Beatriz Villas Bôas

Papel das células TCD4⁺FoxP3⁺ (T_{REGULADORAS}) na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Villas-Bôas B. Papel das células TCD4⁺Foxp3⁺ (T_{reguladoras}) na fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo; 2017.

As células T_{REGULADORAS} tem como função central o controle da resposta imune ao próprio, ação demonstrada pelo desenvolvimento de autoimunidade grave nos pacientes que exibem defeitos no gene Foxp3. Além disso, é descrito que essas células exercerem um papel moderador da resposta imune frente a micro-organismos patogênicos. No presente trabalho avaliamos se as células T_{REGULADORAS} CD4⁺Foxp3⁺ (T_{REG}) desempenham um papel importante no início de fase aguda da infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*, período que precede o desenvolvimento da resposta específica ao parasita e no qual se observa uma intensa ativação policlonal não específica dos linfócitos T e B. Em um trabalho anterior do nosso grupo observamos que a remoção de grande parte das células T_{REG} no início da infecção através do tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD25 (PC61) resulta em uma curva de parasitemia que não é diferente à dos animais tratados com anticorpo monoclonal irrelevante. À primeira vista, estes resultados sugerem que as células T_{REG} não operam no controle da resposta inicial ao parasita. Porém, o fato da expressão de CD25 (cadeia alfa do receptor para IL-2) não ser exclusiva desta população celular, torna esses achados inconclusivos. No presente projeto, utilizamos o tratamento com toxina diftérica nos dias 1 e 2 pós-infecção (p.i.) em animais C57BL/6 Foxp3⁺DTReGFP⁺(DEREG) como abordagem alternativa para eliminar esta população de células reguladoras. Este tratamento mostrou-se altamente eficaz, embora temporário, uma vez que as T_{REG} retornam aos valores normais no baço por volta do dia 8 p.i. Contudo, a ausência de T_{REG} nesta janela temporal determina uma breve, mas significativa, redução na parasitemia e um aumento de IFN- γ , assim como uma redução da carga parasitária no coração em uma data posterior. Nosso estudo indica que as células T_{REGULADORAS} desempenham um papel no controle da resposta imune frente aos parasitas no início da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, papel esse que podemos ver refletido na carga parasitária no coração na fase crônica da infecção.

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

ABSTRACT

Villas-Bôas B. Role of TCD4⁺Foxp3⁺ regulatory cells (T_{regulatory}) in the early phase of murine infection with *Trypanosoma cruzi*. 2017. [PhD Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The central function of T_{REGULATORY} cells is the control of the immune response to the self, an action demonstrated by the development of severe autoimmunity in patients with defects in the Foxp3 gene. In addition, it has been described that these cells exert a moderating role of the immune response against pathogenic microorganisms. In the present work, we evaluated whether CD4⁺Foxp3⁺T_{REGULATORY} (T_{REG}) cells play an important role in the early acute phase of murine infection by *Trypanosoma cruzi*, a period that precedes the development of the specific response to the parasite and in which an intense and non-specific polyclonal activation of T and B lymphocytes is observed. In a previous study of our group we observed that the removal of a large number of T_{REG} cells at the beginning of the infection by treatment with anti-CD25 (PC61) monoclonal antibody results in a parasitemia curve that is not different to that of mice treated with irrelevant control monoclonal antibody. At first glance, these results suggest that T_{REG} cells do not operate in controlling the initial response to the parasite. However, the fact that CD25 expression (IL-2 receptor alpha chain) is not unique to this cell population, makes these findings inconclusive. In the present project, treatment with diphtheria toxin on days 1 and 2 post-infection (p.i.) in C57BL/6Foxp3⁺DTReGFP⁺ (DEREG) animals was used as an alternative approach to eliminate this population of regulatory cells. This treatment proved to be highly effective, although temporary, since the T_{REG} return to normal spleen values around 8 p.i.. T_{REG} absence in this time window results in a brief but significant reduction in parasitemia and an increase in IFN-γ as well as a reduction of the parasite load at the heart at later time points. Our study indicates that T_{REGULATORY} cells play a role in controlling the immune response to parasites at the beginning of *Trypanosoma cruzi* infection, a role that can be seen reflected in parasite load in the heart in the chronic phase of infection.

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

1 INTRODUÇÃO

O *T. cruzi* é capaz de infectar diversas espécies de diferentes ordens, e entre eles, o ser humano. Na principal forma de infecção do hospedeiro mamífero, o parasita é transmitido por hemípteros hematófagos da família *Reduviidae*, que carregam o parasita no tubo digestório. Após sugar o sangue, o inseto defeca na pele, e os tripomastigotas metacíclicos contidos nas fezes infectam as células próximas ao local da picada se transformando em amastigotas que se multiplicam no meio intracelular. Ao romper as células infectadas, o parasita, transformado novamente em tripomastigota, atinge a corrente sanguínea e espalha-se por todo o

corpo invadindo diferentes células. O inseto vetor é infectado ao alimentar-se do sangue de um mamífero infectado. No estômago do inseto, os tripomastigotas transformam-se em formas replicativas, epimastigotas e esferomastigotas, proliferam e ao alcançar o reto do inseto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicos e completam o ciclo (Brener, 1973; Macedo et al., 2002) (Figura 2). Outras formas de transmissão são a transfusão de sangue, a transmissão congênita, contaminação pela via oral e o transplante de órgãos ou sangue contaminados. (Organização Mundial da Saúde, 2014).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Copyright: TDR/Wellcome Trust

Fonte: WHO.

Na infecção humana pelo *T. cruzi*, há uma fase aguda que persiste em média dois meses, e é geralmente caracterizada pela presença abundante de parasitas no sangue e em vários tecidos. Este período por vezes passa despercebido, entretanto, alguns casos podem apresentar alguns sintomas como febre, mal estar e manifestação clínica no local da entrada do parasita. Essa fase é seguida por uma longa fase crônica caracterizada por níveis baixos, subpatentes de parasitemia que persistem por toda a vida do indivíduo. Nesta fase crônica, é frequente a ausência de sintomas (fase indeterminada), entretanto entre 20-30% das pessoas infectadas progridem para doença clínica com envolvimento cardiovascular e/ou digestivo (Dias et al., 1956; Macedo et al., 2002; Junqueira et al., 2010).

O *T. cruzi* é um parasita dotado de ampla heterogeneidade. Através da análise de proteínas e marcadores genéticos, seis grupos foram descritos, sendo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II os mais estudados. (Zingales et al., 2009). A cepa Y, pertencente ao grupo genético II de *T. cruzi* constitui uma das cepas mais utilizadas nos modelos experimentais de infecção em camundongos e ratos. Possui alta virulência e comportamento reticulotrópico, ou seja, tem preferência por células do sistema retículo-endotelial (Silva, 1953). Esta cepa induz altos níveis de parasitemia e mortalidade na maioria das linhagens de camundongos (Sardinha et al., 2006). No entanto, os camundongos da linhagem C57BL/6 são relativamente resistentes (Costa et al., 2006; Graefe et al., 2006) e conseguem sobreviver a inóculos de até 1000 tripomastigotas. Nas primeiras semanas de infecção por parasitas desta cepa de *T. cruzi* observa-se um quadro de miocardiopatia aguda. Contudo, na linhagem C57BL/6, o parasita acaba sendo controlado no coração, de tal forma que, na fase crônica, os níveis de miocardite são muito baixos ou até mesmo inexistentes.

1.2 Resposta imune frente ao parasita

Ao longo das primeiras semanas da infecção, a ativação da resposta imune inata e adaptativa frequentemente permite o controle do parasita. No entanto, este é um controle não-estéril, os pacientes entram na fase crônica, em que um pequeno número de parasitas persiste em tecidos e, ocasionalmente, tem acesso ao sangue, onde podem ser detectados por métodos de amplificação, como PCR, por exemplo. Os elementos imunológicos que contribuem para o controle dos parasitas têm sido estudados em detalhe, na sua maioria no modelo de camundongos. No que diz respeito a resposta inata, TLRs (Bafica et al., 2006), NODs (Silva et al., 2010) e inflamassomas (Gonçalves et al., 2013) estão envolvidos na detecção de *T. cruzi* por células da linhagem monocítica, um processo que resulta na produção de citocinas inflamatórias e controle parcial do parasita. Mais adiante, a ativação de uma forte resposta humoral anti-*T. cruzi*, que consiste principalmente em subclasses de IgG com altas propriedades de opsonização e ativação do complemento, permite o controle de formas tripomastigotas extracelulares (Brodskyn et al., 1988). Enquanto as células CD8⁺ específicas ao parasita são importantes para o controle das células estruturais infectadas (Tarleton et al., 1992), tanto células CD4⁺ e CD8⁺ permitem, através da secreção de IFN- γ , uma otimização das atividades efetoras de fagócitos

mononucleares, que destroem rapidamente o parasita ingerido por produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gazzinelli et al., 1992).

O desenvolvimento da resposta imune específica para o *T. cruzi* é um processo que requer tempo para ser eficaz. No entanto, nos primeiros dias da infecção murina pelo *T. cruzi*, semelhante ao que ocorre em infecções por muitos outros microorganismos, tais como protozoários (Greenwood, 1974); (Rosenberg, 1978), vírus (Coutelier et al., 1990); (Li et al., 1990; Hunziker et al., 2003), bactérias (Sultzer, 1978) e mesmo helmintos (Lopes et al., 1990), ocorre uma intensa proliferação no baço de células B e T (Ortiz-Ortiz et al., 1980) ocorrendo a produção de anticorpos com diferentes especificidades. Esta é uma reação imune inesperada, na medida em que os linfócitos expandidos e os anticorpos secretados exibem especificidades não relacionadas ao parasita (Minoprio et al., 1988). Esta estimulação não específica, a qual foi chamada ativação policlonal, ocorre num período de tempo em que o *T. cruzi* atinge um elevado número no sangue e nos tecidos. A proliferação de células T e B policlionalmente ativadas é seguida por uma fase de contração, com morte celular significativa. Além disso, quando a resposta específica anti-*T. cruzi* de células T e B determina uma forte redução da carga de parasita (Alvarez et al., 2014), a resposta da ativação policlonal diminui para níveis muito baixos, que persistem na fase crônica (d'Imperio Lima et al., 1986). Até o presente momento, não há nenhuma informação clara do que sinaliza o sistema imune para a ativação policlonal, ou sobre o impacto deste processo sobre o parasita. Enquanto diferentes moléculas do *T. cruzi* foram propostas como candidatos para mitógenos para a ativação policlonal (Reina-San-Martin et al., 2000), pouco se sabe no que diz respeito ao papel desse processo na evolução da infecção. No entanto, como a ativação policlonal inclui clones de células B e T auto-reativos, tem-se especulado que eles podem desempenhar um papel prejudicial para o hospedeiro, contribuindo para a auto-imunidade, um problema já tido como controverso na fase crônica da doença de Chagas (Leon, Engman, 2003).

Entre os mecanismos que regulam a resposta imune ao parasita, além dos que atuam no controle através da resposta inata (tais como IL-10 e TGF- β) (Gazzinelli et al., 1992), um grande esforço tem sido dado para investigar o papel das células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ (T_{REG}) na infecção humana (de Araujo et al., 2011; de Araujo et al., 2012) e experimental pelo *T. cruzi* (Kotner, Tarleton, 2007).

Neste projeto nós analisamos mais profundamente o envolvimento destas células na fase aguda da infecção murina pelo *T. cruzi*.

1.3 Células T_{REGULADORAS}

Um grande destaque tem sido dado a uma subpopulação de células T nos últimos 20 anos, as células T_{REGULADORAS} (T_{REG}) que estão ausentes em animais timectomizados no período neonatal (Sakaguchi et al., 1982). Essas células têm a capacidade de conter respostas excessivas ou prejudiciais a antígenos próprios ou patógenos. Em 1995, a molécula CD25 foi identificada como marcador de células T_{REG} por Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi et al., 1995). Foi observado que camundongos *nude* ao receberem células esplênicas através de transferência, nas quais as células CD25⁺ haviam sido eliminadas, apresentavam evidências sorológicas e histológicas de doença autoimune, a qual era prevenida pela co-transferência de um pequeno número de células TCD4⁺CD25⁺. Demonstrou-se mais recentemente, que o fator de transcrição Foxp3 é necessário tanto para o desenvolvimento quanto para função de células T_{REG}, passando a ser um marcador exclusivo destas células (Fontenot et al., 2003).

As células T_{REGULADORAS} são divididas em duas populações, as células T_{REG} tímicas e as células T_{REG} geradas na periferia. As células T_{REG} geradas no timo foram inicialmente descritas como uma população capaz de atuar prevenindo a expansão de linfócitos autorreativos e o desenvolvimento da resposta autoimune (Belkaid, 2008). As populações de células reguladoras que são geradas na periferia têm sido descritas em respostas imunes de diversas naturezas (Kingsley et al., 2002). 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. Atualmente acredita-se que a tolerância periférica seja ativamente sustentada tanto por células T_{REG} CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Sakaguchi, 2005), produzidas no timo, como também produzidas na periferia (Apostolou et al., 2002). As T_{REG} adaptativas atuam *in vivo* através de secreção de citocinas (Chatenoud et al., 1997; Maloy, Powrie, 2001; Barrat et al., 2002). Foi demonstrado que a indução de tolerância oral e a prevenção de doenças autoimunes mediada por células Th1 era associada com a geração de células T secretoras de TGF-β no intestino (Chen et al., 1994). Essas células foram chamadas

de células Th3. Um estudo de 1997 (Groux et al., 1997) mostrou que a estimulação repetida *in vitro* de células T isoladas, na presença de IL-10, resultava na expansão de uma população de células T reguladoras, que produziam grandes quantidades de IL-10 e eram capazes de suprimir respostas mediadas por células Th1; essas células foram chamadas de Tr1. Em várias infecções, tais como malária murina, as células Tr1 são as principais responsáveis pela produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Vigario et al., 2007). As células T_{REG} geradas na periferia podem possuir muitas das características presente nas células T_{REG} tímicas, mas também podem divergir em marcadores de superfície celular e características funcionais, além da ausência da expressão do fator de transcrição Foxp3 (Bluestone, Abbas, 2003).

As células T_{REG} possuem expressão de diversos marcadores e que compõem o chamado perfil molecular e 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, por ser intracelular, não pode ser usado em humanos para isolar células T_{REGs} para estudos funcionais. Com isso, estudos foram feitos na tentativa de identificar marcadores extracelulares que poderiam ser utilizados para este fim.

Um exemplo é a molécula ICOS. Foram descritas, recentemente, as células T reguladoras foliculares (CD4⁺CXCR5⁺FoxP3⁺), que são células T_{REG} com altos níveis de expressão de ICOS e que estão presentes nos centros germinativos e atuam modulando a interação entre células T_{FH} e B (Sage et al., 2013). Löhning e colaboradores (Löhning et al., 2003) caracterizaram num trabalho publicado em 2003 que existia uma correlação entre níveis de expressão de ICOS em células ICOS⁺ *ex vivo* e os níveis de citocinas produzidos. Assim, células TCD4⁺ que possuíam 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 estariam relacionados com a síntese de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Correlacionando a esta informação, foi visto que alguns tipos de T_{REG} parecem 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 a GITR cancelava a atividade supressora destas células. A expressão desse marcador não se limita às células T_{REG}, uma vez que as células T *naive* mostram aumento na expressão após ativação (Shimizu et al., 2002). O ligante de GITR (GITRL) é expresso em células endoteliais, APC, macrófagos e células B (Kim et al., 2010). Estímulos pró-inflamatórios são capazes de induzir a expressão do ligante 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).

Células T_{REG} de camundongos expressam constitutivamente um membro da superfamília TNF, o OX40. Essa molécula também é expressa em células TCD4⁺FoxP3⁻, após estimulação antigênica. Nesta última população, a molécula OX40 possui um papel importante na expansão, função e sobrevivência celular (Ruby et al., 2009), enquanto que nas células T_{REG} este marcador parece ter relação com a perda da capacidade supressora, além de atuar sobre a conversão de células TCD4⁺FoxP3⁻ em TCD4⁺FoxP3⁺. Estudos foram realizados para avaliar se a estimulação das células T_{REG} tímicas através de OX40 resultaria numa alteração sobre 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} provenientes de camundongos em que OX40 era ausente, 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- β , 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 TCD4⁺FoxP3⁻ em TCD4⁺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).

Um dos mecanismos de supressão mediado pelas células T_{REG} atua através da captação de IL-2 por meio da ligação à molécula CD25 (cadeia alfa do receptor para IL-2), privando assim as células $CD4^{+}FoxP3^{-}$ desta citocina, importante para a proliferação celular (Tai et al., 2012). As células T_{REG} necessitam de IL-2 para sua sobrevivência, mas não são capazes de produzir essa citocina tão essencial e consomem a IL-2 produzida por células $CD4^{+}FoxP3^{-}$. Para avaliar o papel da IL-2 sobre a função das células reguladoras, foram realizados estudos *in vitro* nos quais se observou que a adição de células $CD4^{+}FoxP3^{+}$ a uma cultura de células $CD4^{+}FoxP3^{-}$ em ambiente favorável à produção de IL-2, resultou na supressão das células $CD4^{+}FoxP3^{-}$. No entanto, o mesmo resultado não foi obtido quando essas duas populações eram separadas através de uma membrana semipermeável impossibilitando o contato direto entre as duas populações, 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).

Em condições inflamatórias, mediadores purinérgicos como o ATP e adenosina, são liberados no meio extracelular servindo como sinais de inflamação. Um mecanismo regulador desta resposta é a atuação de um membro da E-NTPDases (CD39) e a Ecto-5-nucleotidase (CD73) responsáveis por catalisar nucleotídeos extracelulares. CD39 e CD73 são altamente expressas na superfície de células $T_{REGULADORAS}$ e são consideradas marcadores desta população. A enzima CD39 atua através da hidrólise de ATP em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) (Dwyer et al., 2007), enquanto o CD73 é responsável pela hidrólise do ADP/AMP em adenosina (Antonioli et al., 2013).

1.4 As células $T_{REGULADORAS}$ em infecções por microorganismos

Além das células T reguladoras terem como função o controle da resposta imune ao próprio, função está demonstrada em pacientes com síndrome IPEX, que desenvolvem autoimunidade grave devido a defeitos no gene *Foxp3* (Bennett et al., 2001), foi demonstrado em humanos e modelos experimentais que as células T_{REG}

também podem exercer um papel moderador da resposta imune frente a micro-organismos patogênicos (Corthay, 2009) ou comensais (Dembic, 2008). No modelo murino, Belkaid e colaboradores (Belkaid et al., 2002) mostraram que células T_{REG} acumulam-se no local de infecção por *Leishmania major* suprimindo a capacidade efetora das células $CD4^{+}FoxP3^{-}$ na eliminação do protozoário. Após a remoção dessas células foi visto um aumento da resposta imune, levando a uma completa erradicação do parasita no local da infecção. Também é descrito que as células T_{REG} suprimem a patologia resultante da resposta imune contra determinados microrganismos, ou seja, a ação efetora linfocitária causadora de lesão tecidual (Hori et al., 2002).

1.4.1 As células $T_{REGULADORAS}$ 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, Tarleton, 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 no controle da patologia. Mais recentemente, o nosso grupo de pesquisa tem avaliado as mudanças na população de células $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ (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 $CD4^{+}$ efetoras ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{-}$) (Pretel, 2009; Villas-Bôas, 2013). Além disso, confirmando os resultados dos trabalhos acima citados (Kotner, Tarleton, 2007), 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 de parasitemia ou na patologia da fase aguda em relação aos animais tratados com monoclonal irrelevante. Com isso, 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} . Foi demonstrado que a atividade supressora das células T_{REG} é bloqueada por agonistas de TLR, que estimulam as células dendríticas a secretar IL-6 que por sua vez torna as células *T naive* refratárias aos sinais das células T_{REG} (Pasare, Medzhitov, 2003). Em 2006

esses resultados foram ampliados quando um grupo mostrou que a administração de um agonista de TLR2, além de tornar as células TCD4⁺FoxP3⁻ resistentes à supressão pelas T_{REG}, determina uma perda transitória da atividade supressora das T_{REG} com diminuição da indução de mRNA para FoxP3 (Liu et al., 2006). Uma vez que diferentes moléculas TLR (inclusive TLR2) participam na detecção do *T. cruzi* pelas células da imunidade inata (Bafica et al., 2006) e 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.

Como citado acima, experiências do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa, incluindo o nosso, mostraram que o tratamento com anti-CD25 no início da infecção pelo *T. cruzi* não determina grandes mudanças na evolução da infecção e no quadro patológico de miocardiopatia aguda. A princípio, estes resultados poderiam sugerir, ora a não participação das T_{REG} no controle do *T. cruzi*, ora a perda transitória da capacidade supressora dessas células, possibilidade esta última que foi descartada ao verificarmos que as células T_{REG} isoladas dos camundongos infectados por sete dias mantém sua capacidade supressora *ex vivo* (Villas-Boas, 2013). Contudo, uma terceira possibilidade poderia explicar a ausência de mudanças pelo tratamento com anti-CD25, se consideramos que a molécula CD25 (a cadeia alfa do receptor de IL-2) não é unicamente expressa pelas células T_{REG}, mas também por células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como por outras populações celulares, tais como células B e células NK (Mauri et al., 2003; Jiang, Chess, 2004; Tang et al., 2005). Desta forma, o tratamento com monoclonal anti-CD25 utilizado pelo nosso grupo e outros grupos de pesquisa para eliminar as T_{REG}, pode ter afetado a proliferação/ativação de outras populações celulares, questionando a confiabilidade às conclusões obtidas através dessa abordagem.

Desta forma, sabendo que as células T_{REGULADORAS} estão operantes (mantém sua atividade funcional preservada) na fase aguda da infecção murina pelo *T. cruzi* é de extrema importância, para a resolução do dilema sobre a participação dessas células na infecção pelo *T. cruzi*, utilizar outro modelo onde seja possível uma eliminação seletiva das células T_{REGULADORAS}. No presente doutorado, a existência de uma linhagem de camundongos que possui o receptor da toxina diftérica ligado ao promotor do gene Foxp3 (que foi gentilmente cedido pela Prof(a). Dr(a). Vera Calich), nos oferece a possibilidade de uma abordagem alternativa e eficaz para

eliminar esta população, possibilitando o estudo do papel das células reguladoras na fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*.

1.5 Animais DEREK

Como já descrito previamente tanto a molécula CD25, devido a sua expressão em outros subtipos celulares, como o fator de transcrição Foxp3, devido a sua localização intracelular, não constituem alvos adequados para a eliminação das T_{REG} através do tratamento com anticorpos. Desse modo, torna-se necessário a identificação de outra metodologia para eliminação *in vivo* das células T_{REGULADORAS}. No presente projeto, utilizamos camundongos DEREK (sigla originada do termo em inglês “Depletion of regulatory T cells”) que quando tratados com toxina diftérica eliminam seletivamente esta população de células reguladoras.

Camundongos DEREK (Lahl et al., 2007) foram criados através da inserção de um cromossomo artificial bacteriano (BAC), que contem a sequência gênica do receptor da toxina diftérica (DTR) ligado à sequência gênica da proteína GFP (“Green fluorescent protein”) sob o controle do promotor de Foxp3. Esta construção permite, além da identificação das células T reguladoras, a possibilidade de depleção específica destas células através do tratamento dos animais com a toxina diftérica. Desta forma, diferentemente dos animais C57BL/6Foxp3⁺eGFP⁺, previamente utilizados por nosso grupo de pesquisa, os quais servem exclusivamente para identificar a população de células T_{REGULADORAS}, os animais DEREK permitem, após o tratamento com a DT, uma eficiente e seletiva depleção de células Foxp3⁺GFP⁺.

Contudo, a eliminação das células T_{REGULADORAS} neste modelo é transitória (Lahl, Sparwasser, 2011), uma vez que oito dias após o início do tratamento com DT observa-se o retorno das células T_{REGULADORAS} a sua frequência inicial, retorno que pode ser visto tanto no sangue quanto em órgãos como, por exemplo, linfonodos e baço. A transitoriedade da depleção das células T_{REG} oferece, entretanto uma vantagem, uma vez que a recuperação destas células permite que os animais se mantenham a salvo do desenvolvimento de autoimunidade (Lahl et al., 2007; Berod et al., 2014; Mayer et al., 2014). Ainda não é sabido se as células que retornam são oriundas da conversão de células T convencionais ou originadas no timo, e quais as

características dessas células referentes tanto a sua função supressora quanto a expressão de marcadores pertencentes ao seu perfil molecular.

Alguns trabalhos utilizaram esse modelo animal de depleção das células T_{REG} como ferramenta para avaliar aspectos da resposta imune frente a infecções por microorganismos. Um estudo utilizando o vírus sincicial respiratório (VSR), um patógeno que afeta o trato respiratório, mostrou que a eliminação dessas células resulta num aumento da severidade da doença nos camundongos DERE_G infectados e tratados (Christiaansen et al., 2014). Outro trabalho (Rausch et al., 2009) mostrou que animais DERE_G infectados com nematódeos, ao serem tratados com toxina diftérica, apresentavam um aumento da resposta Th2, com produção aumentada de IL-4 e IL-13 que tem ação frente ao parasita; além disso, um aumento da patologia nos locais de infecção foi também observado, mostrando a importância das células T_{REG} no controle da resposta imune exacerbada durante a infecção.

Com isso, a utilização deste modelo animal como uma alternativa para eliminar as T_{REG} na infecção aguda pelo *T. cruzi* se torna um importante alvo de estudo, e deve permitir, não somente uma maior compreensão dos elementos envolvidos no início da infecção por este protozoário, mas permitirá verificar se esta população linfocitária constitui um possível alvo terapêutico.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a eliminação das células T_{REGULADORAS} possui um impacto importante na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, indicando que as células T_{REGULADORAS} possuem papel no controle da resposta imune frente aos parasitas no início da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Isto foi concluído considerando que a eliminação das células T_{REG} determina queda na parasitemia, aumento da produção de IFN- γ e da frequência de blastos CD4⁺, aumento da expressão de marcadores de ativação nas células CD4⁺Foxp3⁻ e diminuição da carga parasitária no coração.

REFERÊNCIAS*

- Alvarez JM, Fonseca R, Borges da Silva H, Marinho CR, Bortoluci KR, Sardinha LR, Epiphany S, D'Imperio Lima MR. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:912965.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(6):355-67.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*. 2002;3(8):756-63.
- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006;177(6):3515-9.
- 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(5):603-16.
- Baru AM, Ganesh V, Krishnaswamy JK, Hesse C, Untucht C, Glage S, Behrens G, Mayer CT, Puttur F, Sparwasser T. Absence of Foxp3+ regulatory T cells during allergen provocation does not exacerbate murine allergic airway inflammation. *PLoS One*. 2012;7(10):e47102.
- Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):918-21.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.
- 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(1):20-1.
- Berod L, Stuve P, Varela F, Behrends J, Swallow M, Kruse F, Krull F, Ghorbani P, Mayer CT, Holscher C, Sparwasser T. Rapid rebound of the Treg compartment in DERE mice limits the impact of Treg depletion on mycobacterial burden, but prevents autoimmunity. *PLoS One*. 2014;9(7):e102804.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):253-7.

Boehm F, Martin M, Kesselring R, Schiechl G, Geissler EK, Schlitt HJ, Fichtner-Feigl S. Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:97.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.

Brodskyn CI, da Silva AM, Takehara HA, Mota I. Characterization of antibody isotype responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett.* 1988;18(4):255-8.

Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol.* 1997;158(6):2947-54.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265(5176):1237-40.

Christiaansen AF, Boggiatto PM, Varga SM. Limitations of Foxp3(+) Treg depletion following viral infection in DREG mice. *J Immunol Methods.* 2014;406:58-65.

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

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

Coutelier JP, Coulie PG, Wauters P, Heremans H, van der Logt JT. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J Virol.* 1990;64(11):5383-8.

d'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1986;137(1):353-6.

de Araujo FF, Correa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 2012;217(8):768-77.

de Araujo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, Otavio Costa Rocha M, Eloi-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e992.

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

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 1956;14(6):1035-60.

Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 2007;3(1-2):171-80.

Espinoza Mora MR, Steeg C, Tartz S, Heussler V, Sparwasser T, Link A, Fleischer B, Jacobs T. Depletion of regulatory T cells augments a vaccine-induced T effector cell response against the liver-stage of malaria but fails to increase memory. *PLoS One*. 2014;9(8):e104627.

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

Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2002;32(2):167-70.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2501-6.

Goncalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, Rodrigues MM, Alvarez JM, Bortoluci KR. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2469.

Graefe SE, Streichert T, Budde BS, Nurnberg P, Steeg C, Muller-Myhsok B, Fleischer B. Genes from Chagas susceptibility loci that are differentially expressed in *T. cruzi*-resistant mice are candidates accounting for impaired immunity. *PLoS One*. 2006;1:e57.

Greenwood BM. Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet*. 1974;1(7855):435-6.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.

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(5):1282-91.

Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections. *Nat Immunol*. 2003;4(4):343-9.

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(6716):263-6.

Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1198-208.

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

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(5):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(3):1080-6.

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(2):861-9.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*. 2007;204(1):57-63.

Lahl K, Sparwasser T. In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol*. 2011;707:157-72.

Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci*. 2003;8:e315-22.

Li X, Hu B, Harty J, Even C, Plagemann PG. Polyclonal B cell activation of IgG2a and IgG2b production by infection of mice with lactate dehydrogenase-elevating virus is partly dependent on CD4+ lymphocytes. *Viral Immunol*. 1990;3(4):273-88.

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 U S A*. 2006;103(18):7048-53.

Lohning 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(2):181-93.

Lopes LM, Pereira MA, Gerken SE, Vaz N. Polyclonal activation of B lymphocytes during experimental infection with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1990;100 Pt 1:83-91.

Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2002;4(5):1-16.

Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001;2(9):816-22.

Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira 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(7):825-33.

Marks E, Verolin M, Stensson A, Lycke N. Differential CD28 and inducible costimulatory molecule signaling requirements for protective CD4⁺ T-cell-mediated immunity against genital tract *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun.* 2007;75(9):4638-47.

Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003;197(4):489-501.

Mayer CT, Ghorbani P, Kuhl AA, Stuve P, Hegemann M, Berod L, Gershwin ME, Sparwasser T. Few Foxp3(+) regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):2990-3002.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988;28(5):553-61.

Nihei J, Cardillo F, Dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho L, Mengel J. Administration of a nondepleting anti-CD25 monoclonal antibody reduces disease severity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014;4(2):128-37.

Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol.* 2007;37(5):1165-9.

Ortiz-Ortiz L, Parks DE, Rodriguez M, Weigle WO. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1980;124(1):121-6.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353-62.

Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299(5609):1033-6.

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.

Rausch S, Huehn J, Loddenkemper C, Hepworth MR, Klotz C, Sparwasser T, Hamann A, Lucius R, Hartmann S. Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3⁺ cells. *Eur J Immunol.* 2009;39(11):3066-77.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000;6(8):890-7.

Rosenberg YJ. Autoimmune and polyclonal B cell responses during murine malaria. *Nature*. 1978;274(5667):170-2.

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(8):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*. 2013;14(2):152-61.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6(4):345-52.

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(3):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(6):1577-86.

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(6):680-8.

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

Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Goncalves LA, Bucci DZ, Marinho CR, Penha-Goncalves C, Lima MR, Alvarez JM. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e578.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):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(2):135-42.

Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, Santiago-Silva J, Kobayashi KS, Flavell RA, Silva JS, Zamboni DS. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2010;184(3):1148-52.

Sultzer BM. Infection with *Bacillus Calmette-Guerin* activates murine thymus-independent (B) lymphocytes. *J Immunol*. 1978;120(1):254-61.

Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, Guintert 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(22):5155-63.

Tang XL, Smith TR, Kumar V. Specific control of immunity by regulatory CD8 T cells. *Cell Mol Immunol*. 2005;2(1):11-9.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992;356(6367):338-40.

Teh CE, Gray DH. Can you rely on Treg cells on the rebound? *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3504-7.

Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*. 1991;146(10):3626-32.

Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood*. 2005;105(7):2845-51.

Villas-Bôas B. Análise fenotípico-funcional das células TCD4⁺Foxp3⁺ (T_{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.

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(8-9):963-73.

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

WHO, "Chagas disease (American trypanosomiasis)," [update 2014; cited 2016]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051-4.