed in animals treated with irrelevant monoclonal. These results, although not conclusive, suggest that T_{REG} cells do not operate in the control of the immune response to *T. cruzi* during the acute phase of infection. In this study, using C57BL/6 and FoxP3GFPKI mice we studied the quantitative and qualitative changes in the population of spleen T_{REG}s during the acute phase of infection with *T. cruzi* and verified if the suppressive activity of these cells is maintained. Kinetic studies were conducted of the spleen of mice infected with *T. cruzi* clone Sylvio X10/4 parasites and control mice, estimating the weight, total cell number, number and frequency of CD4⁺FoxP3⁻ cells and CD4⁺FoxP3⁺ cells, as well as expression of some markers considered as part of the molecular profile of T_{REG} cells. Increases in spleen weight and cellularity, as well as in the number of CD4⁺ cells and CD4⁺FoxP3⁻ cells were observed, with peak at 11 day of infection. However, during the period analyzed, no major changes were detected in the number of CD4⁺FoxP3⁺ cells, which resulted in a decrease in the frequency of this population in relation to total CD4⁺ cells. When the transcription of the FoxP3 gene in potentially infected organs was analyzed by real time PCR, we found no differences between infected mice and controls, indicating that the drop in the frequency of CD4⁺FoxP3⁺ cells at the spleen was not the result of an increased migration of T_{REG}s to different tissues. A small increase in the frequency of blasts was observed among CD4⁺FoxP3⁺ spleen cells, but of much lower magnitude than that observed in CD4⁺FoxP3⁻ cells. Regarding marker expression (MFI) in CD4⁺FoxP3⁺ cells of infected mice we observed increased expression of FoxP3, Fas, Fas-L, ICOS, GITR, CD25 and CD69 molecules, but no significant changes in the expression of CD127, OX40 and CTLA-4. With respect to CD4⁺ FoxP3⁻ cells, we observed increased expression of Fas, ICOS, OX40, GITR, CTLA-4 and CD25, but no changes in CD127 and Fas-L. We have seen that there is a co-expression of markers Fas, CD69 and ICOS that had a higher expression in a subpopulation. Functional studies performed *ex vivo* with sorted populations showed that on day 7 pi the suppressive activity of T_{REG} cells is maintained at equivalent levels to those of T_{REG}s from uninfected control mice. Besides, the levels of INF- γ produced by responder cells in the presence of day 7 T_{REG}s were similar to those observed in the presence of control T_{REG}s.

Keywords: Chagas disease. Regulatory T cells. *Trypanosoma cruzi*. Regulation. Acute phase. TCD4⁺FoxP3⁺ cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número total de células e peso do baço	36
Figura 2 - Determinação das populações celulares estudadas	37
Figura 3 - Número total de células CD4 ⁺ e células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ esplênicas.....	38
Figura 4 - Frequência de células CD4 ⁺ (em relação ao total de esplenócitos) e células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ (em relação ao total de células CD4 ⁺)	39
Figura 5 - Frequência de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas (em relação ao total de células CD4 ⁺)	40
Figura 6 - Frequência de blastos nas populações de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	41
Figura 7 - Expressão de FoxP3 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ esplênicas	42
Figura 8 - Expressão (MFI) e histogramas de CD127 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	43
Figura 9 - Expressão (MFI) e histogramas de Fas nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	45
Figura 10 - Frequência de células Fas ^{HIGH} na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	46
Figura 11 - Expressão (MFI) e histogramas de FasL nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	47
Figura 12 - Expressão (MFI) e histogramas de ICOS nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	49
Figura 13 - Frequência de células ICOS ^{HIGH} nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	50
Figura 14 - Expressão (MFI) e histogramas de OX40 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	52
Figura 15 - Expressão (MFI) e histogramas de GITR nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	53
Figura 16 - Frequência de células GITR ^{HIGH} nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	54
Figura 17 - Expressão (MFI) e histogramas de CTLA-4 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	56
Figura 18 - Frequência de células CTLA-4 ^{HIGH} nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	57
Figura 19 - Expressão (MFI) e histogramas de CD25 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	58
Figura 20 - Expressão (MFI) e histogramas de CD69 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas.....	60

Figura 21 – Histograma representativo referente ao 7º dia de infecção para expressão de CD69 na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	61
Figura 22 - Frequência de células CD69 ^{HIGH} nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	62
Figura 23 - Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	63
Figura 24 - Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	63
Figura 25 - Determinação das populações celulares estudadas	64
Figura 26 - Análise da proliferação de diferentes proporções de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas <i>naive</i> , na presença de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ esplênicas <i>naive</i> e com 7 dias de infecção.	65
Figura 27 - Análise da produção de INF- γ através de sobrenadante de cultura por ELISA utilizando diferentes proporções de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas <i>naive</i> adicionadas a células T _{REG} esplênicas <i>naive</i> e com 7 dias de infecção.....	68
Figura 28 - Análise da proliferação de diferentes proporções de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas com 7 dias de infecção, na presença de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ esplênicas <i>naive</i> e com 7 dias de infecção	69
Figura 29 - Análise da produção de INF- γ através de sobrenadante de cultura por ELISA utilizando diferentes proporções de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ esplênicas com 7 dias de infecção, adicionadas a células T _{REG} <i>naive</i> e com 7 dias de infecção.....	72
Figura 30 - Análise por PCR da presença de células FoxP3 ⁺ em diferentes órgãos	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti: (usado para anticorpos)

APC: do inglês, *Antigen Presenting Cell* (Célula apresentadora de antígeno)

CD: Grupos de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

cDNA: do inglês *complementary Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico complementar)

CTLA-4: do inglês cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

eGFP; (“enhanced green fluorescence protein”)

ELISA: Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*)

FACS: Ensaio de citometria de fluxo (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*)

GITR: do inglês glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor

ICOS: do inglês Inducible T-cell Co-stimulator

IDO: do inglês indoleamine-2,3-desoxygenase

IFN- γ : do inglês *Interferon-gamma*

IL: Interleucina

IPEX: do inglês immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome

iTreg: do inglês induced regulatory T cell

i.v.: via intravenosa

LLCMK2: do inglês *Rhesus Monkey Kidney Cell Line*

LPS: lipopolisacarídeo

MFI: do inglês Mean fluorescence intensity

nTreg: do inglês naturally occurring regulatory T cell

OX40: (TNFRSF4) tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4

PBS: do inglês *Phosphate Buffered Saline* (Salina tamponada com fosfato)

p.i.: pós infecção

qRT-PCR: do inglês *Real-time reverse transcription polymerase chain reaction* (Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real)

RNA: do inglês *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RPMI: Meio McCoy de cultura modificado

SFB: Soro fetal Bovino

T cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TGF-β: do inglês transforming growth factor beta

Th3: do inglês T helper 3

Th: Célula T helper

TLR: do inglês *Toll-like Receptor* (Receptor do tipo Toll)

TNF: Fator de Necrose Tumoral

T_{reg}: células T reguladoras

Tr1: do inglês T-regulatory type I

WHO: do inglês *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

WT: do inglês Wild Type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença de Chagas	18
1.2 A ativação policlonal e a resposta imune específica ao <i>T. cruzi</i>	19
1.3 As Células T reguladoras	20
1.4 Células Treguladoras na infecção por microorganismos	25
1.4.1 <i>T reguladoras na infecção pelo T cruzi</i>	26
2 OBJEITOVS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Camundongos e parasitas utilizados	30
3.2 Obtenção de leucócitos do baço	30
3.3 Análise de populações por citometria de fluxo	30
3.4 Estudo cinético das células Foxp3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ no baço	31
3.5 Estudo da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas	31
3.6 Ensaio de proliferação	32
3.7 Ensaios de Supressão	32
3.8 Produção de INF- γ no sobrenadante de cultura	33
3.9 PCR em tempo real	34
3.10 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Cinética do peso e nº total de células do baço nas primeiras semanas de infecção	36
4.2 Metodologia para avaliação das populações celulares	36
4.3 Análise do número de células CD4 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ no baço de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4 e controles	37
4.4 Frequência de células CD4 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	38
4.5 Frequência de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	39
4.6 Frequência de blastos nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	40
4.7 Expressão (MFI, “Mean fluorescence intensity”) de diferentes marcadores nas células T _{REG} e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	41
4.7.1 Expressão (MFI) de FoxP3 nas células T _{REG}	41
4.7.2 Expressão (MFI) de CD127 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	42
4.7.3 Expressão (MFI) de Fas nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	44

4.7.3.1 Frequência de células Fas ^{HIGH} na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	46
4.7.4 Expressão (MFI) de Fas-L nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	46
4.7.5 Expressão (MFI) de ICOS nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	48
4.7.5.1 Frequência de células ICOS ^{HIGH} na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	50
4.7.6 Expressão (MFI) de OX40 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	50
4.7.7 Expressão (MFI) de GITR nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	53
4.7.7.1 Frequência de células GITR ^{HIGH} na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	54
4.7.8 Expressão (MFI) de CTLA-4 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	54
4.7.8.1 Frequência de células CTLA-4 ^{HIGH} na população CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	57
4.7.9 Expressão (MFI) de CD25 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	57
4.7.10 Expressão (MFI) de CD69 nas células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁻	59
4.7.10.1 Frequência de células CD69 ^{HIGH} nas populações CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	61
4.8 Co-expressão de ICOS, CD69 e Fas	62
4.9 Análise da atividade reguladora de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	63
4.9.1 Ensaios de supressão	63
4.9.1.1 Determinação das populações analisadas	64
4.9.1.2 Regulação da proliferação de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ de animais naive por T _{REG} de animais naive e com 7 dias de infecção	65
4.9.1.3 Análise da produção de INF- γ no sobrenadante de culturas de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ de animal naive estimuladas com anti-CD3 na presença de células T _{REG} de animal naive e infectado por 7 dias.....	67
4.9.1.4 Regulação da proliferação de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ de animais infectados por células T _{REG} de animais naive e com 7 dias de infecção	68
4.9.1.5 Análise da produção de INF- γ no sobrenadante de cultura de células CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ de animal infectado com células T _{REG} de animal naive e infectado	70
4.10 Análise da presença de células FoxP3 ⁺ em órgãos através de PCR	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário intracelular, é o agente etiológico da doença de Chagas, uma moléstia que afeta por volta de oito milhões de pessoas na América Latina (World Health Organization, 2012) e resulta em 14.000 mortes a cada ano (Hotez et al., 2009). Esse parasita é capaz de infectar diversas espécies de diferentes ordens, e entre eles, o ser humano. Na forma principal de infecção do hospedeiro mamífero, o parasita é transmitido por um hemíptero da família *Reduviidae*, que carrega o parasita no intestino posterior. Ao sugar o sangue, o inseto defeca na pele, e o protozoário contido nas fezes na forma tripomastigota metacíclica entra no hospedeiro. No hospedeiro, a forma tripomastigota coloniza células próximas à porta de entrada se transformando em amastigota que se multiplica intracelularmente. Ao romperem as células infectadas, o parasita, transformado novamente em tripomastigota, atinge a corrente sanguínea disseminando pelo organismo e invadindo diferentes células. O inseto vetor é infectado ao alimentar-se do sangue de um mamífero infectado. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas transformam-se em formas replicativas, epimastigotas e esferomastigotas, que proliferam e que, ao alcançar o reto do inseto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que completam o ciclo (Macedo et al., 2002)

Na infecção humana pelo *T. cruzi* há um período de incubação de até aproximadamente 2 meses, seguido de uma fase aguda curta, caracterizada pela presença abundante de parasitas na circulação sanguínea e vários tecidos. Esta fase aguda, que às vezes passa despercebida, é seguida por uma fase crônica longa, caracterizada por níveis baixos, subpatentes, de parasitemia. A fase crônica é caracterizada por ausência de sintomas (fase indeterminada), mas pode evoluir para doença clínica com envolvimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (Junqueira et al., 2010; Macedo et al., 2002).

O *T. cruzi* é um parasita dotado de ampla heterogeneidade. Sylvio X10/4 é um clone de *T. cruzi* de baixa virulência, pertencente ao grupo filogenético tipo I, que foi clonado a partir de um isolado obtido de um triatomíneo usado para xenodiagnóstico

em um paciente chagásico do estado do Pará, Brasil (Silveira et al., 1979). Este clone reproduz em modelos animais uma fase aguda assintomática da doença, sem parasitemia patente, e na linhagem de camundongos C3H/HePAS induz lesões cardíacas crônicas reproduzindo a patologia desenvolvida na Doença de Chagas humana (Marinho et al., 2007). Desta forma, o modelo murino de infecção por Sylvio X10/4 permite a avaliação dos elementos envolvidos na interação com o hospedeiro mamífero, assim como estudar o processo patológico cardíaco relacionado à doença humana.

1.2 A ativação policlonal e a resposta imune específica ao *T. cruzi*

Nas primeiras semanas da infecção de camundongos pelo *T. cruzi* observa-se no baço uma ativação policlonal do sistema imune com proliferação massiva de células B e T, que inclui um grande número de células sem especificidade ao parasita (D'Império Lima et al., 1985). Desconhecem-se no momento quais são os sinais que determinam tal ativação, que acontece não somente na infecção pelo *T. cruzi*, mas também em outras infecções por protozoários, vírus e bactérias. Nos esforços por desvendar a causa de tal processo, que difere da ativação clássica induzida na imunização por um antígeno, tem sido procurados elementos mitogênicos que, analogamente ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas, exibam a capacidade de ativar um grande número de clones linfocitários independente da especificidade destes. No caso específico da infecção pelo *T. cruzi*, Minóprio (2001) isolou a molécula prolina racemase, presente no parasita capaz de ativar *in vitro* um grande número de linfócitos B (Minóprio, 2001). Contudo, pouco progresso tem acontecido nesta área e a causa da ativação policlonal persiste como incógnita ainda não resolvida.

Simultaneamente a ativação policlonal linfocitária, e em forma incipiente, mas progressiva, acontece, no camundongo infectado, o desenvolvimento da resposta imune específica, onde clones de linfócitos T e B com especificidade pelos constituintes do parasita são ativados e expandidos. Esta resposta específica permite gerar uma resposta efetora que resulta no controle, mesmo que não estéril, do protozoário.

Com relação à ativação policlonal, no pico desta expansão linfocitária maciça, os animais infectados exibem respostas diminuídas à imunização com antígenos

não relacionados (Abrahamsohn et al., 1995; Cunningham et al., 1978; Hayes et al., 1981; Reed et al., 1977; Teixeira et al., 1978), estado de imunossupressão que tem sido atribuído a diferentes mecanismos. Acredita-se que, em grande parte, este estado seja decorrente da ação dos macrófagos ativados, que através da produção de prostaglandinas, óxido nítrico e/ou IL-10 (Abrahamsohn et al., 1995; Cerrone et al., 1991; Pinge-Filho et al., 1999) inibiriam a ativação/proliferação de linfócitos T. Outros estudos sugerem, entretanto, que as próprias células T também estariam envolvidas na ausência de resposta (Tarleton, 1988).

1.3 As células T reguladoras

Nos últimos 20 anos, uma grande ênfase tem sido dada a uma subpopulação de células T, as células T reguladoras (T_{REG}), ausentes em animais timectomizados no período neonatal (Sakaguchi et al., 1982), que têm a capacidade de controlar respostas excessivas ou prejudiciais a antígenos próprios ou patógenos. No ano de 1995, Sakaguchi e colaboradores identificaram a molécula CD25 (a cadeia α do receptor para IL-2 - IL-2R α) como marcador das células T_{REG} . Foi observado que a transferência para camundongos *nude* de células esplênicas, nas quais as células CD25⁺ tinham sido eliminadas, acarretava evidências sorológicas e histológicas de doença autoimune, a qual era prevenida pela co-transferência de um pequeno número de células TCD4⁺CD25⁺. Mais recentemente, demonstrou-se que, o fator de transcrição FoxP3 é necessário para o desenvolvimento e função de células T_{REG} , passando a ser um marcador exclusivo destas células (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003).

As populações de células T reguladoras são divididas em células T_{REG} naturais ou tímicas e células T_{REG} adaptativas geradas na periferia. As células T_{REG} naturais foram inicialmente descritas como uma população responsável pela prevenção da expansão de linfócitos auto-reativos e desenvolvimento da resposta auto-imune (Belkaid, 2008). Populações de células reguladoras que são geradas na periferia têm sido descritas em respostas imunes de diversas naturezas (Kingsley et al., 2002; Maloy et al., 2001; Nakamura et al., 2001). Em estudos *in vitro* foi observada a conversão de células T CD4⁺CD25⁺*naive* da periferia em células T reguladoras FoxP3⁺ através da ligação do receptor de células T (TCR) na presença

de TGF- β . Acredita-se hoje que a tolerância periférica seja ativamente sustentada por células T_{REG} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Sakaguchi, 2005), produzidas no timo como uma população funcionalmente madura, assim como também na periferia (Apostolou et al., 2002). As T_{REG} adaptativas atuam *in vivo* através de secreção de citocinas (Barrat et al., 2002; Chatenoud et al., 1997; Maloy et al., 2001) e, dependendo das citocinas que produzam, IL-10 ou TGF- β , têm sido classificadas como Tr1 (Groux et al., 1997; Jonuleit et al., 2000; Kemper et al., 2003) ou Th3 (Inobe et al., 1998; Weiner, 2001), respectivamente. Em um grande número de infecções, tais como malária murina, as Tr1 são as principais responsáveis pela produção de IL-10 (Vigario et al., 2007). Estas células reguladoras adaptativas possuem muitas das características das células T_{REG} naturais, mas podem diferir em marcadores de superfície celular e características funcionais (Bluestone et al., 2003).

Diversos marcadores são expressos diferencialmente nas células T_{REG} compondo o perfil molecular que foi denominado “T_{REG} signature”. O fator de transcrição FoxP3 é o marcador mais importante e o mais utilizado para identificar as células T reguladoras, mas em humanos, por ser intracelular, não pode ser usado para isolar células T_{REGs} para estudos funcionais. Com isso estudos foram feitos na tentativa de identificar marcadores extracelulares que poderiam ser utilizados para esse fim. Um exemplo é a subunidade alpha do receptor para IL-7 (CD127) que é expresso em células FoxP3⁺ em níveis reduzidos (Kondelková et al., 2010). O IL-7R (CD127) sofre uma diminuição na sua expressão em células T humanas após ativação, ocorrendo o aumento da expressão desse marcador em células T efectoras e de memória. Liu e colaboradores baseando-se em estudos prévios em que FoxP3 foi descrito como fator repressor da transcrição e com isso importante na regulação da transcrição de algumas moléculas (Schubert et al., 2001), avaliaram a relação entre FoxP3 e a transcrição de CD127. Através de ensaios moleculares constataram que FoxP3 interage com regiões do promotor de CD127 e ao utilizarem um bloqueador de FoxP3 viram um aumento da expressão de CD127 em células CD4⁺CD25^{hi}. Confirmando a relação entre células T_{REG} e a baixa expressão de CD127 mostraram que um subtipo de células TCD4⁺CD127^{lo/-} possui funções supressoras *in vitro* (Liu W et al., 2006).

Moléculas ligadas a apoptose têm sido descritas em células reguladoras, nas quais se acredita que exerçam papel semelhante ao descrito nas células respondedoras, onde participam no controle da expansão clonal e na homeostase

celular (Strauss et al., 2009). A apoptose mediada pela interação Fas (CD95)/FasL (CD95L ou CD178) é bem caracterizada em células T efetoras. A molécula Fas é altamente expressa em células T *naive*, mas nessa fase as células apresentam grande resistência à morte através desta molécula. No entanto, após ativação, as células T tornam-se sensíveis a apoptose mediada por Fas e aumentam a expressão de FasL quando reestimuladas através do TCR, tornando-se sensíveis ao fenômeno denominado AICD (morte celular induzida por ativação) (Fritzsching et al., 2005; Krammer et al., 2000; Schmitz et al., 2004; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Assim, marcadores como Fas (CD95) e FasL são associados a células T ativadas, indutores de morte celular através da ligação entre eles. Em camundongos, foi demonstrado que o tratamento das células T_{REG} com anti-CD95 torna-as resistentes a apoptose (Banz, et al., 2002; Chen, et al., 2004). Um trabalho recente mostrou que células T efetoras e células T_{REG} expressam Fas em sua superfície e aumentam a expressão de FasL após ativação (Strauss et al., 2009). No entanto, foi observado que na presença de altos níveis de IL-2 as células T_{REG} adquirem resistência a apoptose mediada por Fas, enquanto que na presença de baixos níveis desta citocina estas células tornam-se sensíveis à morte mediada por células TCD4⁺ efetoras. Estes resultados sugerem que ambas as populações são importantes para o controle da resposta imune, porém em períodos diferentes. Assim, no início da infecção, com os altos níveis de IL-2, as células T_{REG} são resistentes a apoptose e exercem sua atividade supressora mas, quando os níveis de IL-2 baixam, na fase de contração da resposta imune, as células T_{REG} se tornam sensíveis a apoptose mediada pelas células efetoras FasL⁺ (Strauss et al., 2009).

A ativação das células TCD4⁺ induz a expressão de moléculas co-estimulatórias, tais como ICOS. Em 1999, Hutloff e colaboradores relataram que, ao utilizar um anticorpo monoclonal bloqueador de ICOS, não era mais observada a resposta destas células à estimulação pelo TCR, sugerindo que ICOS funciona como molécula co-estimuladora. Outros trabalhos também descreveram ICOS como importante na interação entre a célula TCD4⁺ e a célula B, e a presença de células T ICOS⁺ nos centros germinativos dos órgãos linfoides, foi evidenciada pela sua positividade para CD57, um marcador desta estrutura. Mais ainda, a estimulação por ICOS determina um aumento da expressão de CD40L (CD154), molécula requerida para interação entre células T e B (Hutloff et al., 1999). Mais recentemente, foram descritas células T_{REG} com altos níveis de expressão de ICOS, presentes nos

centros germinativos e atuantes na interação T-B, que foram denominadas células T reguladoras foliculares ($CD4^+CXCR5^+FoxP3^+$) (Sage et al., 2012). Em 2003, Löhning e colaboradores caracterizaram células $ICOS^+$ *ex vivo* e observaram uma correlação entre a expressão deste marcador e os níveis de citocinas produzidos. Assim, células $CD4^+$ com baixa expressão de ICOS estariam ligadas à produção de IL-2, IL-3 e IL-6, citocinas produzidas nas fases iniciais da resposta imune, e células com níveis intermediários de ICOS estariam relacionadas com a produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, enquanto que altos níveis de ICOS relacionariam-se com a síntese de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Neste contexto, alguns tipos de T_{REG} mostraram ser dependentes da expressão de ICOS para supressão *in vitro* e *in vivo* através da produção de IL-10 (Marks et al., 2007).

O GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene), um membro da superfamília TNF (TNFRSF), tem papel importante na modulação da atividade supressora das T_{REG} , enquanto que nas células T efectoras essa molécula atua positivamente na proliferação e produção de citocinas (Nocentini et al., 2007). A atividade inibitória de GITR sobre a função das células T_{REG} foi descrita após observar que, o tratamento com anticorpo (agonista) frente à GITR cancelava a atividade supressora destas células. A expressão deste marcador não se limita, entretanto, às células T_{REG} , uma vez que células T *naive* mostram aumento na expressão após ativação (Shimizu et al., 2002). O ligante de GITR (GITRL) é expresso em células endoteliais, APC (do inglês, *Antigen Presenting Cell*), macrófagos e células B (Kim et al., 2010). Estímulos pró-inflamatórios são capazes de induzir a expressão do ligante de GITR nestas células (Nocentini et al., 2007), levantando a hipótese de que a medida que esta molécula é induzida no decurso de uma infecção a interação de GITR com seu ligante atenua a atividade supressora das células T_{REG} , favorecendo uma resposta efetiva contra patógenos (Shimizu et al., 2002).

Um segundo membro da superfamília TNF, o OX40, também é constitutivamente expresso em células T_{REG} de camundongos e transientemente expresso após estimulação antigênica em células $CD4^+FoxP3^-$. Nesta última população, a molécula OX40 desempenha um papel importante na expansão, função e sobrevivência celular (Ruby et al., 2009), enquanto que nas células T_{REG} parece estar relacionada com a perda da capacidade supressora, além de atuar sobre a conversão de células $CD4^+FoxP3^-$ em $CD4^+FoxP3^+$. Estudos foram

realizados para determinar se a estimulação das células T_{REG} naturais através de OX40 poderia alterar a função supressora destas células. Utilizando culturas com células $CD4^+FoxP3^-$, células T_{REG} e APCs $OX40L^+$, foi observado que a capacidade supressora das células T_{REG} era cancelada. No entanto, ao adicionar células T_{REG} procedentes de camundongos OX40-KO essa supressão era reestabelecida. Neste mesmo trabalho foi também observado que a indução da conversão de células $CD4^+FoxP3^-$ em células $CD4^+FoxP3^+$, dependente de $TGF-\beta$, era amplamente inibida em culturas contendo células APCs $OX40L^+$, mas restaurada quando essas células eram deficientes em OX40, indicando que a coestimulação através de OX40/OX40L além de inibir a capacidade supressora das células T_{REG} , é antagonista a conversão de células $CD4^+FoxP3^-$ em $CD4^+FoxP3^+$ (Vu et al., 2007). Além disso, foi observado que essa via é capaz de conferir resistência das células $CD4^+FoxP3^-$ a supressão (Shevach, 2009).

A molécula CTLA-4 é homóloga a CD28 e igualmente a esta interage com as moléculas coestimuladoras CD80/CD86 das APCs. No entanto, sua função é antagônica à de CD28, possuindo um importante papel na prevenção de doenças auto-imunes, que é claramente demonstrado pela morte de animais deficientes em CTLA-4 dentro de quatro semanas, devido a doença proliferativa (Verhagen et al., 2013; Waterhouse et al., 1995). Células T_{REG} expressam constitutivamente em sua superfície a molécula CTLA-4, que interage com os co-estimuladores CD80/CD86 das células APCs. Esta molécula é também superexpressa transientemente após ativação em células $CD4^+FoxP3^-$ e possui uma maior afinidade pelos co-estimuladores que a molécula CD28, havendo assim competição pela ligação. Nas células $CD4^+FoxP3^-$ a interação de CTLA-4 com os co-estimuladores inibe a progressão do ciclo celular e a produção de IL-2, de tal forma, que o seu bloqueio com anticorpos anti-CTLA-4 determina um aumento da função efetora, enquanto que o bloqueio de CTLA-4 nas células T_{REG} atua negativamente sobre sua função supressora (Kavanagh et al., 2008). Outros mecanismos de atuação descritos para CTLA-4 ao interagirem com seus receptores são o sequestro ou remoção dos ligantes co-estimulatórios da superfície de células APC e a produção da enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenase) que limita o triptofano disponível, suprimindo metabolicamente a ativação de células *T naive* (Barnes et al., 2013; Tai et al., 2012). Apesar do papel de CTLA-4 na regulação mediada pelas T_{REG} , estudos têm mostrado que existe um mecanismo de supressão mediado por células T_{REG} que

independe desta molécula e que atua através de CD25 (cadeia alfa do receptor para IL-2) privando as células T da citocina IL-2, importante para a proliferação celular (Tai et al., 2012). As células T_{REG} necessitam de IL-2 pra sua sobrevivência, pois essas células consomem a IL-2 produzida por células $CD4^{+}FoxP3^{-}$, mas não são capazes de produzir esta citocina tão essencial. Para avaliar o papel de IL-2 sobre a função das células reguladoras, estudos *in vitro* foram realizados nos quais as células $CD4^{+}FoxP3^{+}$ eram colocadas num ambiente contendo células $CD4^{+}FoxP3^{-}$, favorável à produção de IL-2, que resultava na supressão das células $CD4^{+}FoxP3^{-}$ pelas T_{REG} . No entanto, o mesmo resultado não foi obtido quando essas duas populações eram separadas através de uma membrana semipermeável, levantando a hipótese de que as T_{REG} necessitam da proximidade com as células produtoras de IL-2. O mesmo grupo mostrou que camundongos T_{REG} deficientes em CD25, possuíam uma menor capacidade supressora daqueles animais com níveis normais de CD25, o que pode estar relacionado à menor competição por IL-2 (Pandiyan et al., 2007).

1.4 Células T reguladoras na infecção por microorganismos

Apesar das células reguladoras terem como função central o controle da resposta imune ao próprio, ação demonstrada pelo desenvolvimento de autoimunidade grave nos pacientes com síndrome IPEX que exibem defeitos no gene FoxP3 (Bennet et al., 2001), foi mostrado em humanos e modelos experimentais que as células T_{REG} também podem exercer um papel moderador da resposta imune frente a microorganismos patogênicos (Corthay et al., 2009; Lanteri et al., 2009) ou comensais (Dembic, 2008). Assim, no modelo murino, Belkaid e colaboradores (2002) mostraram que células T_{REG} acumulam-se no local de infecção por *Leishmania major* suprimindo a capacidade efetora das células T na eliminação deste protozoário. A remoção dessas células aumentou a resposta imune, levando a uma completa erradicação do parasita no local da infecção. As células T_{REG} também suprimem a patologia resultante da resposta imune contra determinados microrganismos, ou seja, a ação efetora linfocitária causadora de lesão tecidual (Hori et al., 2002; Shimizu et al., 2002).

1.4.1 T reguladoras na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

O papel das células T_{REG} na infecção pelo *T. cruzi* já foi estudado por vários grupos de pesquisa (Kotner et al., 2007; Mariano et al., 2008; Sales et al., 2008), e a conclusão destes trabalhos foi que as células T_{REG} não parecem ter uma grande contribuição no controle da resposta imune ao parasita e da patologia. Mais recentemente, no nosso laboratório temos estudado as mudanças na população de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (T_{REG}) esplênicas no decorrer da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y e observamos um aumento muito discreto (de 1,6 vezes), notavelmente inferior ao aumento drástico das células TCD4⁺ efectoras (TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻) (Fernando Pretel, tese doutorado, 2009). Mais ainda, confirmando os resultados dos trabalhos acima citados (Kotner et al., 2007; Mariano et al., 2008; Sales et al., 2008), o tratamento *in vivo* com monoclonal anti-CD25 (PC61), nos dias -6, -4 e -2 relativos à data da infecção, não determinou diferenças significativas na curva parasitêmica ou na patologia da fase aguda em relação à dos animais tratados com monoclonal irrelevante. Assim, o conjunto dos trabalhos realizados até o momento sugere o não envolvimento funcional das células T_{REG} na fase aguda da infecção.

A aparente não participação das T_{REG} na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* poderia indicar que a resposta aguda ao parasita não é controlada pelas células T_{REG}. Entretanto, outra possível explicação seria que durante a fase aguda da infecção aconteça uma perda da capacidade supressora das T_{REG}. Pasare & Medzhitov (2003), mostraram que a atividade supressora das células T_{REG} é bloqueada por agonistas de TLR, que estimulam as células dendríticas a secretar IL-6 que pela sua vez torna as células T *naive* refratárias aos sinais das células T_{REG}. Liu H e colaboradores (2006) ampliaram estes resultados ao mostrar que a administração de um agonista de TLR2, além de tornar as células T resistentes à supressão pelas T_{REG}, determina uma perda transitória da atividade supressora das T_{REG} com diminuição da indução de mRNA para FoxP3. Uma vez que diferentes moléculas TLR (inclusive TLR2) participam na detecção do *T. cruzi* pelas células da imunidade inata (Bafica et al., 2006) e visto que, a citocina IL-6 é produzida em grandes quantidades no início da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Gao & Pereira, 2002), existe a possibilidade da atividade das células T_{REG} estar

temporariamente cancelada no começo desta infecção. Mas não é somente através de sinalização TLR que a atividade T_{REG} poderia ser regulada. Assim, Vu e colaboradores (2007) mostraram que a estimulação das células T_{REG} através de OX40 inibe intensamente a expressão do gene de FoxP3. Neste mesmo trabalho foi também observado que a co-estimulação das células efetoras via OX40 previne a indução de novas T_{REG} s a partir de células efetoras. Por outro lado, foi descrito que a estimulação das T_{REG} através da molécula GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene), outro membro da família TNF/TNFR como o OX40, cancela a atividade supressora destas células (Shimizu et al., 2002). No reverso da moeda, células T_{REG} são induzidas por IL-2 e TGF- β (Zheng, et al., 2008) em um processo que depende da sinalização através de CD28. A coestimulação B7/CD28 parece ser fundamental para a indução das células T_{REG} , não somente no que se refere às T_{REG} naturais que desenvolvem no timo, mas também para as T_{REG} induzidas na periferia (Liang et al., 2005). Além disto, ressaltando a complexidade do processo, foi mostrado que a ativação de células dendríticas por TLRs induz proliferação de células T_{REG} , num processo dependente de IL-1 e IL-6 (Kubo, 2004).

Desta forma fica claro que é diverso o conjunto de fatores e moléculas de superfície que poderiam estar implicados numa regulação positiva e negativa da atividade e número das T_{REG} no decurso da infecção aguda pelo *T. cruzi*.

Como citado acima experiências do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa mostraram que o tratamento com anti-CD25 no início da infecção pelo *T. cruzi* não determina grandes mudanças na evolução da infecção e quadro patológico de cardiomiopatia aguda. Estes resultados sugerem ora a não participação das T_{REG} no controle do *T. cruzi*, ora o cancelamento transitório da atividade supressora das T_{REG} em consequência das mudanças propiciadas pela infecção. Para resolver este dilema é necessário elucidar se as células T_{REG} mantêm sua atividade funcional na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, ou se estão inativadas. O esclarecimento desta questão é da maior importância, uma vez que caso seja demonstrada a perda de atividade funcional das células T_{REG} , a elucidação dos mecanismos que levam ao cancelamento funcional desta população poderia levar ao desenvolvimento de estratégias para interferir na atividade regulatória, não somente em processos infecciosos agudos, mas em outras patologias.

Assim, um estudo aprofundado das células T_{REG} na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* com avaliação fenotípico-funcional destas células torna-se necessário. Nos nossos estudos anteriores não foi possível avaliar a atividade reguladora uma vez que não é possível isolar as células T_{REG} com base na expressão de FoxP3, que é um marcador intracelular. Mais ainda, não há marcador de superfície que permita uma distinção qualitativa entre células T efectoras e reguladoras.

No presente projeto de mestrado, utilizando camundongos FoxP3⁺GFP⁺ (Betelli et al., 2006) camundongos nos quais o locus endógeno para FoxP3 está ligado à proteína repórter eGFP; (“enhancedgreenfluorescenceprotein”) e que, em consequência, expressam eGFP exclusivamente nas células FoxP3⁺, estudamos de forma mais precisa as mudanças fenotípicas na população T_{REG} no decurso da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* e avaliamos a atividade funcional destas células.

2 OBJETIVOS

Objetivo Principal: Estudar as eventuais mudanças fenotípicas e funcionais nas células T_{REG} na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar as mudanças no número de células T_{REG} esplênicas e da intensidade de expressão da molécula FoxP3 (GFP) nestas células no decurso da infecção aguda pelo *T. cruzi*.
2. Avaliar a cinética de expressão de diversas moléculas de superfície (CD127, Fas, Fas-L, GITR, OX40, CTLA-4, ICOS, CD25 e CD69) nas células TCD4⁺FoxP3(GFP)⁺ (T_{REG}) e TCD4⁺FoxP3⁻ (que deve incluir as células ativadas/efetoras e as células *naïve*) do baço de camundongos nas primeiras semanas da infecção).
3. Avaliar o papel regulador das células T_{REG} de animal no início da infecção, analisado pelo seu efeito sobre a proliferação e produção de IFN- γ de células TCD4⁺FoxP3⁻.
4. Avaliar a expressão de mRNA de FoxP3 em órgãos como fígado, pulmão, coração e músculo esquelético de animal normal e animal infectado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos e parasitas utilizados

Camundongos fêmeas FoxP3⁺GFP⁺ (Betelli et al., 2006) (em background C57BL/6) gentilmente cedidos pelo Dr. Vijay Kuchroo (Harvard Medical School, Boston, USA) e Dr. Alexandre Basso (UNIFESP, São Paulo) e camundongos fêmeas C57BL/6 do Biotério de animais isogênicos, Departamento de Imunologia, ICB-USP. Os animais foram infectados pela via intravenosa com 10⁵ tripomastigotas de cultura do clone de *T. cruzi* Sylvio X10/4 (Silveira et al., 1979). O clone Sylvio X10/4 foi mantido *in vitro* por passagens em células LLCMK2. Todos os procedimentos executados nos animais de experimentação foram realizados em conformidades às normas brasileiras para experimentação animal, os protocolos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP através do documento número 140.

3.2 Obtenção de leucócitos do baço

Os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e os leucócitos obtidos pela maceração dos baços em meio RPMI 3% SBF. Após isso, as hemácias foram lisadas, e os leucócitos centrifugados (1200 rpm, 4 °C por 5 minutos) e contados na câmara de Neubauer (Sigma-Aldrich, Inglaterra).

3.3 Análise de populações por citometria de fluxo

As células (1 x 10⁶) obtidas como descrito acima foram adicionadas a poços de fundo U em placas de 96 wells. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados diferentes combinações dos anticorpos conjugados a fluorocromos e incubados a 4 °C, ao abrigo da luz, por 30 minutos para marcação externa. Os anticorpos usados (à concentração de 0,2 mg/mL, diluição 1/100 µL) foram anti-CD4-Pacific blue, anti-CD25-APC, anti-GITR-PE-Cy7, anti-ICOS-PE, anti-CTLA-4-PE, anti-OX40-Biotina, anti-Fas-Biotina, anti-Fas-L-PE, anti-CD127-PE, anti-CD69-PerCP-Cy5.5 (BD-PharmingenTM, New Jersey, EUA). No caso da marcação

com anticorpos-biotinilados (concentração de 0,5 mg/mL), foi realizada uma segunda incubação com streptoavidina-APC. Para a marcação do fator de transcrição FoxP3 nos camundongos C57BL/6 não transgênicos, as células foram marcadas para as moléculas de superfície e após lavagem com tampão, incubadas em solução fixadora/permeabilizadora (Kit APC Anti-Mouse/Rat FoxP3 Staining Set da eBioscience, San Diego, EUA) por 2 horas, a 4 °C, ao abrigo da luz. Após lavagem das células com buffer 1x (do kit), as células foram incubadas com anticorpo anti-FoxP3 (do kit) por 2 horas a 4 °C. Após lavagem com buffer 1x por 2 vezes, as células foram ressuspensas em 0,4 mL de tampão e submetidas a citometria de fluxo no aparelho FACSCanto (Becton Dickinson, MountainView, USA). A análise dos dados foi realizada no *software* FlowJo (FlowCytometryAnalysis Software, Tree Star Inc) e os resultados expressos em figuras e gráficos.

3.4 Estudo cinético das células CD4+Foxp3⁺ e CD4+FoxP3⁻ no baço

Três estudos cinéticos foram realizados, um com animais C57BL/6 infectados e controles (aos 4, 7, 11, 14 e 18 dias, relativos ao momento de infecção) e os outros dois estudos com animais C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados e controles (aos 8, 13 e 19 dias, e aos 4, 7, 11, 14, 18 dias, relativos ao momento de infecção). O primeiro experimento foi realizado com animais C57BL6, em função da não disponibilidade de animais C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺.

3.5 Estudo da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas

Animais C57BL/6 controles e com 7 dias de infecção foram analisados com relação a co-expressão de moléculas ICOS, CD69 e Fas. Os animais foram sacrificados como já descrito anteriormente. As células (1×10^6) obtidas como descrito anteriormente, após lisagem das hemácias, foram contadas na câmara de Neubauer, adicionadas a poços de fundo U de placas com 96 wells. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram incubados a 4 °C por 30 minutos com diferentes anticorpos conjugados a fluorocromos para marcação externa. Os anticorpos usados (concentração 0,2 mg/mL e 0,5 mg/mL para anticorpos biotinilados, diluição 1/100 µL) foram anti-CD4, anti-ICOS-PE, anti-Fas-Biotina, anti-CD69-PerCP-Cy5.5 e Streptoavidina-APC (BD-Pharmingen™). Após lavagem por

centrifugação os esplenócitos foram submetidos à citometria de fluxo. A análise dos resultados foi feita no *software* FlowJo (FlowCytometryAnalysis Software, Tree Star Inc).

3.6 Ensaio de proliferação

Em ensaios preliminares de padronização, esplenócitos (8×10^6) obtidos em condição estéril, foram incubados com diferentes concentrações de “CellTracer” violeta (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) para estabelecer qual a melhor concentração para análise no citômetro FACS Canto. Foram utilizadas as concentrações 5 mM, 2 mM, 1 mM e 0,5 mM, de forma a escolher a mais adequada para os futuros experimentos de supressão da proliferação celular, escolhemos usar 2 mM. As células foram incubadas em uma solução contendo “CellTracer” diluído em PBS (solução pré aquecida a 37 °C) por 20 minutos em ambiente escuro. Após essa incubação, adicionou-se 5 volumes (em relação ao volume de PBS “CellTracer”) de meio de cultura completo (meio RPMI suplementado com 10% de SBF, glutamina 1%, 2-mercaptoetanol 0,1%, piruvato 1% e gentamicina 1%), incubando por 5 minutos. A seguir, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura completo pré-aquecido e incubadas por no mínimo 10 minutos antes do próximo passo. No ensaio de proliferação, 1×10^6 células diluídas em 200 µL de meio foram adicionadas em duplicata em placa de 96 poços, sem nenhum estímulo (controle negativo) ou adicionando anti-CD3 (na concentração de 2,5 µg/mL) como controle positivo. Após cultura de 72 h, os esplenócitos foram lavados em “staining buffer” e incubados com anti-CD4-APC por 30 min, a 4 °C. Após lavagem por centrifugação os esplenócitos foram submetidos à citometria de fluxo. A análise dos resultados foi feita em programa FlowJo (FlowCutometryAnalysis Software).

3.7 Ensaios de Supressão

A atividade reguladora da população T_{REG} isoladas a partir de esplenócitos de camundongos controle ou camundongos com infecção aguda foi avaliada na sua capacidade de inibir a proliferação, por anti-CD3, de células TCD3⁺FoxP3(GFP)⁻

esplênicas de camundongo normal ou infectado, e pela sua influência sobre a produção de IFN- γ por estas mesmas populações celulares.

Isolamento das células TCD4⁺FoxP3⁻ e TCD4⁺FoxP3⁺ a serem utilizadas respectivamente como alvo e população T_{REG} no ensaio de supressão: Células esplênicas de camundongos C57BL6 FoxP3⁺GFP⁺ não infectados ou com 7 dias de infecção foram incubadas com microesferas (“beads”) magnéticas recobertas com anticorpos anti-CD19, anti-B220, anti-CD11c, anti-CD8, anti-MHC-II e anti-CD11b por 30 minutos. Após a incubação as células foram lavadas e submetidas a uma coluna imantada para reter as células marcadas, sendo que as células de interesse passam pelas colunas não sendo retidas. Após esse procedimento as células não retidas foram marcadas com anti-CD4-PE e as populações TCD4⁺FoxP3⁻ e TCD4⁺FoxP3⁺ purificadas por *Cell Sorting* em um Citômetro de Fluxo BD FACSAria (Becton Dickinson). A avaliação da pureza das células foi estimada por citometria de fluxo.

Ensaio de proliferação: Células esplênicas CD4⁺FoxP3⁻ (células respondedoras) isoladas de camundongo controle ou camundongo infectado por 7 dias, foram incubadas com esplenócitos de animais *nude* ou esplenócitos desprovidos de células CD4⁺ (como fonte de APCs) e estimuladas com anti-CD3 na presença de células T_{REG} (GFP⁺) isoladas de camundongo infectado por 7 dias ou camundongo controle.

No caso do ensaio de proliferação ambas as células respondedoras e células T_{REG} foram marcadas com “CellTracer” violeta. Três dias após iniciada a cultura e após marcação com anti-CD4-PE a suspensão de células foi analisada por citometria de fluxo avaliando a proliferação das células através da diluição do “CellTracer”, ou seja, através da diminuição da fluorescência violeta.

3.8 Produção de INF- γ no sobrenadante de cultura

A produção de IFN- γ foi avaliada através de ELISA pelo kit Mouse IFN- γ ELISA Set -BD OPteia (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. Os sobrenadantes de culturas de esplenócitos após 72 horas de incubação com ou sem estímulo de anti-CD3 foram retirados e mantidos a -80 °C até a realização do ensaio de ELISA de captura. Previamente, a placa foi sensibilizada

overnight a 4 °C com anticorpo de captura; após esta etapa a placa foi lavada e em seguida colocado o diluente durante 1 hora para ocorrer o bloqueio. Após nova lavagem da placa foram adicionadas as amostras, sendo incubadas por 2 horas. Após nova lavagem foi realizado o procedimento de detecção através da incubação por 1 hora com anticorpo de detecção, seguido da solução substrato e por último, solução de parada da reação, procedendo-se após isso a leitura da reação imunoenzimática através de aparelho leitor de placa.

3.9 PCR em tempo real

Fragmentos dos órgãos fígado, pulmão, coração e músculo esquelético foram obtidos de camundongos controles e camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* e avaliados quanto a presença de mRNA das células FoxP3⁺. A extração do RNA das amostras em que foi adicionado Trizol (Invitrogen, Life Technologies) realizou-se de acordo com as instruções do fabricante (kit RNeasy mini, Qiagen, Germantown, Maryland, USA). A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e cálculo da razão 260/280 (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). A expressão foi normalizada através da utilização de um gene normalizador, no caso, utilizamos GAPDH : 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3' e 3'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-5'. Amostras de mRNA foram tratadas com DNase (Deoxyribonuclease I, Invitrogen) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. A seguir, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 2 µg de RNA total, transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen), Oligo dT (12-18), primers para o gene FoxP3 (Invitrogen): 5'-ACTCGCATGTTGCGCTACTT-3' e 3'-GTCCACACTGCTCCCTTCTC-5' na presença de inibidores de Rnase (Rnase OUT, Invitrogen) em um volume final de 20 µL, a ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperatura do fabricante dos reagentes. As amplificações por PCR foram realizadas em duplicatas e utilizando 50 ng de cDNA por reação e reagentes padronizados para PCR em tempo real (Platinum® SYBR® Green, Invitrogen Life Technologies), adicionado ao conjunto de "primers" específicos para o gene avaliado. As condições da reação foram aquelas descritas na literatura para os "primers". As leituras da fluorescência foram realizadas pelo

equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) a cada ciclo de amplificação e, a análise posterior pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do teste “two way” ANOVA e post test Bonferroni de comparação, utilizando o programa Prisma 5 (GraphPad Software). Diferenças entre os dois grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Cinética do peso e nº total de células do baço nas primeiras semanas de infecção

Com o objetivo de estabelecer a data mais adequada para a análise das células T reguladoras realizamos três estudos cinéticos avaliando o peso e número de células do baço. Como esperado em função de trabalhos anteriores, foi observado um aumento tanto no número total quanto no peso do baço dos animais nos três experimentos, com pico de peso e número de células no 11º dia de infecção (Figura 1).

Figura 1 - Número total de células e peso do baço

Número total de células (linhas cheias) e peso (linhas tracejadas) do baço de camundongos C57BL/6FoxP3⁺GFP⁺ infectados (azul e verde, respectivamente) com *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles (vermelho e roxo, respectivamente). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outros dois experimentos. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

4.2 Metodologia para avaliação das populações celulares

As células foram inicialmente separadas em uma janela para obtenção da população de linfócitos e, a partir desta janela, selecionamos as células CD4⁺ para obtermos uma população mais específica. Através da população de células TCD4⁺ selecionamos as células que expressam a molécula FoxP3⁺ para determinação das células reguladoras e das células TCD4⁺ respondedoras que são FoxP3⁻.

Figura 2 - Determinação das populações celulares estudadas

Janela inicial delimitando a população linfocitária (A). Dentro da janela dos linfócitos separamos a população CD4⁺ (B) e dentro dessa janela determinamos as populações CD4⁺FoxP3⁻ e CD4⁺FoxP3⁺ (C). Acima estão representadas as janelas referentes ao animal controle e abaixo ao animal com 11 dias de infecção.

4.3 Análise do número de células CD4⁺ e CD4⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles

O número total de células CD4⁺ no baço está aumentado do dia 7^o ao dia 11^o dia de infecção, com pico no 11^o dia. Curiosamente, em relação ao dia 11 p.i., o número de células CD4⁺ sofre uma diminuição no dia 14 p.i., que é seguida no dia 18 p.i. por um novo aumento de menor magnitude (Figura 3, esquerda).

Já o número de células CD4⁺FoxP3⁺ no baço dos camundongos infectados não mostrou diferenças significativas em relação ao grupo controle (Figura 3, direita).

Figura 3 - Número total de células CD4⁺ e células CD4⁺FoxP3⁺ esplênicas

Número total de células CD4⁺ (A) e células CD4⁺FoxP3⁺ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) com *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles (linha vermelho) do dia 4 ao 18 p.i.. Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outros dois experimentos. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

4.4 Frequência de células CD4⁺ e CD4⁺FoxP3⁺

Em relação aos valores nos animais controles, a frequência de células CD4⁺ dentre o total de células do baço dos animais infectados não mostrou grandes alterações, revelando pequenos aumentos, porém sem significância, apenas no 7º dia e 18º dia de infecção (Figura 4, esquerda). Com relação à frequência de células CD4⁺FoxP3⁺ na população de células CD4⁺ observa-se que no baço dos animais infectados há uma queda no 7º dia de infecção que se alastra até o dia 14 p.i., observando uma recuperação no último dia analisado, com diferenças significativas nos dias 7 (p<0,01), dia 11 (p<0,001) e dia 14 (p<0,01) (Figura 4, direita).

Figura 4 - Frequência de células $CD4^+$ (em relação ao total de esplenócitos) e células $CD4^+FoxP3^+$ (em relação ao total de células $CD4^+$)

Frequência de células $CD4^+$ (em relação ao total de esplenócitos) (A) e $CD4^+FoxP3^+$ (em relação ao total de células $CD4^+$) (B) no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^+GFP^+$ infectados (linha azul) com *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles (linha vermelha) do dia 4 ao 18 p.i.. Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outros dois experimentos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

4.5 Frequência de células $CD4^+FoxP3^-$

Ao analisarmos a frequência de células $CD4^+FoxP3^-$ dentre as células $CD4^+$, vimos que nos animais infectados há um aumento significativo no 7º dia, que persiste até o 18º dia p.i. (Figura 5).

Figura 5 - Frequência de células $CD4^+FoxP3^-$ esplênicas (em relação ao total de células $CD4^+$)

Frequência de células $CD4^+FoxP3^-$ (em relação ao total de células $CD4^+$) no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^+GFP^+$ infectados (linha azul) com *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.6 Frequência de blastos nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

A seguir avaliamos a expressão de linfócitos grandes, referente àquelas células que estão em proliferação (blastos), nas populações de células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$. Na população das células T_{REG} observamos uma maior parcela de células grandes nos dois primeiros dias analisados (4 e 7 p.i.), com queda nos dias 11 e 14 p.i., e novo aumento no dia 18 p.i., enquanto que na população $CD4^+FoxP3^-$, o aumento das células grandes estendeu-se do dia 4 p.i. ao dia 14 p.i., com pico no 7º dia de infecção.

Figura 6 - Frequência de blastos nas populações de células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

Frequência de blastos na população de células $CD4^+FoxP3^+$ (A) e $CD4^+FoxP3^-$ (B) no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^+GFP^+$ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outros dois experimentos.***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7 Expressão (MFI, “Mean fluorescence intensity”) de diferentes marcadores nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

Para avaliar se existem mudanças fenotípicas na membrana das células T_{REG} decorrentes da intensa ativação linfocitária do compartimento esplênico na infecção pelo *T. cruzi*, avaliamos a expressão de FoxP3, CD127, Fas, FasL, ICOS, GITR, OX40, CTLA4, CD25 e CD69 nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$ no decorrer das primeiras semanas de infecção pelo parasita Sylvio x10/4.

4.7.1 Expressão (MFI) de FoxP3 nas células T_{REG}

Considerando que a atividade reguladora das células T_{REG} não depende somente do número absoluto dessas células, mas também da quantidade de moléculas FoxP3 por célula (Liu H et al., 2006), analisamos se na infecção aguda ocorre uma mudança na expressão de FoxP3 nas células $CD4^+FoxP3^+$. A MFI na população $CD4^+FoxP3^+$ esplênica parece apresentar um pequeno aumento com relação à MFI nos controles nos dias 7, 11, 14 (Figura 7).

Figura 7 - Expressão de FoxP3 nas células CD4⁺FoxP3⁺ esplênicas

Expressão de FoxP3 nas células CD4⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outros dois experimentos. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.2 Expressão (MFI) de CD127 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

Com relação à expressão de CD127 (subunidade alpha do receptor para IL-7) um marcador que em células T humanas possui queda na sua expressão após ativação (Liu et al., 2006), observamos nas células CD4⁺FoxP3⁺ dos animais controles e infectados uma expressão de CD127 não muito diferente daquela do controle isotípico (Figura 8A). Já em relação às células CD4⁺FoxP3⁻, estas mostraram uma expressão de CD127 não significativamente diferente nos animais infectados e animais controles (Figura 8B).

Figura 8 - Expressão (MFI) e histogramas de CD127 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de CD127 e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B), no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento. Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.3 Expressão (MFI) de Fas nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

Fas (CD95) é uma molécula ligada a apoptose celular e importante no controle da expansão celular durante a resposta imune e no retorno à homeostase (Strauss et al., 2009). A sua expressão nas células $CD4^+FoxP3^+$ dos animais infectados mostrou-se discretamente superior à dos animais controles em todos os dias analisados, apesar das diferenças somente atingirem significância no 11º e 18º dia (Figura 9A). Já nas células $CD4^+FoxP3^-$, vimos, em relação aos animais controles, um aumento significativo de expressão em todos os dias analisados (Figura 9B).

Figura 9 - Expressão (MFI) e histogramas de Fas nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de Fas e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento. Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.3.1 Frequência de células Fas^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁻

Nas células CD4⁺FoxP3⁻ observamos ainda a presença de uma pequena subpopulação com alta expressão de Fas (Fas^{HIGH}), com sua frequência atingindo o pico no 7º dia de infecção.

Figura 10 - Frequência de células Fas^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Frequência de células Fas^{HIGH} na população de células CD4⁺FoxP3⁻ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha) (A). Histograma referente ao 7º dia de infecção para frequência de células Fas^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁻ (B). Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.4 Expressão (MFI) de FasL nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

Com relação à FasL, molécula ligante de Fas, também ligada a apoptose celular, nas células CD4⁺FoxP3⁺ observamos que no 4º e 7º dia p.i. a expressão não difere nos animais controles e infectados, mas logo após observa-se um pequeno aumento nos animais infectados com diferença significativa no 18º dia. Nas células CD4⁺FoxP3⁻ o nível de expressão de FasL nos camundongos infectados parece ter um aumento significativo durante o 11º ao 18º dia.

Figura 11 - Expressão (MFI) e histogramas de FasL nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de FasL e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento. Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.5 Expressão (MFI) de ICOS nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

ICOS é uma molécula co-estimulatória que mostra aumento de expressão em células $CD4^+$ após ativação (Hutloff et al., 1999). Ao analisarmos sua expressão nas células $CD4^+FoxP3^+$ dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, observamos um aumento significativo nos dois últimos dias (Figura 12A), além de observarmos a presença de uma população $ICOS^{HIGH}$ (Figura 13). Por outro lado, nas células $CD4^+FoxP3^-$ observamos um aumento na expressão do 4º ao 18º dia p.i. (Figura 12B).

Figura 12 - Expressão (MFI) e histogramas de ICOS nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de ICOS e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento. Controle isotópico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.5.1 Frequência de células ICOS^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁺

Como citado acima nas células CD4⁺FoxP3⁺ observamos nos animais infectados a presença de uma população ICOS^{HIGH} em que sua frequência atinge o pico no 7º dia de infecção com discreta queda nos últimos dias analisados. Contudo, uma diferença significativa na frequência de células CD4⁺FoxP3⁺ ICOS^{HIGH} dos animais infectados em relação aos controles é patente do dia 4 p.i. ao dia 18 p.i. ($p < 0,001$).

Figura 13 - Frequência de células ICOS^{HIGH} nas células CD4⁺FoxP3⁺

Frequência de células ICOS^{HIGH} na população de células CD4⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha) (A). Histograma referente ao 7º dia de infecção para frequência de células ICOS^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁺. Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento (B). Controle isotípico (linha e interior cinza). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

4.7.6 Expressão (MFI) de OX40 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

Avaliamos a expressão de OX40, um membro da superfamília TNF, expresso transientemente em células T efetoras após estimulação antigênica e constitutivamente expresso em células T_{REG}, nas quais atua inibindo a função supressora (Vu et al., 2007). Observamos um aumento na expressão de OX40 nas

células CD4⁺FoxP3⁺ a partir do 7º dia de infecção, porém devido ao grande desvio nos valores obtidos, principalmente no 7º e 11º dia, a diferença não atinge significância, apesar do aumento ser claramente visto nos histogramas demonstrativos. Um grande e significativo aumento na expressão de OX40 foi, entretanto, encontrado nas células CD4⁺FoxP3⁻ no 7º e 11º dia com queda nos dias subsequentes (Figura 14).

Figura 14 - Expressão (MFI) e histogramas de OX40 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de OX40 e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.7 Expressão (MFI) de GITR nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$

Essa molécula co-estimulatória também faz parte da superfamília TNF, sendo a sua sinalização importante na reversão da atividade supressora mediada pelas células T_{REG} , é também expressa em células $CD4^+FoxP3^-$ e atua estimulando a proliferação e produção de citocinas (Nocentini et al., 2007). Observamos na população $CD4^+FoxP3^+$ um aumento significativo na expressão desse marcador no último dia analisado ($p < 0,05$) (Figura 15). Nas células $CD4^+FoxP3^-$ também observamos um aumento significativo no dia 19, além da presença de uma população $GITR^{HIGH}$, porém não podemos concluir em relação à expressão basal de GITR nestas duas populações, pois nessas experiências não usamos o controle isotópico.

Figura 15 - Expressão (MFI) e histogramas de GITR nas células $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$ esplênicas

Expressão (MFI) de GITR e histogramas representativos nas células $CD4^+FoxP3^+$ (A) e nas células $CD4^+FoxP3^-$ (B) no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^+GFP^+$ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.7.7.1 Frequência de células GITR^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁻

Nas células CD4⁺FoxP3⁻ do animal infectado observa-se uma população GITR^{HIGH} que exibe máxima frequência no dia 8 p.i., mas que permanece elevada até o 19º dia p.i..

Figura 16 - Frequência de células GITR^{HIGH} nas células CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Frequência de células GITR^{HIGH} na população de células CD4⁺FoxP3⁻ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha) (A). Histograma referente ao 8º dia de infecção para frequência de células GITR^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁻ (B). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

4.7.8 Expressão (MFI) de CTLA-4 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

Células T_{REG} expressam constitutivamente em sua superfície CTLA-4, molécula que analogamente a CD28 interage com os co-estimuladores CD80/CD86 das APCs. CTLA-4 é também superexpressa transientemente após ativação nas células T efectoras e após interagir com seus ligantes inibe a progressão do ciclo celular e a produção de IL-2 (Kavanagh et al., 2008). Nas nossas experiências, não observamos alterações significativas da expressão de CTLA-4 nas células CD4⁺FoxP3⁺, nos dias analisados. Entretanto, observamos, ao representarmos o histograma do 7º dia p.i., a existência de uma pequena população CTLA-4^{HIGH}, demonstrada na Figura 18. Nas células CD4⁺FoxP3⁻, observamos um aumento da

expressão dessa molécula no 7º dia p.i., com queda no dia 11, novo aumento no 14º dia e queda no 18º dia p.i..

Figura 17 - Expressão (MFI) e histogramas de CTLA-4 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

A

B

Expressão (MFI) de CTLA-4 e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.8.1 Frequência de células CTLA-4^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁺

Como citado acima vimos que nas células CD4⁺FoxP3⁺ há uma população CTLA-4^{HIGH} no dia 7 p.i., que diminui em dias posteriores (Figura 18).

Figura 18 - Frequência de células CTLA-4^{HIGH} nas células CD4⁺FoxP3⁺

Frequência de células CTLA-4^{HIGH} na população de células CD4⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha) (A). Histograma referente ao 7º dia de infecção para frequência de células CTLA-4^{HIGH} na população CD4⁺FoxP3⁺ (B). Controle isotípico (linha e interior cinza). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.7.9 Expressão (MFI) de CD25 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

A expressão de CD25, cadeia alfa do receptor para IL-2, uma citocina importante para sobrevivência das células T_{REG} (Pandiyan et al., 2007), aumenta progressivamente na população CD4⁺FoxP3⁺ até o 14º dia de infecção. A expressão deste marcador pelas células T_{REG} é visivelmente maior que a das células CD4⁺FoxP3⁻. Nesta última população observamos um aumento na expressão de CD25 no 11º dia de infecção, o que não é facilmente reproduzido no histograma demonstrativo.

Figura 19 - Expressão (MFI) e histogramas de CD25 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de CD25 e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). Os dados mostrados são referentes a um experimento (n=2) e os resultados foram reproduzidos em outro experimento. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

4.7.10 Expressão (MFI) de CD69 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻

Com relação à expressão de CD69, marcador de células recém-ativadas, nas células CD4⁺FoxP3⁺ vimos que há um maior expressão dessa molécula nos animais infectados quando comparado aos animais controles. Já a expressão de CD69 nas células CD4⁺FoxP3⁻ não se mostrou diferente nos animais infectados e controles. Embora neste experimento, não foi encontrada diferença entre os animais controles e infectados para a expressão de CD69 em células CD4⁺FoxP3⁻ nos dias analisados, em outro experimento vimos que houve um pequeno aumento da expressão desse marcador em uma subpopulação (CD69^{HIGH}) no 7º dia p.i. (Figura 21).

Figura 20 - Expressão (MFI) e histogramas de CD69 nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas

Expressão (MFI) de CD69 e histogramas representativos nas células CD4⁺FoxP3⁺ (A) e nas células CD4⁺FoxP3⁻ (B) no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

Figura 21 - Histograma representativo referente ao 7º dia de infecção para expressão de CD69 na população $CD4^+FoxP3^-$

Histograma representativo referente ao 7º dia de infecção para expressão de CD69 na população $CD4^+FoxP3^-$ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles (linha vermelha).

4.7.10.1 Frequência de células $CD69^{HIGH}$ nas populações $CD4^+FoxP3^+$

Junto ao pequeno aumento na expressão global de CD69 pelas células $CD4^+FoxP3^+$ dos animais infectados, detectamos nas células T_{REG} uma subpopulação $CD69^{HIGH}$, que também é detectada no animal controle, mas que aumenta no animal infectado do dia 7 ao 14 p.i. com pico da sua frequência no 7º dia p.i..

Figura 22 - Frequência de células CD69^{HIGH} nas células CD4⁺FoxP3⁺

Frequência de células CD69^{HIGH} (esquerda) e histograma referente ao 7º dia de infecção para frequência de células CD69^{HIGH} (direita) na população CD4⁺FoxP3⁺ no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺GFP⁺ infectados (linha azul) por *T. cruzi* Sylvio X10/4 (do dia 4 ao 18 p.i.) e controles (linha vermelha). ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

4.8 Co-expressão de ICOS, CD69 e Fas

Para estimar se o aumento de expressão de ICOS, CD69 e Fas acontece nas mesmas células, avaliamos simultaneamente a expressão destas 3 moléculas nas populações CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻. Ficou evidente, no animal infectado e em menor grau no animal controle, que a expressão aumentada de Fas, CD69 e ICOS nas populações CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ ocorre preferencialmente nas mesmas células (Figura 23 e 24).

Figura 23 - Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população $CD4^{+}FoxP3^{+}$

Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população $CD4^{+}FoxP3^{+}$ no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^{+}GFP^{+}$ infectados por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles.

Figura 24 - Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população $CD4^{+}FoxP3^{-}$

Análise da co-expressão de ICOS, CD69 e Fas na população $CD4^{+}FoxP3^{-}$ no baço de camundongos C57BL/6 $FoxP3^{+}GFP^{+}$ infectados por *T. cruzi* Sylvio X10/4 e controles.

4.9 Análise da atividade reguladora de células $CD4^{+}FoxP3^{+}$

4.9.1 Ensaios de supressão

Após realizarmos a análise fenotípica das células T_{REG} , passamos a avaliar se a atividade supressora destas células é mantida ou cancelada na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 e ainda, se as células $CD4^+FoxP3^-$ ativadas no início da infecção tornam-se resistentes aos sinais supressores das células T_{REG} . Estes experimentos tinham como objetivo esclarecer resultados anteriores do nosso grupo nos quais observamos que o tratamento dos animais infectados pelo *T. cruzi* da cepa Y com anticorpos anti-CD25 (para eliminar as células T_{REG}) não resulta em grandes alterações na parasitemia e intensidade do quadro patológico.

4.9.1.1 Determinação das populações analisadas

A partir de uma seleção inicial das células do baço na janela de linfócitos, selecionamos os linfócitos $CD4^+$ em nova janela, e dentro desta demarcamos as células $CD4^+FoxP3^-$ e $CD4^+FoxP3^+$. A seguir, estas populações foram isoladas por “sorting” no citômetro FACS Aria, marcadas com “CellTracer” violeta e estimuladas com anti-CD3 ou anti-CD3/IL-2, estimando-se a proliferação em ambas populações através da diluição da intensidade do corante violeta.

Figura 25 - Determinação das populações celulares estudadas

Janela inicial delimitando a população linfocitária (A). Dentro da janela dos linfócitos separamos a população $CD4^+$ (B) e dentro dessa janela determinamos as populações $CD4^+FoxP3^-$ e $CD4^+FoxP3^+$ (C) para posterior análise da queda da intensidade da marcação do “CellTracer” violeta, nos permitindo avaliar a proliferação celular (D).

4.9.1.2 Regulação da proliferação de células $CD4^+FoxP3^-$ de animais *naive* por T_{REG} de animais *naive* e com 7 dias de infecção

Antes de procedermos à descrição dos resultados dos ensaios de regulação precisamos indicar que nestas experiências denominamos os animais controles de animais *naive*, reservando o termo controle para denominar nas experiências *in vitro* o grupo experimental que contém exclusivamente células respondedoras, sem adição de células T_{REG} .

Em ensaio comparativo da atividade supressora de células $CD4^+FoxP3^+$ de animais *naive* e células $CD4^+FoxP3^+$ de animais com 7 dias de infecção, sobre a proliferação induzida por anti-CD3 nas células $CD4^+FoxP3^-$ (células $T_{RESPONDEDORAS}$) de animais *naive*, observamos semelhança na curva de proliferação (soma de gerações, ou seja, soma das células que apresentam diferentes níveis de diluição do “CellTracer”), o que indica um efeito supressor análogo (Figura 26).

Figura 26 - Análise da proliferação de diferentes proporções de células $CD4^+FoxP3^-$ esplênicas *naive*, na presença de células $CD4^+FoxP3^+$ esplênicas *naive* e com 7 dias de infecção

B

$$T_{\text{REGULADORAS animal naive}} / T_{\text{RESPONDEDORAS animal naive}}$$
C

$$T_{\text{REGULADORAS animal infectado}} / T_{\text{RESPONDEDORAS animal naive}}$$
D

$$T_{\text{REGULADORAS}}$$

Análise, através da soma das gerações, da proliferação após estímulo por anti-CD3 de diferentes proporções de células $CD4^+FoxP3^-$ provenientes do baço de animais C57BL/6 não infectados e células $CD4^+FoxP3^+$ isoladas do baço de animais *naive* e com 7 dias de infecção (A). Histogramas referentes às células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ do animal *naive*, em preto com células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal *naive*, em azul (B). Histogramas referentes às células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ do animal *naive*, em preto com células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal infectado, em roxo (C). Histogramas referentes às células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal *naive*, em preto, e do animal infectado, em roxo (D), acompanhando, da esquerda para a direita, a diluição das células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ mostrada nos histogramas acima.

4.9.1.3 Análise da produção de $INF-\gamma$ no sobrenadante das culturas de células $CD4^+FoxP3^-$ de animal *naive* estimuladas com anti-CD3 na presença de células T_{REG} de animal *naive* e infectado por 7 dias

Ao analisarmos os sobrenadantes das culturas contendo células respondedoras de animal *naive*, observamos que a produção de $INF-\gamma$ foi significativamente inferior nos grupos acrescidos de células T_{REG} do que no grupo controle não acrescido destas células. Uma diferença significativa foi também observada na produção de $INF-\gamma$ pelo grupo que contém uma proporção de 10 células respondedoras por cada célula T_{REG} , em relação aos grupos com outras proporções de células.

Por outro lado, na análise do sobrenadante das culturas contendo células T_{REG} do animal infectado por 7 dias e células respondedoras de animal *naive* também observamos diferença significativa na produção de $INF-\gamma$ entre as diferentes proporções celulares e o grupo controle. Entretanto, não observamos diferença ao compararmos a produção de $INF-\gamma$ entre os grupos contendo diferentes proporções de T_{REG} . Nas culturas de células não estimuladas com anti-CD3, os valores de $INF-\gamma$ foram próximos a zero (dados não mostrados).

Figura 27 - Análise da produção de INF- γ através de sobrenadante de cultura por ELISA utilizando diferentes proporções de células CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas *naïve* adicionadas a células T_{REG} esplênicas *naïve* e com 7 dias de infecção

Análise por ELISA de captura da produção de INF- γ nos sobrenadantes de culturas contendo diferentes proporções de células CD4⁺FoxP3⁻ provenientes de animal *naïve* e células T_{REG} procedentes de animais *naïve* ou animais com 7 dias de infecção. O teste estatístico utilizado foi o “one way” ANOVA e post test Tukey de comparação. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.9.1.4 Regulação da proliferação de células CD4⁺FoxP3⁻ de animais infectados por células T_{REG} de animais *naïve* e com 7 dias de infecção

Em estudo comparativo da atividade supressora de células CD4⁺FoxP3⁺ de animais *naïve* e células CD4⁺FoxP3⁺ de animais com 7 dias de infecção, sobre a proliferação induzida por anti-CD3/IL-2 nas células CD4⁺FoxP3⁻ (células T_{RESPONDEDORAS}) de animais, desta vez, com 7 dias de infecção, observamos novamente semelhança ao avaliarmos a soma de gerações, indicando mais uma vez um efeito supressor análogo. Contudo, nesta experiência foi observado que o efeito regulador da proliferação aconteceu principalmente sobre as gerações 4 a 7.

Figura 28 - Análise da proliferação de diferentes proporções de células $CD4^+FoxP3^-$ esplênicas com 7 dias de infecção, na presença de células $CD4^+FoxP3^+$ esplênicas *naive* e com 7 dias de infecção

Análise, através da soma das gerações, da proliferação após estímulo por anti-CD3 e IL-2 de diferentes proporções de células $CD4^+FoxP3^-$ provenientes do baço de animais C57BL/6 com 7 dias de infecção, na presença de células $CD4^+FoxP3^+$ isoladas do baço de animais *naive* e com 7 dias de infecção (A). Histogramas referentes às células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ do animal infectado, em preto com células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal *naive*, em azul (B). Histogramas referentes às células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ do animal infectado, em preto com células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal infectado em roxo (C). Histogramas referentes às células $T_{\text{REGULADORAS}}$ do animal *naive*, em preto, e do animal infectado, em roxo (D), acompanhando, da esquerda para a direita, a diluição das células $T_{\text{RESPONDEDORAS}}$ mostrada nos histogramas acima.

4.9.1.5 Análise da produção de $INF-\gamma$ no sobrenadante de culturas de células $CD4^+FoxP3^-$ de animal infectado estimuladas com anti-CD3/IL-2 na presença de células T_{REG} de animal *naive* e infectado por 7 dias

Ao analisarmos os sobrenadantes das culturas contendo células T_{REG} do animal *naive* e células respondedoras de animal com 7 dias de infecção na ausência de qualquer estímulo, observamos que a produção de $INF-\gamma$ foi significativamente inferior nos grupos contendo células T_{REG} comparado ao grupo controle não acrescido destas células (gráfico superior esquerdo). Já nos grupos onde houve o estímulo com anti-CD3/IL-2, a produção de $INF-\gamma$ foi significativamente inferior nos grupos contendo 1 ou 2 células respondedoras para cada célula T_{REG} em relação ao grupo

controle (gráfico superior direito), além disso, diferenças significativas foram também observadas nos grupos contendo uma proporção de 1 ou 2 células respondedoras por cada célula T_{REG} , em relação aos grupos contendo 5 e 10 células respondedoras para cada célula T_{REG} .

Na análise do sobrenadante das culturas contendo células T_{REG} do animal infectado por 7 dias e células respondedoras do animal com 7 dias de infecção, observamos diferença significativa na produção de $IFN-\gamma$ entre as diferentes proporções celulares e o grupo controle, tanto no grupo em que houve o estímulo com anti-CD3/IL-2 (gráfico inferior direito), quanto naquele em que o estímulo estava ausente (gráfico inferior esquerdo), também observando uma produção de $IFN-\gamma$ significativamente inferior nos grupos contendo células T_{REG} comparado ao grupo controle.

Figura 29 - Análise da produção de INF- γ através de sobrenadante de cultura por ELISA utilizando diferentes proporções de células CD4⁺FoxP3⁻ esplênicas com 7 dias de infecção, adicionadas a células T_{REG} *naive* e com 7 dias de infecção

Análise por ELISA de captura da produção de INF- γ nos sobrenadantes de culturas contendo diferentes proporções de células CD4⁺FoxP3⁻ provenientes de animal com 7 dias de infecção e células T_{REG} procedentes de animais *naive* ou com 7 dias de infecção, sem nenhuma classe de estímulo (gráficos à esquerda) ou estimuladas com anti-CD3/IL-2 (gráficos à direita). O teste estatístico utilizado foi o “one way” ANOVA e post test Tukey de comparação. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

4.10 Análise por PCR da presença de células FoxP3⁺ em diferentes órgãos

Para investigarmos a possibilidade de migração de células T_{REG} para possíveis órgãos atingidos pela infecção, na tentativa de controle da resposta imune local, avaliamos indiretamente a presença destas células no coração, músculo esquelético, pulmão e fígado através de quantificação por PCR-real time dos transcritos de FoxP3. Os nossos resultados mostraram não haver diferenças significativas entre os animais não infectados e aqueles com 7 dias de infecção em relação à expressão gênica de FoxP3 nos quatro órgãos analisados.

Figura 30 - Análise por PCR da presença de células FoxP3+ em diferentes órgãos

Análise indireta por PCR da presença de células FoxP3⁺ em diferentes órgãos de animais controles e infectados. Coração, músculo esquelético, pulmão e fígado (n=2) ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho tivemos como objetivo analisar as mudanças no número e fenótipo das células T_{REG} esplênicas nas primeiras semanas após infecção por parasitas do clone Sylvio X10/4 do *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar se a atividade supressora dessas células está mantida nesse período.

Primeiramente observamos um aumento no peso e número de células no baço dos animais infectados entre o 11º e 14º dia, resultado similar ao obtido com outros isolados de *T. cruzi*, tanto pelo nosso grupo (Fernando Pretel, Tese de Doutorado), como por outro grupo de pesquisa (Tarleton et al., 2007). O aumento na celularidade esplênica é condizente com uma ativação linfocitária intensa, que tem sido denominada de ativação policlonal pelo fato da maior parte dos linfócitos ativados possuírem especificidades não relacionadas com o parasita indutor. Os aumentos observados nas nossas experiências tiveram menor intensidade aos relatados em infecções com *T. cruzi* de alta virulência (Tarleton et al., 2007) que, diferentemente da infecção por parasitas Sylvio X10/4, cursam com parasitemias patentes elevadas nas primeiras semanas de infecção.

Em concordância com o aumento no número global de células esplênicas observamos um aumento no número de células CD4⁺ que atinge seu pico por volta do 11º dia de infecção. Já o número de células CD4⁺FoxP3⁺ no baço dos animais infectados não mostrou diferenças significativas com o grupo controle, sugerindo que essa população não deve sofrer expansões muito grandes no decorrer da fase de infecção analisada.

Diferentemente dos valores totais, a frequência das células CD4⁺ não mostrou alterações no período analisado. Assim, apesar do aumento do número de células CD4⁺ nas primeiras semanas de infecção, sua frequência em relação ao total de células esplênicas pouco se altera, resultado que indica que o número de células CD4⁺ acompanha o aumento global de celularidade no baço do animal infectado. No entanto, é importante destacar que no dia 14 de infecção observa-se uma queda do número de células CD4⁺ que atinge valores semelhantes aos do grupo controle. Em concordância com este resultado, a frequência de células CD4⁺ no dia 14 p.i. atinge valores discretamente inferiores aos observados no grupo controle. A queda no número e frequência de células CD4⁺ esplênicas no dia 14 p.i tem sido também observada na fase aguda da infecção pelo *Plasmodium chabaudi*, um parasita que

induz altos níveis de ativação policlonal no baço, e foi atribuída aos altos índices de morte celular (Muxel et al., 2011).

Em relação às células CD4⁺FoxP3⁺, os nossos resultados mostram que o número total de células T_{REG} no baço do animal infectado não acompanha a expansão de células CD4⁺. Uma queda na frequência da população FoxP3⁺ esplênica já havia sido mostrada no nosso laboratório na infecção com tripanossomos da cepa Y (Fernando Pretel, Tese de Doutorado). A priori, poderíamos supor que a queda na frequência de células CD4⁺FoxP3⁺ estivesse diretamente relacionada com a migração das células reguladoras para órgãos tidos como alvos pela infecção do *T. cruzi*, como descrito por outros grupos em outros modelos de infecção pelo *T. cruzi* (Kotner et al., 2007; Sales et al., 2008). No entanto, ao avaliarmos a expressão gênica de FoxP3 no coração, músculo esquelético, fígado e pulmão, observamos que aos 7 dias de infecção pelo *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 o nível de transcrição de Foxp3 não foi diferente do encontrado nos órgãos dos animais controles. Contudo, não foi estimado a intensidade do infiltrado inflamatório nestes órgãos no dia 7 de infecção.

Ao analisarmos a presença de blastos nas células CD4⁺FoxP3⁺ observamos um aumento significativo nos dias 4-7 p.i., assim como no último dia analisado (18 p.i.), contudo muito inferior ao mostrado pelas células CD4⁺FoxP3⁻, nas quais o aumento no número de blastos teve um pico claro e muito elevado no dia 7 de infecção. Por outro lado, nas experiências de proliferação *in vitro* por anti-CD3 e IL-2, observamos que as células T_{REG} de camundongo infectado por 7 dias proliferam em níveis semelhantes (discretamente inferiores) aos das células T_{REG} de camundongo controle não infectado.

Ao analisarmos as mudanças fenotípicas que sofrem as células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ nas primeiras semanas da infecção, estudamos em primeiro lugar a expressão de FoxP3 nas células CD4⁺FoxP3⁺, considerando que a atividade reguladora das células T_{REG} não depende somente do número absoluto dessas células, mas também da quantidade de moléculas FoxP3 por célula (Liu H et al., 2006). Os estudos cinéticos realizados mostram que a expressão desse marcador sofre um pequeno aumento nos dias 7 a 14 de infecção pelo *T. cruzi*.

Em relação à CD127, os nossos resultados mostram expressão muito baixa desse marcador nas células CD4⁺FoxP3⁺ dos animais controles e infectados. Este resultado não difere do que já foi descrito em humanos em que todas as células

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tem uma baixa/nula expressão de CD127. Já em relação à expressão desse marcador nas células CD4⁺FoxP3⁻, observamos que expressam a molécula CD127, mas não verificamos qualquer mudança significativa após infecção. Este resultado nos causou surpresa, uma vez que na literatura é descrita queda na expressão deste marcador logo após ativação (Liu W et al., 2006).

A expressão da molécula Fas indica, em certa forma, uma susceptibilidade a apoptose que pode ser deflagrada após interação com FasL em interação suicida ou fratricida. No período de infecção analisado, a expressão de Fas nas células CD4⁺FoxP3⁺ mostrou um aumento no dia 11 de infecção. Este aumento sugere uma maior susceptibilidade à morte, que agindo em sentido oposto à proliferação poderia explicar porque o aumento das T_{REG} no baço do animal infectado é pequeno. Apoiando esta interpretação, o aumento de Fas coincide com a queda na frequência das células T_{REG}, assim como com a queda na frequência de blastos T_{REG} que mede indiretamente a expansão desta população. Baseando-se no estudo publicado por Strauss et al. (2009), descrito na introdução deste manuscrito, seria importante avaliar em experimentos futuros os níveis de IL-2 no baço no dia 11 p.i. , uma vez que uma queda na produção desta citocina iria constituir uma condição favorável a apoptose das células T_{REG}. Mais ainda, seria importante determinar se nesse dia de infecção as T_{REG} exibem uma maior frequência de células pré-apoptóticas estimado pela ligação a anexina V marcada. Já nas células CD4⁺FoxP3⁻ um aumento de expressão de Fas foi observado em todo o período, com pico no dia 7 p.i.. Além disso, nas células CD4⁺FoxP3⁻ observamos a existência de uma sub-população Fas^{HIGH}, que poderia estar relacionada a uma ativação mais intensa numa fração das células CD4⁺FoxP3⁻. Os aumentos na expressão de Fas nas células CD4⁺FoxP3⁻, tanto o observado na população como um todo, quanto aquele na sub-população Fas^{HIGH}, poderiam estar respectivamente relacionados com sinais de resposta inespecíficos ou específicos em resposta ao parasita.

Nas células CD4⁺FoxP3⁻ também observamos aumento da expressão de FasL a partir do 11º dia de infecção, havendo a possibilidade dessas células atuarem induzindo a morte por AICD de alvos que expressem níveis elevados de Fas, tais como as próprias células CD4⁺FoxP3⁻ e as T_{REG} do dia 11 p.i. Por outro lado, na população CD4⁺FoxP3⁺ nota-se um pequeno aumento na expressão de FasL no 18º dia, permitindo aventar a possibilidade dessas células também atuarem causando a morte de células alvo, num período um pouco mais tardio.

Em relação à expressão pelas células $CD4^+FoxP3^+$ do co-estimulador ICOS, molécula que parece atuar na ativação das células B dependente de células T, observamos um pequeno aumento que atinge significância no 14º e 18º dia de infecção, além de verificarmos a presença de uma população $ICOS^{HIGH}$ que atinge seu pico no 7º dia p.i.. O aumento na expressão de ICOS nas células $CD4^+FoxP3^+$ (tanto aquele que afeta a população T_{REG} como um todo, quanto o que resulta na subpopulação $ICOS^{HIGH}$), poderia estar relacionado a estímulos específicos e inespecíficos na infecção pelo *T. cruzi*. Recentemente, foi descrito que uma subpopulação $FoxP3^+ICOS^+$ está envolvida no controle das células T auxiliares foliculares (T_{FH}), população que auxilia a resposta das células B (Hutloff et al, 1999; Löhning et al, 2003), podendo nos levar a crer que a subpopulação $FoxP3^+ICOS^{HIGH}$ observada em nossos estudos, poderia estar envolvida no controle das células T que auxiliam as células B a produzirem anticorpos policlonais ou específicos ao *T. cruzi*. Já nas células $CD4^+FoxP3^-$ dos animais infectados observa-se um aumento global de ICOS que afeta grande parte da população, com pico de expressão no 7º dia, mas que pode ser observado até o último dia avaliado, podendo se especular que grande parte destas células poderiam estar relacionadas às próprias células T auxiliares foliculares (T_{FH}).

Na literatura foi descrito que a interação de OX40 com o seu ligante OX40L atua positivamente sobre a proliferação das células $CD4^+FoxP3^-$ e negativamente sobre a supressão exercida pelas células T_{REG} . Nas experiências realizadas no modelo de infecção por parasitas Sylvio X10/4 observamos que a expressão de OX40 pelas células $CD4^+FoxP3^+$ mostra tendência de aumento entre o 7º e 11º dia de infecção, enquanto que nas células $CD4^+FoxP3^-$ observam-se aumentos importantes e significativos nestas mesmas datas, evento que coincide com a expansão celular ocorrida nestas células. A tendência de aumento de OX40 nas células $CD4^+FoxP3^+$ sugere uma maior interação OX40/OX40L, que de acordo a Vu e colaboradores cancelaria a atividade supressora das células T_{REG} (Vu et al., 2007). No entanto, esta possibilidade não é apoiada pela nossa avaliação da atividade reguladora das células $CD4^+FoxP3^+$ do 7º dia de infecção, que mostra claramente preservação da função supressora (discutido mais abaixo). Por outro lado, poderíamos considerar que esta possibilidade ainda está em aberto, uma vez que no ensaio de supressão utilizamos anti-CD3, um estímulo inespecífico; nessas condições de estimulação, poderia ocorrer que algumas interações entre T_{REG} e

APC, tais como a interação OX40/OX40L, fossem contornadas. Nos estudos da expressão de OX40 foi importante constatar que, analogamente ao observado para Fas, o aumento na expressão de OX40 pelas células $CD4^+FoxP3^-$ dos animais infectados afeta quase a totalidade da população, o que sugere uma indução não específica desta molécula. Nestas células, o aumento de OX40 (e o eventual aumento da interação OX40/OX40L) poderia indicar uma diminuição na indução de novas células $CD4^+FoxP3^+$ a partir das células $CD4^+FoxP3^-$. Um outro efeito que poderia ser atribuído a interação OX40/OX40L (Vu et al., 2007), seria a indução de resistência nas células $CD4^+FoxP3^-$ à supressão por células T_{REG} (Shevach, 2009), possibilidade discutida mais abaixo.

GITR é descrito na literatura como uma molécula expressa constitutivamente na superfície das células T_{REG} que, ligando-se ao seu receptor, diminui a atividade supressora destas células. Por outro lado, foi também relatado que, quando ativadas, as células $CD4^+FoxP3^-$ passam a expressar esta molécula co-estimuladora que atua aumentando a proliferação e a produção de citocinas destas células. Nos animais infectados por parasitas do clone Sylvio X10/4, observamos que a expressão de GITR pelas células $CD4^+FoxP3^+$ esplênicas aumenta significativamente no 19º dia p.i.. Mais ainda, nas células $CD4^+FoxP3^-$ também foi observado um aumento de expressão nesse mesmo dia, além de se observar uma subpopulação $GITR^{HIGH}$ que exhibe seu pico no 8º dia de infecção. O aumento de expressão de GITR nas populações $TCD4^+$ permite sugerir que a interação GITR/GITRL opera no camundongo infectado, apesar de desconhecermos se o ligante de GITR também é expresso nos animais infectados. Nas células $CD4^+FoxP3^-$ o aumento do GITR poderia resultar em maior co-estimulação (Nocentini et al., 2007) que poderia implicar no segundo aumento de células $TCD4^+$ esplênicas no 18º dia p.i., na mesma forma que o aumento na subpopulação $GITR^{HIGH}$ poderia estar relacionado ao primeiro aumento no número de células $TCD4^+$ no início da infecção. Já em relação ao aumento de GITR na população $CD4^+FoxP3^+$ desconhecemos se resulta em aumento da interação GITR/GITRL e diminuição da capacidade supressora das T_{REG} , uma vez que a atividade regulatória das células do dia 18 p.i. não foi pesquisada. Mais ainda, como citado acima, não podemos descartar a possibilidade do estímulo com anti-CD3 (no ensaio de supressão) ter contornado a interação GITR/GITRL entre T_{REG} e APC.

Ao avaliarmos a expressão da molécula CTLA-4 na população de células CD4⁺FoxP3⁺, não observamos alterações nos dias analisados. No entanto, notamos a presença de uma população CTLA-4^{HIGH} no 7º dia de infecção, sugerindo que neste momento da infecção, uma parcela da população T_{REG} seja estimulada a aumentar seus níveis de CTLA-4, de forma a modular positivamente sua atividade supressora. Já nas células CD4⁺Foxp3⁻, observamos aumento na expressão de CTLA-4 no 7º dia e 14º dia p.i., aumentos que sugerem a existência de um mecanismo de “feedback” negativo intrínseco das células policlionalmente ativadas. É possível por tanto, que através da interação de CTLA-4 com as moléculas B7 nas células APC, as células CD4⁺FoxP3⁻ ativadas diminuam a intensidade da sua resposta, o que condiz com a contração celular CD4 observada no 14º dia de infecção.

Outra molécula altamente expressa em células CD4⁺FoxP3⁺ e que foi alvo dos nossos estudos, é o CD25, a cadeia alfa do receptor para IL-2. Confirmando o descrito na literatura, observamos que a expressão basal desta molécula nas células T_{REG} dos animais controles já é muito elevada. Mais ainda, após a infecção constatamos que a expressão de CD25 nas células, aumenta progressivamente até o 14º dia, aumento que pode estar relacionado com uma maior captura da IL-2 produzida, o que por um lado poderia agir positivamente na sobrevivência destas células e por outro, diminuiria a IL-2 disponível para a expansão das células CD4⁺FoxP3⁻ ativadas. Surpreendentemente, nas células CD4⁺FoxP3⁻ observamos aumento mínimo, mas significativo, de CD25 após a infecção. Esses resultados sugerem a importância de IL-2 na indução da proliferação/atividade funcional das células CD4⁺FoxP3⁺, mas não apoiam a IL-2 como a citocina principal envolvida na proliferação das células CD4⁺FoxP3⁻ ativadas no início da infecção pelo *T. cruzi*.

Também analisamos a expressão da molécula CD69, um marcador de células recém-ativadas. Nas células CD4⁺FoxP3⁺ dos animais infectados detectamos aumento da expressão global do dia 7 ao 18 p.i., assim como aumento na frequência de uma subpopulação CD69^{HIGH} do 7º ao 14º dia de infecção. Este resultado pode ser interpretado como indicativo de uma fração de células T_{REG} se manterem em estado contínuo de ativação, que se torna mais intensa no animal infectado pelo *T. cruzi* no período indicado. Na população CD4⁺FoxP3⁻, entretanto, não podemos concluir se houve aumento ou não na expressão desse marcador, já que tivemos discrepância entre os dois experimentos realizados.

Experimentos de marcação simultânea (no mesmo tubo) para ICOS, CD69 e Fas mostraram que, tanto para as células $CD4^+FoxP3^+$ como para as células $CD4^+FoxP3^-$, as subpopulações “High”, acima descritas para estes três marcadores, constituem uma subpopulação única. Assim, podemos afirmar que na infecção aguda pelo parasita Sylvio X10/4, são ativadas subpopulações $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+FoxP3^-$ que co-expressam nas mesmas células determinados marcadores. Resta saber se estas subpopulações “High” estão constituídas por clones ativados policlonalmente e/ou por clones parasito-específicos.

Ao compararmos a atividade supressora das células T_{REG} isoladas do baço de camundongos controles ou de camundongos no 7º dia de infecção, verificamos que ambas as populações exercem atividade reguladora semelhante sobre a proliferação a anti-CD3 de células $CD4^+FoxP3^-$ respondedoras de camundongo não infectado. Além disso, resultado semelhante foi observado ao colocarmos células $CD4^+FoxP3^-$ respondedoras de animal com 7 dias de infecção. O conjunto destas experiências sugere que as células T_{REG} do animal infectado não têm sua atividade reguladora cancelada por conta da infecção. Mais ainda, sugere que as células $CD4^+FoxP3^-$ do animal infectado não são refratárias à ação reguladora das T_{REG} . Assim, outras hipóteses devem ser cogitadas para explicar porque o tratamento dos animais infectados com *T. cruzi* (da cepa Y) com monoclonal anti-CD25, que resulta em eliminação temporária das células T_{REG} , não afeta a parasitemia na fase aguda da infecção.

No controle da infecção pelo *T. cruzi*, um elemento importante é a produção de citocinas pró-inflamatórias, e, entre estas, o $IFN-\gamma$. Nos estudos destinados a avaliar a atividade das células T_{REG} , juntamente com o seu efeito sobre a proliferação, avaliamos sua ação supressiva sobre a produção de $IFN-\gamma$ pelas células $CD4^+FoxP3^-$. Os nossos resultados mostram que, analogamente ao observado na proliferação celular, as células $CD4^+FoxP3^-$ esplênicas (de animal infectado ou controle) são similarmente reguladas pelas células $CD4^+FoxP3^+$ (de animal infectado ou controle) na produção da citocina $INF-\gamma$.

6 CONCLUSÕES

Os experimentos realizados nos permitem derivar as seguintes conclusões:

- nas condições experimentais utilizadas, no 11º dia de infecção pelo *T. cruzi* clone Sylvio X10/4, é atingido o pico de peso e celularidade no baço, assim como de células CD4⁺. Entretanto, a frequência de células TCD4⁺ totais no baço dos animais infectados pouco se altera;
- no decorrer do período de infecção analisado não se observam grandes variações no número de células FoxP3⁺. Apesar da conservação do número das células FoxP3⁺, observa-se uma diminuição na frequência desta população (em relação ao total de CD4⁺) como consequência da expansão das células CD4⁺FoxP3⁻;
- observamos a presença de células em proliferação (blastos) nas células CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ com aumento em sua frequência nos primeiros dias analisados;
- em relação à expressão (MFI) de marcadores, foi observado que nas células CD4⁺FoxP3⁺ houve aumento das moléculas FoxP3, Fas, Fas-L, ICOS, GITR, CD25 e CD69 e não observamos alterações nessa população das moléculas CD127, OX40 e CTLA-4;
- já com relação às células CD4⁺FoxP3⁻ observamos aumento da expressão de Fas, Fas-L, ICOS, OX40, GITR, CTLA-4 e CD25 e não observamos alterações da molécula CD127;
- podemos afirmar que o aumento na expressão de Fas, CD69 e ICOS nas populações CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁻ acontece preferencialmente nas mesmas células;
- com relação à atividade supressora das células T_{REG} observamos que, em animais com 7 dias de infecção, esta população mantém sua ação supressora com atividade similar à das T_{REG} de animais controle;
- observamos que células CD4⁺FoxP3⁻ respondedoras de um animal com 7 dias de infecção se mostram susceptíveis à ação supressora das células T_{REG};
- com relação à produção de INF- γ observamos que na infecção pelo *T. cruzi* a produção desta citocina é também regulada pelas células T_{REG};

- em alguns dos órgãos eventualmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* não observamos aumento da expressão de FoxP3⁺ através da análise por PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS*

- Abrahamsohn IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 1995;155:3955-63.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, Von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. Nat Immunol. 2002 Aug;3(8):756-63.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2006; 177(6):3515-9.
- Banz A, Pontoux C, Papiernik M. Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. J Immunol. 2002;169:750–57.
- Barnes MJ, Griseri T, Johnson AMF, Young W, Powrie F, Izcue A. CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. Nature. 2013;6:324-34.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, DE WAAL-MALEFYT R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4 + T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 Th1- and Th2-inducing cytokines. J Exp Med. 2002;195:603-16.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. Nature. 2002;420:502-7.
- Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. Eur. J Immunol. 2008;38:918-21.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome IPEX is caused by mutations of FoxP3. Nat Genet. 2001;27:20-1.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441(7090):235-8.
- Bluestone J.A, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat.Rev Immunol. 2003;3:253-7.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Cerrone MC, Kuhn RE. Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol.* 1991;138:423-36.

Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic nod mice. *J Immunol.* 1997;158:2947-54.

Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺ to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol.* 2004;34:859–69.

Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* 2009;70(4):326–36.

Cunningham DS, Kuhn RE, Rowland EC. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Infect Immun.* 1978;22:155-60.

Dembic Z. Beginning of the end of (understanding) the immune response. *Scand J Immunol.* 2008;68(4):381-2.

D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipnis T, Eisen H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 1985 Feb;15(2):201-3.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-6.

Fritzching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E. Cutting edge: in contrast to effector T cells, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol.* 2005;175:32-36.

Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology.* 2002;32:167-70.

Groux H, O'GARRA A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, DE VRIES JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific Tcell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389:737-42.

Hayes MM, Kierszembaum F. Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 1981;31:1117-24.

Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol.* 2002;32:1282-91.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.

Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing The Bottom Billion Through Control Of Neglected Tropical Diseases. *Lancet*. 2009;373:1570-5,

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397:263-6.

Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1998;28:2780-90.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;192:1213-22.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues M, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.

Kavanagh B, O'BRIEN S, Lee D, Hou Y, Weinberg V, Rini B, Allison JP, Small EJ, Fong L. CTLA-4 blockade expands FoxP3⁺ regulatory and activated effector CD4⁺ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood*. 2008;112:1175-83.

Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a Tregulatory cell 1 phenotype. *Nature*. 2003;421:388-92.

Kim JI, Sonawane SB, Lee MK, Lee SH, Duff PE, Moore DJ, O'Connor MR, Lian MM, Deng S, Choi Y, Yeh H, Caton AJ, Markmann JF. Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival. *Eur J Immunol*. 2010;40:1369-74.

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*. 2002;168:1080-6.

Kondelková K, Vokurková D, Krejsek J, Borska L, Fiala Z, Andrys C. Regulatory T cells (Treg) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica*. 2010;53:73-7.

Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 2007;75:861-9.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407:789–95.

Kubo T, Hatton RD, Oliver J, Liu X, Elson CO, Weaver CT. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(12):7249-58.

Lanteri MC, O'BRIEN KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, Owen RE, Heitman JW, Custer B, Hirschhorn DF, Tobler LH, Kiely N, Prince HE, Ndhlovu LC, Nixon DF, Kamel HT, Kelvin DJ, Busch MP, Rudensky AY, Diamond MS, Norris PJ. Tregs control de developmentod symptomatic west nile virus infection in humans and mice. *J Clinical Investigation.* 2009;119(11):3266-77.

Liang S, Alard P, Zhaoy, Pamelli S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4+CD25- cells into CD4+CD25+ regulatory Tcells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med.* 2005;201:127-37.

Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7048-53.

Liu W, Putnam AL, Xuýu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, St Groth BF, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203:1701-11.

Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med.* 2003;197:181-93.

Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp Rev in Molec Med.* 2002;4:1-16.

Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001;2:816-22.

Marks E, Verolin M, Stensson A, Lycke N. Differential CD28 an inducible costimulatory molecule signaling requirements for protective CD4⁺ T-cell-mediated immunity against genital tract *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun.* 2007;75:4638-47.

Marinho CRF, Nuñez-Apaza LN, Martins-Santos R, Bastos KRB, Bombeiro AL, Bucci DZ, Sardinha LR, Lima MRD, Alvarez JM. IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scandinavian J Immunol.* 2007;66:297–308.

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreora AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 2008;10:825-33.

Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *International J Parasit.* 2001;31:588-91.

Muxel SM, Do Rosário APF, Zago CA, Castillo-Méndez SI, Sardinha LR, Rodriguez-Málaga SM, Saraiva Camara NO, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. The spleen CD4+ t cell response to blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria develops in two phases characterized by different properties. *Plos One.* 2011;6(7):E22434.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 + CD25 + regulatory t cells is mediated by cell surfacebound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629-44.

Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol.* 2007;37:1165-9.

Pandiyani P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature.* 2007;8:1353-62.

Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033-6.

Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamssohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* 1999;193:90-8.

Pretel FD. Dinâmica das células T reguladoras (T_{REG}) na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* e o seu eventual envolvimento na patologia cardíaca na fase crônica. [tese (Doutorado em Imunologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Reed SG, Larson CL, Speer CA. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas disease. *Z Parasitenkd.* 1977;52:11-17.

Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, Offner H, Weinberg AD. Cutting edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol.* 2009;183:4853-7.

Sage PT, Francisco LM, Carman CV, Sharpe AH. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol.* 2012;14:152-61.

Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001;276:37672-9.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains CD25. Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-64.

Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*. 1982;156:1577-86.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6:345-52.

Sales PA Jr, Golgher D, Oliveira RV, Vieira V, Arantes RM, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2008;10:680-8.

Schmitz I, Weyd H, Krueger A, Baumann S, Fas SC, Krammer PH, Kirchhoff S. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J Immunol*. 2004;172:2194–200.

Shevach EM. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30:636-45.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25 + CD4 + regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3:135-42.

Silveira FVDM, Pereira Pardal P, Oliveira Lobao A, Britto Melo G. Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil Nota prévia. *Hileia Médica*, Belém. 1979;1:61- 2.

Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4⁺CD25^{HIGH}FoxP3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009;182:1469-80.

Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, Guinter T, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Kruhlak M, Lindsten T, Thompson CB, Feigenbaum L, Singer A. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood*. 2012;119:5155-63.

Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol*. 1988;Apr 15;140(8):2769-73.

Teixeira AR, Teixeira G, Macedo V, Prata A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest*. 1978;62:1132-41.

Verhagen J, Genolet R, Britton GJ, Stevenson BJ, Sabatos-Peyton CA, Dyson J, Luescher IF, Wraith DC. CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *PNAS*. 2013;110(3):E221–E230.

Vigario AM, Gorgette O, Dujardin HC, Cruz T, Cazenave PA, Six A, Bandeira A, Pied S. Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol*. 2007;37:963-73.

Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Chang Li X. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood*. 2007;110(7):2501-10.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*. 1992;148:1274–9.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995;270(5238):985–988.

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:207-14.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). [update 2012 Aug; cited 2013 Mar 05]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. FoxP3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol*. 2008;180(11):7112-6.