

FERNANDO DELGADO PRETEL

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 apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

FERNANDO DELGADO PRETEL

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 apresentada ao 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

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Pretel, Fernando Delgado.

Dinâmica das células T reguladoras (T_{REG}) na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* e o seu eventual envolvimento na patologia cardíaca na fase crônica / Fernando Delgado Pretel. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jose Maria Alvarez Mosig.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia Celular, Imunologia das parasitoses.

Versão do título para o inglês: Dynamics of regulatory T cells (T_{REG}) in the murine infection by *Trypanosoma cruzi* and its eventual involvement in the chronic cardiac pathology .

Descritores: 1. *Trypanosoma cruzi* (estudo) (imunologia) 2. Doença de chagas em animal 3. Imunologia celular 4. Linfócitos T (regulação) 5. Cardiopatias I. Mosig, Jose Maria Alvarez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0177/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernando Delgado Pretel.

Título da Tese: Dinâmica das células T reguladoras (T_{REG}) na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* e o seu eventual envolvimento na patologia cardíaca na fase crônica.

Orientador(a): Jose Maria Alvarez Mosig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A Elizete, pela convivência, parceria e paciência que tornaram possível a realização desse trabalho, e aos meus meninos, Gabriel e Luan, que tanto me estimulam, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer imensamente...

Ao Pepe, por tudo que me ensinou (desde quando fui seu monitor PAE), tanto em relação a ciência quanto ao modo de encarar a vida. Agradeço também pela forma amigável como sempre fui tratado e todo o incentivo que me foi dado. Valeu, Pepe!!!

À Regina pelas palavras de incentivo e pelas conversas agradáveis.

Aos membros da Banca de Qualificação, Niels, Marcelo de Franco e Ises, pela grande ajuda prestada.

Aos amigos com quem pude contar nos momentos de aperto e com quem também desfrutei momentos de alegria, Luizão, Rogério, Cláudia e Claudio.

A Alexandra, Ana Paula, André, Christian, Cláudio, Karina, Lara, Meire, Pablito, Rosa, Renato, Ricardo, Sandrinha, Sheila e Tainá, pelo bom convívio nesses anos.

Aos amigos de outros laboratórios, Ana Eliza, Érica, Esther, Francisco, Gizele, Grandão (Alex), Ivo, Jean, Juliana, Julieta, Leuridan, Lucas, Luciana, Matheus, Rafa, Richardt e Zé Antônio.

Aos professores da Imuno pelas ótimas aulas proferidas, Pepe, Vera, Momtchillo, Barbuto, Regina, Lourdes, Niels, Rizzo, Sonia, Ises e Gustavo.

A grande ajuda e por todo esforço dos amigos do Biotério, Silvia, Regina de Luca, Andréa, Joelma, Sueli, Roberto, Wagner e Dorival.

Aos amigos da portaria, Ailton, Miltão, Nelson, Octacílio, Odair e Robertão.

Ao pessoal que sempre ajudou nas questões burocráticas, Valéria, Jotelma, Eny, Celso e Amarildo (*in memoriam*).

À Delza, Maria José, Renata e Eva pela eficiência com que trabalham na biblioteca.

Moisés, Mário e Andrés (audio-visual) por se esforçarem para tudo correr bem.

À Dona Emília (vovó Emília) por toda assistência e cuidado que teve com os meninos nos momentos em que não pude estar presente.

À minha mãe e meu pai (*in memoriam*) pelo esforço empreendido para a minha educação.

À minha esposa, que por muitos finais de semana e muitas noites, em casa, teve que carregar o piano sozinha.

Aos meus meninos por me encherem de alegria e de força para trabalhar.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A doença de Chagas	17
1.2 O Parasita e os modelos murinos de infecção	18
1.3 A resposta imune ao <i>T. cruzi</i>	20
1.4 Tratamento	23
1.5 A lesão cardíaca crônica decorrente da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	23
1.6 Regulação do Sistema Imune	24
1.7 Caracterização de células T _{REG}	26
1.8 Infecção por <i>T. cruzi</i> e Imunossupressão	27
1.9 Células T reguladoras adaptativas	28
1.10 FoxP3 – marcador exclusivo de T _{REG}	28
1.11 Depleção das células TCD4 ⁺ CD25 ⁺	30
1.12 T _{REG} e <i>T. cruzi</i>	32
2 OBJETIVOS	34
3 ABORDAGEM EXPERIMENTAL	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Camundongos e cepas de <i>T. cruzi</i> utilizadas	39
4.2 Produção e purificação dos anticorpos	39
4.3 Tratamento com anticorpo anti-CD25 (PC61)	40
4.4 Determinação da parasitemia e carga parasitária	41
4.5 Estudo histopatológico	41
4.6 Obtenção de leucócitos do baço e do sangue	41
4.7 Análise de populações por citometria de fluxo	42
4.8 Obtenção do Ag de <i>T. cruzi</i>	43
4.9 Determinação da produção de IFN- γ por células T	43
4.10 Ensaio de Proliferação	43
4.11 Ensaio de Proliferação de esplenócitos totais ou células CD25 ⁻	44
4.12 Citocinas de esplenócitos estimulados com ag (<i>in vitro</i>)	45
4.13 Real Time – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	46

5 RESULTADOS	47
5.1 Fenotipagem de células T _{REG} na fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	47
5.2 Conclusão parcial	55
5.3 Fenotipagem por molécula GITR e CD127	55
5.4 Conclusão parcial	59
5.5 Tratamento <i>in vivo</i> com MoAb PC61: efeito sobre a infecção aguda	60
5.6 Conclusão parcial	70
5.7 Fenotipagem de células T _{REG} na infecção crônica pelo <i>T. cruzi</i>	70
5.8 Conclusão parcial	74
5.9 Proliferação de esplenócitos CD25 ⁻ (ag-específico) <i>in vitro</i>	74
5.10 Conclusão parcial	78
5.11 Lesão cardíaca (animais crônicos) após tratamento com PC61	78
5.12 Conclusão parcial	92
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS*	101

RESUMO

PRETEL, F.D. **Dinâmica das células T reguladoras (TREG) na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* e o seu eventual envolvimento na patologia cardíaca na fase crônica.** 120 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Uma fração considerável de pacientes com doença de Chagas, decorrente da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, desenvolve a cardiopatia crônica, que pode levar a morte. A regulação da resposta imune específica contra o parasita é essencial para controlar a atividade efetora excessiva anti-*T. cruzi*. Na falta dessa regulação, a resposta imune acaba por induzir lesão dos tecidos. Uma vez que, em hipótese, componentes autoimune participam da cardiopatia chagásica, a regulação da resposta poderia ser necessária para controlar a reatividade contra o próprio. Nesta tese, nós avaliamos o envolvimento das células T reguladoras (T_{REG}) em modelo murino de doença crônica de Chagas. Na fase aguda, período em que ocorre uma forte ativação policlonal de linfócitos, observa-se um pequeno aumento no número de células esplênicas CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{REG}, no entanto, um aumento de maior magnitude ocorre nas células efetoras CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻. O tratamento de camundongos na fase aguda da infecção com MoAb anti-CD25 (PC61) resulta em discreta redução no número de células T_{REG}, mas essa não afeta os níveis de parasitemia ou patologia do coração na fase aguda. Na fase crônica, os números de células T_{REG} dos animais crônicos retornam aos mesmos níveis dos observados nos animais não infectados, no entanto, o número de esplenócitos CD4⁺ está discretamente aumentado. O tratamento de camundongos crônicos com PC61 resulta em uma redução no número de células TCD4⁺CD25⁺ e uma tendência à redução no número de células CD4⁺FoxP3⁺. Mais importante, a resposta imune anti-*T. cruzi*, carga parasitária sistêmica e patologia cardíaca não foram consistentemente alteradas nos grupos tratados com PC61 em comparação aos tratados com o controle isotípico ou IgG de rato. O fato do tratamento com MoAb PC61 não modificar a patologia do coração de camundongos crônicos pode ser devido a depleção incompleta das células T_{REG}, ou a um pequeno envolvimento das T_{REG} no controle dos mecanismos efetores anti-*T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Imunologia celular. *Trypanosoma cruzi*. Linfócitos T reguladores. Cardiopatias

ABSTRACT

PRETEL, F.D. **Dynamics of regulatory T cells (T_{REG}) in the murine infection by *Trypanosoma cruzi* and its eventual involvement in the chronic cardiac pathology.** 120 f. Ph. D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A large fraction of patients with Chagas' disease, an illness due to infection by protozoan *Trypanosoma cruzi*, develops chronic myocardopathy that often leads to death. Regulation of parasite-specific immune responses is essential to control excessive anti-*T. cruzi* effector activity that may result in tissue damage. Moreover, because autoimmunity has been hypothesized to contribute to Chagas myocardopathy, regulation could be also necessary to control anti-self reactivity. In this paper we evaluated the involvement of T_{REG} in a murine model of chronic *T. cruzi* infection. In the acute phase, a period when there is strong polyclonal lymphocyte activation, a small increase in the number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ spleen cells (T_{REG}) cells is observed, albeit of considerably lower magnitude than that of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ effector cells. Treatment of acutely-infected mice with anti-CD25 (PC61) mAb results in discrete reduction of T_{REG} cell numbers, but it does not affect parasitaemia levels or acute phase heart pathology. At the chronic phase, T_{REG} cells numbers return to numbers of non-infected mice, in spite that the total number of CD4⁺ splenocytes is discretely increased in chronic mice. Treatment of chronic mice with PC61 results in a reduction in TCD4⁺CD25⁺ cell numbers, but in a small, non significant reduction in total CD4⁺FoxP3⁺ cells. More important, the anti-*T. cruzi* immune response, systemic parasite load and heart pathology were not consistently altered in PC61-treated chronic mice compared to mice treated with isotypic control antibodies or normal rat IgG. Failure to modify heart pathology in PC61-treated chronic mice could be due to incomplete T_{REG} depletion or to discrete involvement of T_{REG} in control of the anti-*T. cruzi* effector mechanisms.

Key words: Chagas disease. Cellular Immunology. Trypanosoma cruzi. Regulatory T cells. Cardiopathology.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma parasitose decorrente da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum*), endêmico do continente latino-americano com exceção das nações do caribe (CHAGAS, 1909; TANOWITZ *et al.*, 2009). A transmissão do parasita ao homem acontece, na maior parte das vezes, no momento do repasto do inseto vetor, *Triatoma* sp, quando as fezes contaminadas pelo protozoário entram em contato com a mucosa ou pele lesada (KRETTLI, 1999; SOARES *et al.*, 2001).

Em abril de 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. Seu agente causal, o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), em homenagem ao mestre Oswaldo Cruz, e o inseto que o transmitia (triatomíneos conhecidos como “barbeiros”, dentre os quais se destaca o *Triatoma infestans*), também haviam sido por ele identificados, ao final de 1908. O “feito” de Chagas, considerado único na história da medicina, constitui um marco decisivo na história da ciência e da saúde brasileiras (CHAGAS, 1909; KROPF, 2005). Apesar de ter sido descrita há cem anos, pelo pesquisador Carlos Chagas (1878-1934), ela continua a representar um dos desafios mais significativos para a saúde pública na América Latina. (GASCON *et al.*, 2008)

A doença ainda é uma das conseqüências das baixas condições socioeconômicas da América Latina (RAMSEY *et al.*, 2005; DUTRA; GOLLOB, 2008) e más condições de moradia estão diretamente relacionadas a uma maior prevalência domiciliar do *Triatoma infestans* e, em decorrência disso. Nos últimos anos a situação de transmissão tem mudado consideravelmente devido ao sucesso nos programas de controle dos vetores. A infecção pelo *T. cruzi*, além de ocorrer no momento em que o vetor contaminado faz o repasto, como dito anteriormente, se dá pela via congênita ou pela transfusão de sangue ou ingestão de alimentos contaminados (LEIBY *et al.*, 2002; STEINDEL *et al.*, 2008). A prevalência da doença reduziu de 16-18 milhões de pessoas infectadas em 1990 para 9 milhões em 2006 segundo dados da Organização Mundial da Saúde (SCHOFIELD *et al.*, 2006).

Entretanto, paradoxalmente, e como consequência da emigração dos indivíduos residentes das áreas endêmicas, um número cada vez maior de doentes é detectado na Europa e Estados Unidos.

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas pode ser caracterizada de acordo com o quadro clínico do hospedeiro infectado em três fases: a aguda, a indeterminada e a crônica (SOARES *et al.*, 2001). O início da infecção é frequentemente caracterizado por uma fase aguda que se entende por até 2-3 meses. Nesta fase, observam-se altos níveis de parasitemia e parasitismo tissular. Clinicamente, o hospedeiro apresenta febre, mal-estar geral, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, inchaço no local de entrada do parasita (chagoma de inoculação) e, mais raramente, sintomas de miocardite e meningoencefalite que podem ser fatais, principalmente em crianças (KRETTLI, 1999). Após a fase aguda, seguem-se a fase indeterminada (DIAS *et al.*, 1956) e, eventualmente, a fase crônica (DIAS, 1989), nas quais os protozoários não são mais encontrados pela análise de parasitemia direta do sangue, segundo a técnica de Brener (BRENER, 1962). Nestas fases, a detecção do parasita só é possível por técnicas mais sensíveis, como o xenodiagnóstico, a hemocultura ou a amplificação enzimática do DNA do parasito (BRENER, 1980; CHIARI *et al.*, 1989; GUHL *et al.*, 2000). Na fase indeterminada, os pacientes não apresentam nenhum tipo de manifestação clínica, mas em 20-30% dos casos há uma evolução para a fase crônica, que pode ocorrer em poucos meses ou em décadas (PINTO DIAS, 1995; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2006). Apesar dos níveis de parasitas serem drasticamente reduzidos, é durante a fase crônica que ocorre um agravamento do quadro clínico da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 1956). Na maioria dos casos, esse agravamento do quadro clínico consiste em uma miocardite crônica que, freqüentemente, determina cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e/ou arritmia que podem causar a morte do paciente (HIGUCHI *et al.*, 2003). Em outros casos, a doença crônica apresenta uma forma digestiva, com sintomas decorrentes dos quadros de magacolon ou megaesôfago (TEIXEIRA *et al.*, 1975). No trato digestivo, parte das lesões ocorrem nos neurônios aferentes, eferentes e centrais do

sistema simpático ou parassimpático (JUNQUEIRA JUNIOR et al., 1992; DE OLIVEIRA et al., 1998).

1.2 O Parasita e os modelos murinos de infecção

O protozoário possui um complexo ciclo de vida e existe, no mínimo, em três formas morfológicas distintas: tripomastigota metacíclico ou tripomastigota do sangue infectante, que é a forma infectante; epimastigotas (ocorre no inseto) e amastigota, forma replicativa que ocorre no interior de uma variedade de células de mamíferos (BRENER, 1973). As formas tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares, como fagócitos monocucleares, fibras musculares e fibroblastos. Inicialmente formam vacúolos parasitóforos, onde podem ser mortas por mecanismos citotóxicos ou evadir a esses e passar para o citoplasma, onde se transformam em amastigotas (BRENER, 1973; VICKERMAN, 1985; BURLEIGH; ANDREWS, 1995). Após 9 ciclos de divisão binária, as formas amastigotas diferenciam-se novamente em formas tripomastigotas com alta motilidade, sendo liberadas para o exterior das células após a ruptura destas, alcançando a circulação sanguínea e disseminando a infecção (DVORAK; HYDE, 1973; KRETTLI, 1999).

Uma notável característica do *T. cruzi* é sua heterogeneidade biológica e bioquímica. Os parasitas apresentam diferenças notáveis no seu crescimento, tropismo tissular, composição antigênica e virulência, bem como uma diferente susceptibilidade à quimioterapia e na sua resistência a alguns dos mecanismos da resposta imune (ALCANTARA; BRENER, 1978; SOUTO-PADRON et al., 1990; MARTINEZ-DIAZ; ESARIO et al.; 2001; CORTEZ et al., 2006).

A cepa Y de *T. cruzi* pertence ao grupo genético II de *T. cruzi*, que mais freqüentemente está envolvido na infecção peridomiciliar, e constitui uma das cepas mais utilizadas nos modelos experimentais de infecção em camundongos e ratos (SILVA, 1953). Esta cepa induz altos níveis de parasitemia e mortalidade na maioria das linhagens de camundongo (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 sanguíneas. Na fase crônica da infecção causada pela cepa Y de *T. cruzi*, independentemente da linhagem de camundongo, os níveis de miocardite e miosite são muito baixos ou até mesmo inexistentes.

O parasita Sylvio X10/4 constitui um clone de *T. cruzi* que é normalmente mantido em cultura de células “in vitro”. Este parasita pertence ao grupo genético I, freqüentemente envolvido no ciclo selvático de infecção, e foi isolado de um triatomídeo utilizado no xenodiagnóstico em um paciente do Pará, Brasil (SILVEIRA *et al.*, 1979). Trabalhos realizados em nosso laboratório mostram que este parasita não induz parasitemias patentes em camundongos imunocompetentes, mas induz níveis elevados de parasitemia no camundongo knockout para interferon gama (IFN- γ -KO) e Balb/C nude (MARINHO *et al.*, 2007). No camundongo C57BL/6, a infecção por 10^5 formas de *T. cruzi* Sylvio X10/4 induz níveis discretos de miocardite, com escassos ninhos, por volta do dia 18 pós-infecção, enquanto que no camundongo IFN- γ -KO, ocorre patologia intensa e precoce no coração e músculo esquelético com destaque para um alto número de ninhos de amastigotas (MARINHO *et al.*, 2007). Apesar de se tratar de um parasita aparentemente pouco virulento para o animal imunocompetente, trabalhos do nosso laboratório têm mostrado que a cepa X10/4 de Sylvio de *T. cruzi* induz na linhagem de camundongos C3H/HePAS uma miocardite crônica intensa que apresenta características similares à miocardite crônica da doença de Chagas humana (MARINHO *et al.*, 2004).

A definição dos elementos do sistema imune envolvidos no controle do parasita tem sido estabelecida em infecções murinas por parasitas de alta virulência que induzem, na fase aguda, intensas parasitemias e alta incidência de mortalidade. Apesar das suas inequívocas contribuições, este modelo, no entanto, tem duas limitações. A primeira é que as cepas de alta virulência não são totalmente representativas dos parasitas envolvidos nas doenças humanas. A este respeito, e como citado acima, em muitos dos pacientes a infecção transcorre sem ser percebida, e o diagnóstico é feito, anos mais tarde, por ocasião de exames de laboratório rotineiros ou pelo aparecimento de sintomas da doença crônica. A segunda limitação é que devido ao curso da infecção ser intenso e abrupto, modelos de alta virulência não permitem definir com precisão a relativa importância dos elementos envolvidos no controle do *T. cruzi*, bem como a extensão dos processos

patogênicos (MARINHO *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, utilizamos camundongos C57BL6 infectados pela cepa Y de *T. cruzi* para estudar a fase aguda da doença. Para estudar a fase crônica, em que ocorre lesão cardíaca, a semelhança da doença cardíaca crônica de Chagas humana, utilizamos a cepa Sylvio X10/4 na infecção de camundongos C3H/HePas.

1.3 A resposta imune ao *T. cruzi*

Os fatores que determinam as distintas formas clínicas da doença não são completamente entendidos. No entanto, existe consenso geral de que a resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo *T. cruzi* é a principal responsável tanto pela proteção quanto pela patogenia nos tecidos, decorrente desta resposta (BRENER; GAZZINELLI, 1997). A resistência do hospedeiro durante a doença de Chagas experimental é dependente tanto da imunidade inata, quanto da adquirida (ALIBERTI; CARDOSO *et al.*, 1996). Dentre as principais células envolvidas na resposta contra o parasita, encontram-se os macrófagos (GOBLE; BOYD, 1962; KIERSZENBAUM *et al.*, 1974), as células Natural Killer (NK) (ROTTENBERG *et al.*, 1988, 1993; RUSSO *et al.*, 1988; TARLETON *et al.*, 1992), linfócitos T CD4⁺ (RUSSO *et al.*, 1988), T CD8⁺ (TARLETON *et al.*, 1992) e linfócitos B, produtores de anticorpos (KIERSZENBAUM; HOWARD, 1976; KRETTLI; BRENER, 1976).

O primeiro elemento que garante a sobrevivência e sucesso da infecção pelo *T. cruzi* é a penetração em células do hospedeiro (DOSREIS *et al.*, 2007; DUTRA; GOLLOB, 2008). Várias moléculas presentes no hospedeiro e na superfície do parasita são essenciais para o processo ativo de invasão celular (DOSREIS *et al.*, 2007) e são capazes de estimular a resposta imune inata no primeiro encontro (TARLETON, 2007). As interações iniciais são cruciais tanto para o estabelecimento de microambiente rico em citocinas que direcionam o subsequente desenvolvimento de populações de células T efetoras e reguladoras, importantes para manutenção do controle do parasita com ou sem patologia durante a fase crônica (DUTRA; GOLLOB, 2008). A resposta imune inata ao *Trypanosoma cruzi* depende da detecção do parasita por receptores (PRRs, como os TLRs e NLRs) que reconhecem padrões de moléculas conservadas (PAMPs) (AKIRA *et al.*, 2006). Em

2001, o grupo de Gazzinelli apresentou o primeiro exemplo de reconhecimento de um PAMP de patógeno eucarioto por receptores TLR. Neste trabalho os autores demonstraram que ancoras de GPI da superfamília de mucinas de *T. cruzi* são reconhecidas por TLR-2 e induzem a produção de IL-12, NO e TNF por macrófagos (CAMPOS *et al.*, 2001). Em outro trabalho foi demonstrado que a resposta proinflamatória *in vivo* a glicoinositolfosfolípidos de *T. cruzi*, bem como a ativação de NF- κ B *in vitro*, dependem da expressão de TLR-4. Além disso, camundongos mutantes de TLR-4, tais como a linhagem C3H/HeJ, não conseguem controlar a replicação do *T. cruzi* em estágios iniciais da infecção e apresentam uma mortalidade mais precoce quando comparados com os camundongos C3H/HeN (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Camundongos KO para MyD88 e TRIF, as duas principais proteínas adaptadoras envolvidas na sinalização por TLR, apresentam elevados níveis de parasitemia (KOGA *et al.*, 2006).

Os macrófagos e as células musculares são os principais alvos de invasão “*in vivo*” do *T. cruzi* durante a infecção primária, antes do estabelecimento da resposta imune específica (BRENER, 1980). O envolvimento dos macrófagos na resistência a infecção de camundongos por *T. cruzi* foi evidenciado, inicialmente, pela maior susceptibilidade dos animais cujos macrófagos haviam sido bloqueados funcionalmente (GOBLE; BOYD, 1962; KIERSZENBAUM *et al.*, 1974). Nos macrófagos, o IFN- γ aumenta notavelmente sua ação tripanomicida (GOLDEN; TARLETON, 1991) induzindo a destruição de parasitas internalizados, principalmente pela geração de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio (MUÑOZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 1992; HOLSCHER *et al.*, 1998).

Durante a fase aguda, ocorre uma intensa reação inflamatória tissular que envolve diferentes tipos de leucócitos, incluindo macrófagos e eosinófilos, e em menor intensidade, mastócitos (TANOWITZ *et al.*, 2009) acompanhada de um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e óxido nítrico sintase (HUANG *et al.*, 1999; MACHADO SOUTO *et al.*, 2008). A infecção aguda é caracterizada por uma intensa ativação dos linfócitos T e aumento na expressão de citocinas como a interleucina 2 (IL-2) e do seu receptor IL-2R (ALIBERTI *et al.*, 1996). Nesta fase ocorre ativação policlonal do compartimento linfocitário (D'IMPERIO *et al.*, 1985; MINOPRIO *et al.*, 1989), sendo caracterizada por uma

enorme expansão e diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e linfócitos B. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ também são observadas no infiltrado inflamatório, mas na cardiopatia crônica as células T CD8⁺ são predominantes (MARTIN; TARLETON, 2005; MARTIN *et al.*, 2006).

Além de ativar os macrófagos, as células TCD4⁺ atuam na infecção pelo *T. cruzi* através de outros mecanismos, tais como induzindo produção de anticorpos citofílicos e ativadores de complemento pelas células B, e auxiliando na ativação das células TCD8⁺ (RUSSO *et al.*, 1996; KUMAR; TARLETON, 1998).

O papel protetor dos linfócitos TCD8⁺ no estágio precoce da infecção e na fase crônica tem sido extensivamente descrito. Trabalhos demonstram um drástico aumento na susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* em camundongos nos quais são eliminadas as células TCD8⁺. Assim, em modelos animais em que os linfócitos TCD8⁺ foram depletados por tratamento com anti-CD8, ou em camundongos deficientes na população CD8⁺ (CD8-KO^{-/-}, TAP-1^{-/-} ou β 2-microglobulina^{-/-}), observa-se uma maior susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1990, 1995; TARLETON *et al.*, 1992; RUSSO *et al.*, 1996; KUMAR; TARLETON, 1998). Por outro lado, o envolvimento destas células é evidenciado por estudos que demonstram que as células TCD8⁺ são as predominantes no tecido cardíaco dos pacientes com patologia crônica (REIS *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1997). O acúmulo de linfócitos TCD8⁺ também foi observado no sangue, cavidade peritoneal e fígado de camundongos crônicos (GRISOTTO *et al.*, 2001). Em trabalhos realizados em nosso laboratório, observou-se que a frequência de células TCD8⁺, na fase crônica da doença, excede em muito àquela de animais controle, o que sugere que essa população tenha papel importante na fase crônica de doença.

A resistência à infecção dependente do padrão de citocinas e subclasses de IgG (principalmente IgG2a) produzidas na infecção pelo *T. cruzi*, indicam que a polarização da resposta imune para um perfil funcional Th1 é fundamental para o controle, mesmo que não estéril, do parasita (NICKELL *et al.*, 1993; ALIBERTI *et al.*, 1996). A resposta Th1 pode ser induzida pela produção de IL-12 e IL-18 (NAKAMURA *et al.*, 1993; MEYER ZUM BUSCHENFELDE *et al.*, 1997; MULLER *et al.*, 2001) gerada após invasão e/ou fagocitose do *T. cruzi* por macrófagos

(ALIBERTI *et al.*, 1996; TADOKORO *et al.*, 2004). O IFN- γ é produzido inicialmente por células NK (CARDILLO *et al.*, 1996) e mais tardiamente pelas células TCD4⁺ (RUSSO *et al.*, 1996) e TCD8⁺ (TARLETON, 1990). Nesse processo também foi descrita a participação das células TCD4⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ (SARDINHA *et al.*, 2006).

1.4 Tratamento

As drogas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas são o Nifurtimox, produzido pela Bayer Health Care com o nome comercial de Lampit, e o benznidazole produzido pela Roche como Rochagan ou Radanil (TANOWITZ *et al.*, 2009). Lançados em 1967 e 1972, respectivamente, estas drogas apresentaram resultados satisfatórios para a eliminação dos parasitas na fase aguda da infecção, mas não foram eficazes para o tratamento de infecções crônicas devido à alta frequência de efeitos colaterais e baixos níveis de cura aparente (JANNIN; VILLA, 2007).

1.5 A lesão cardíaca crônica decorrente da infecção pelo *T. cruzi*

Como citado anteriormente, uma fração considerável dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* desenvolve uma miocardite na fase crônica da doença, quadro que frequentemente é fatal. Nas últimas décadas, os mecanismos que desencadeiam a patologia chagásica crônica têm sido objeto de intenso debate (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 2001), e diferentes mecanismos foram propostos para explicar o aparecimento das lesões (KIERSZENBAUM, 1999; TARLETON; ZHANG, 1999). Das duas principais hipóteses para explicar o desenvolvimento da patologia cardíaca na fase crônica, uma a relaciona à resposta imune direcionada aos parasitas que persistem no coração do indivíduo, e a outra, à resposta autoimune frente aos componentes do tecido cardíaco, desencadeada por reatividade cruzada frente ao parasita (CUNHA-NETO; KALIL, 1995; LEON; ENGMAN, 2001; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2001). No nosso laboratório, o estudo da infecção crônica causada pela infecção com o clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi*, revelou uma associação direta entre carga parasitária cardíaca e patologia (MARINHO *et al.*, 1999),

resultados que sugerem que neste modelo experimental a patologia seja consequência da resposta imune aos parasitas que persistem no local.

1.6 Regulação do Sistema Imune

A resistência de um organismo às infecções requer a geração de uma resposta imune que controle o patógeno invasor e que limite os danos colaterais resultantes desta resposta aos tecidos próprios (BELKAID, 2008). Assim, durante a resposta frente a um patógeno, ao mesmo tempo que os elementos efetores agem no sentido de eliminar o parasita, mecanismos reguladores são ativados, minimizando a lesão tissular provocada pela própria resposta imune (Kotner e TARLETON, 2007; BELKAID, 2008). Participam desta regulação, tanto componentes da imunidade inata, quanto da adquirida (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006). Além disso, tem sido demonstrada a ação de vários tipos de células reguladoras, algumas das quais são induzidas na resposta contra infecções e outras consideradas reguladoras naturais (BLUESTONE; ABBAS, 2003).

Uma subpopulação de células T ($CD4^+CD25^+$), chamada de T reguladoras (T_{REG}) têm sido descritas nos últimos 15 anos como uma classe de células que regulam a resposta imune, tendo a capacidade de controlar respostas excessivas ou prejudiciais a patógenos ou antígenos próprios (MALOY; POWRIE, 2001; GAVIN *et al.*, 2002; SHEVACH, 2002; TRZONKOWSKI *et al.*, 2004). Apesar das T_{REG} terem sido descritas há 15 anos, a ação dessas células já havia sido observada no final da década de 60 do século passado. Há 40 anos atrás, foram publicados dois trabalhos que contribuíram para a formação da atual concepção de que o controle da ativação das células T autorreativas é mediado por uma subpopulação de células T, e que este é o mecanismo chave da tolerância ao próprio. Assim, dois grupos de pesquisadores demonstraram que dentre os timócitos deveria haver uma subpopulação celular que impediria a reatividade ao próprio (NISHIZUKA *et al.*, 1969; PENHALE *et al.*, 1973). Em 1969, Nishizuka e colaboradores mostraram que os ovários de camundongos timectomizados logo após o nascimento, especialmente entre o 2º e 4º dias de vida, eram destruídos, ao que foi atribuído, mais tardiamente, um fenômeno de natureza autoimune (NISHIZUKA *et al.*, 1969). Em 1973, Penhare

et al. notificaram que a timectomia de ratos adultos, seguida de exposição de radiação X, resultava no desenvolvimento de tireoidite autoimune (PENHALE *et al.*, 1973). Os pesquisadores destes grupos, baseando-se no fato de que a inoculação de células T normais prevenia a doença, suspeitaram de um provável processo autoimune decorrente da eliminação de células T supressoras.

O primeiro grupo tentou caracterizar uma população de células T que fosse capaz de prevenir ovarite autoimune. A administração de células identificadas como linfócitos T (Thy-1) obtidas de esplenócitos preveniu o desenvolvimento de ovarite, o que os levou a concluir que estas eram as células reguladoras. Estas células estavam presentes em animais adultos timectomizados, mas não em neotimectomizados (SAKAGUCHI *et al.*, 1982).

O segundo grupo já havia demonstrado que a reconstituição de ratos timectomizados e irradiados (radiação X) por via endovenosa com células singênicas dos linfonodos, baço ou timo, impedia uma resposta autoimune à tireóide, geralmente observada nesta situação. A administração, por via intraperitoneal, tanto de células de linfonodos quanto de esplenócitos prevenia uma tireoidite, porém o mesmo não era observado quando a reconstituição era feita com timócitos. A prevenção completa da resposta autoimune foi observada, somente, quando as células eram administradas dentro de um curto período de tempo após a última dose de irradiação, ao passo que, se a transferência ocorresse 14 dias depois da última irradiação, a patologia da tireóide era moderada. Estudos preliminares utilizando o soro específico para as células T e o fracionamento de células do linfonodo em gradiente linear de Ficoll, sugeriram que as células autorreguladoras eram células T grandes (PENHALE *et al.*, 1976).

A existência de células TCD4⁺ com atividade inibitória sobre a autoimunidade tem sido demonstrada desde os anos 80 pela utilização de modelos animais de doenças autoimune. Como exemplo, em camundongos non-obese diabetic (NOD) e em ratos bio-breeding, que desenvolvem *Diabetes mellitus* do tipo 1 espontaneamente (TD1), a inoculação de células TCD4⁺ de animais normais do mesmo alótipo previne a TD1. Além disso, também no modelo animal, a transfusão concomitante de células TCD4⁺ normais e células T diabetogênicas previne a

doença em receptores deficientes de células T (GREINER *et al.*, 1987; MORDES *et al.*, 1987).

1.7 Caracterização de células T_{REG}

A caracterização de células T_{REG} se deu pela identificação das moléculas, CD4⁺CD5^{high} (SAKAGUCHI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992), CD4⁺CD45R^{low} (POWRIE; MASON, 1990) e CD45RB^{low} (MORRISSEY *et al.*, 1993; POWRIE *et al.*, 1993), presentes em células que apresentam função reguladora. No ano de 1995, Sakaguchi e colaboradores revelaram a molécula CD25 (a cadeia α do receptor para IL-2 - IL-2R), como candidata a marcador de células T_{REG}. A molécula CD25 está presente em uma fração de 5 a 10% de células TCD4⁺ e 1% de TCD8⁺ em camundongos naive e humanos e estão presentes em uma fração de células TCD4⁺ CD5^{high} e CD45RB^{low} (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Nestes estudos, a transferência de células esplênicas depletadas de CD25 induzia, em camundongos BALB/c Nude, evidências sorológicas e histológicas de doença autoimune em maior incidência e em maior número de órgãos (incluindo estômago, tireóide, ovários, glândulas adrenal e β -ilhotas de Langerhans) do que a transferência de células T CD5^{low} ou CD45RB^{high}. Além disso, observou-se que um número elevado de células TCD4⁺CD25⁻ induziam doença autoimune sistêmica letal. A transferência de pequeno número de células TCD4⁺CD25⁺ junto das células TCD4⁺CD25⁻, por outro lado, prevenia completamente o aparecimento de doenças autoimunes (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Os autores, em função da atividade funcional observada, deram às células TCD4⁺CD25⁺, o nome de células T reguladoras naturais.

Outras moléculas ainda foram relacionadas ao fenótipo de células T_{REG}, como CTLA-4 (READ *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2000) GITR (MCHUGH *et al.*, 2002; SHIMIZU *et al.*, 2002), CD127 (LIU *et al.*, 2006b) e CD103, moléculas que estão presentes em todas as T_{REG} seqüestradas para o local de infecção por *Leishmania major* (SUFFIA *et al.*, 2005).

Apesar da molécula CD25 ser um marcador de células T_{REG} em camundongos naive, a sua expressão é induzida em células T ativadas

(WALDMANN, 1986), de maneira análoga ao que ocorre com as moléculas GITR e CTLA-4 (MCHUGH *et al.*, 2002; RONCHETTI *et al.*, 2004; SUFFIA *et al.*, 2005).

1.8 Infecção por *T. cruzi* e Imunossupressão

Diversos autores constataram que na fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorre imunossupressão intensa (REED *et al.*, 1977; CUNNINGHAM *et al.*, 1978; TEIXEIRA *et al.*, 1978; HAYES; KIERSZENBAUM, 1981; ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995), que diminui gradativamente, desaparecendo na fase crônica da doença (HAYES; KIERSZENBAUM, 1981; CHAUSSABEL *et al.*, 2003).

Entre os elementos que participam do processo supressor, foram descritas moléculas que interferem com a ativação de células T, tais como mitógenos, coestimuladores ou moléculas que induzem supressão de linfócitos T (DOSREIS *et al.*, 2005).

Os macrófagos, como citado anteriormente, também exercem ação supressora na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (CERRONE; KUHN, 1991), na qual estão envolvidos as prostaglandinas ou óxido nítrico, elementos efetores da própria resposta imune, agindo em um processo de “feedback” negativo (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; PINGE-FILHO *et al.*, 1999). Há citocinas como a IL-10 ou TGF- β , normalmente produzidas durante a resposta imune ao *T. cruzi*, que são elementos chave da regulação da resposta, agindo através da sua potente atividade anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 1991; REED *et al.*, 1994).

Em relação aos constituintes do *T. cruzi* que agem no sentido de evadir a resposta imune, foram descritos a enzima trans-sialidase, com sua ação anti-inflamatória (CHAUSSABEL *et al.*, 2003); a mucina, indutora de anergia durante a infecção (ARGIBAY *et al.*, 2002); o glicoinositol fosfolipideo (GIPLs) ligado a molécula de ancoramento do glicosilfosfatidilinositol (GPI), bloqueador da ativação de linfócitos T pela inibição da IL-2 (DOSREIS *et al.*, 2002) e a cruzipaína, inibidor da ação tripanomicida dos macrófagos pela produção autócrina de TGF- β e IL-10 (STEMPIN *et al.*, 2002).

1.9 Células T reguladoras adaptativas

Populações de células reguladoras que não as células T_{REG} naturais têm sido descritas em respostas imune de diversas naturezas (MALOY; POWRIE, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2001; KINGSLEY *et al.*, 2002). Estas células são geradas de populações de células T em condições particulares de estímulos antigênicos e podem ser induzidas “*ex vivo*” pelo cultivo de células TCD4⁺ com antígenos, ou ativadores policlonais na presença de citocinas imunossupressoras, em especial a IL-10 (LEVINGS *et al.*, 2001; BARRAT *et al.*, 2002). Diferentemente das células T_{REG} naturais, as células reguladoras adaptativas originam-se fora do timo. O nível de expressão de CD25 nas células T_{REG} adaptativas é variável, dependendo do tipo de doença e do local em que esteja desempenhando a regulação (GONZALEZ *et al.*, 2001). Por outro lado, as funções *in vivo* das células T_{REG} adaptativas acontecem através de secreção de citocinas (CHATENOUD *et al.*, 1997; MALOY; POWRIE, 2001; BARRAT *et al.*, 2002) e, dependendo das citocinas que produzam, IL-10 ou TGF-β \square 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; ABBAS, 2003).

1.10 FoxP3 – marcador exclusivo de T_{REG}

Em 1982, o estudo de casos de pacientes que apresentavam altos índices de doenças endócrinas autoimune levou a descoberta de uma mutação em um gene presente no cromossomo X. À síndrome causada por esta mutação deu-se o nome de desregulação imune ligada ao cromossomo X, poliendocrinopatia, enteropatia (Immune-Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, and X-Linked Syndrome - IPEX) (POWELL *et al.*, 1982). Assim, IPEX é uma doença recessiva que está relacionada ao aparecimento, em recém-nascidos, de diabetes mellitus dependente

de insulina, infecções, enteropatia, trombocitopenia e anemia, outras endocrinopatias, eczema e caquexia (LEVY-LAHAD; WILDIN, 2001).

Em 1991, foi descrito um camundongo que apresenta mutação recessiva na porção terminal do cromossomo X, denominado Scurfy, que apresentava hiperativação de linfócitos TCD4⁺ e produção elevada de citocinas pró-inflamatórias (GODFREY *et al.*, 1991). O mutante Scurfy era semelhante a animais destituídos das moléculas CTLA-4 ou TGB-β que também desenvolviam patologia decorrente da falta da regulação das células TCD4⁺ ativadas. O estudo deste camundongo mutante levou a identificação do gene defectivo para a codificação da proteína FoxP3. Essa é uma proteína conservada em humanos e é um membro da família de fatores de transcrição reguladores forkhead/winged-helix. Estudos posteriores mostraram que doenças autoimunes ligadas ao cromossomo X, como a síndrome de desregulação autoimune alérgica, a diabetes mellitus neonatal e a IPEX estavam ligadas a genes ortólogos ao gene defectivo dos camundongos Scurfy (CHATILA *et al.*, 2000; BENNETT *et al.*, 2001; WILDIN *et al.*, 2001).

Estudos posteriores revelaram a especificidade de FoxP3 no desenvolvimento e função de células T_{REG} (CD4⁺CD25⁺). A partir de então, passou a representar o marcador exclusivo de células T com função reguladora, independentemente da expressão de CD25 (FONTENOT *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003). A transfecção de FoxP3 em células TCD25⁻CD4⁺ as tornavam supressoras da proliferação de outras células T *in vitro* e sua inoculação prevenia o desenvolvimento de doenças autoimunes e da doença inflamatória digestiva (IBD - inflammatory bowel disease) (HORI *et al.*, 2003). Desta forma, atualmente, é aceito que a tolerância periférica é ativamente sustentada por células T_{REG} CD4⁺CD25⁺, que expressam FoxP3 e que compreendem de 5 a 10% das células TCD4⁺ da periferia de camundongos *naïve* (SAKAGUCHI, 2005).

Evidências experimentais sustentam a idéia de que o controle da imunopatologia pelas T_{REG} pode ser particularmente importante para a proteção de ambientes imuno privilegiados ou tecidos com funções altamente especializadas, como fígado e olhos (HESSE *et al.*, 2004; SUVAS *et al.*, 2004). No entanto, ao preservar a homeostasia no hospedeiro, controlando a resposta imune, as células

T_{REG} aumentam a sobrevivência dos patógenos (SCOTT-BROWNE *et al.*, 2007) e, em alguns casos, a persistência desses. No modelo murino, Belkaid *et al.* (2002) demonstraram que células T_{REG} acumulam-se no sítio de infecção por *Leishmania major*, suprimindo a capacidade efetora das células T na eliminação deste protozoário. A remoção das T_{REG} aumenta a resposta imune, levando a uma completa erradicação do parasita no local da infecção. No entanto, esta cura esterilizante, resulta na perda da imunidade que confere resistência a uma re-infecção pelo mesmo parasita (BELKAID *et al.*, 2002).

As células T_{REG} suprimem a patologia que resulta da resposta imune contra determinados microrganismos ao limitar a ação efetora linfocitária que causaria a lesão tecidual. Isso foi demonstrado no modelo murino de doença inflamatória do intestino (intestinal bowel disease - IBD) em camundongos com imunodeficiência severa combinada (SCID) (SHIMIZU *et al.*, 2002). Camundongos SCID sofrem de IBD pela transferência de células T depletadas de células T_{REG} , quadro clínico que não ocorre quando se transferem células T totais. A depleção de células T_{REG} parece induzir uma hiper-reatividade dos linfócitos $TCD4^+$ frente às bactérias comensais do intestino, que culmina no desenvolvimento do quadro de IBD. Desta forma, quando se utilizam camundongos SCID criados em condições “germ-free” (livres de patógenos), a transferência das células T depletadas de T_{REG} não induz o desenvolvimento de IBD. De forma semelhante, foi demonstrado que a transferência de células T depletadas de células T_{REG} induz pneumonite severa em camundongos SCID, cronicamente infectados com *Pneumocytis carinii*, mas isso não ocorre quando se transfere células T totais (HORI *et al.*, 2002). Estes experimentos indicam que as células T_{REG} impedem que a resposta imune aos microrganismos se torne excessiva, minimizando o desenvolvimento de imunopatologia nos hospedeiros.

1.11 Depleção das células $TCD4^+CD25^+$

A administração de anticorpos monoclonais anti-CD25 para depletar as células T reguladoras $CD25^+$ (T_{REG}) em camundongos tem sido prática comum para inferir a função desta subpopulação (ZELENAY; DEMENGEOT, 2006). A depleção de células T_{REG} pela utilização dos anticorpos anti-CD25 (clone 7D4 e PC61), porém,

foi contestada, e o aumento da resposta efetora observado após o tratamento com este anticorpo relacionado a uma perda de função das células $CD4^+CD25^+$ e não a eliminação destas células (KOHM *et al.*, 2006). Estes autores verificaram os efeitos do tratamento com anticorpos produzidos pelos clones 7D4 ou PC61 estimulando a expressão de $CD25^+$ e $FoxP3^+$ através de citometria de fluxo e real-time PCR (KOHM *et al.*, 2006). Em relação ao tratamento com monoclonal 7D4, resultados idênticos foram obtidos pelo grupo de Demengeot (2006), que observou uma diminuição na expressão de moléculas $CD25^+$, mas não na frequência de células que expressam $FoxP3$. Entretanto, quando o tratamento foi realizado com anticorpos do clone PC61, estes mesmos autores obtiveram resultados diferentes. Assim, a injeção de PC61 resultou na eliminação de células $CD25^+$ e em uma diminuição de 45% no número de células do baço que expressam $CD4^+FoxP3^+$ esplênicas. Estes autores concluíram que a injeção de anti- $CD25$ proveniente do hibridoma PC61, que tem sido o monoclonal mais utilizado, interfere com a função de T_{REG} *in vivo* e resulta da depleção de parte das T_{REG} (ZELENAY; DEMENGEOT, 2006). De forma análoga, outros autores têm constatado que o anticorpo PC61 remove apenas 50% do total de células $FoxP3^+$, mas esta depleção parcial é suficiente para permitir o desenvolvimento de patologia, no caso, encefalomielite autoimune, em resposta a estimulação subótima de linfócitos T autorreativos (STEPHENS *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que a administração de uma única dose de PC61 no dia - 1 relativo à inoculação de células de melanoma resulta em diminuição do crescimento do tumor, mas não induz um aumento no tempo de sobrevivência dos camundongos tratados (MATSUSHITA *et al.*, 2008). Além disso, estes autores também verificaram uma diminuição das células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ que infiltram o tumor no dia 14 da inoculação do melanoma.

A infecção de camundongos C57BL/6 com *H. pylori* induz um aumento acentuado no número de células $FoxP3^+$ no trato gastrointestinal, que aumenta ao longo dos meses, junto com a severidade da inflamação, até se estabelecer uma condição homeostática. Em concordância, em pacientes infectados com *Helicobacter*, mas não em indivíduos não infectados, um grande número de células gástricas $FoxP3^+$ é detectado por imunohistoquímica. Para avaliar a funcionalidade *in vivo* desta resposta, células $CD25^+$ foram depletadas sistemicamente de

camundongos pela administração de anticorpos PC61. Após quatro semanas de infecção, os camundongos tratados com PC61, ao contrário dos animais controle, desenvolveram uma gastrite severa, com aumento de expressão de citocinas e do número de linfócitos (T e B) e de macrófagos na mucosa, acompanhado de um aumento nos títulos de IgG1 e IgG2c (específicas para *H. pylori*) no soro dos camundongos tratados com PC61 e por uma redução na carga bacteriana (RAD *et al.*, 2006).

A administração de anti-CD25 (PC61) reduz de forma significativa a incidência de leucemia que ocorre após longo período de latência em camundongos expostos a radiação (UENAKA; NAKAYAMA, 2003). Além disso, o tratamento com anti-CD25 (PC61.5) de fêmeas B/WF1, filhas de mães NZB e pais INZW, três dias após o nascimento, induz o desenvolvimento de glomerulonefrite, assim como o aumento do título de anticorpos anti-nuclear IgG2a, um aumento da produção de IL-6 e INF- γ , e uma diminuição da produção de TGF- β (HAYASHI *et al.*, 2005).

A depleção de células CD25⁺ por anti-CD25⁺ (PC61) leva a uma diminuição da parasitemia em animais infectados por *Plasmodium berghei* NK65, particularmente em animais imunizados (VIGARIO *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que a resposta imune primária mediada por células CD8⁺ aumenta quando as células T_{REG} (CD4⁺ CD25⁺) são depletadas antes da infecção pelo *Plasmodium* (HISAEDA *et al.*, 2004).

1.12 T_{REG} e *T. cruzi*

A doença de Chagas é consequência de um processo infeccioso crônico, no qual o parasita consegue persistir em número reduzido, a despeito do desenvolvimento de uma intensa resposta imune específica que inclui células B, células TCD8⁺ e células TCD4⁺ com perfil funcional Th1. Pelo caráter crônico desta interação parasita-hospedeiro, é de se esperar que junto aos mecanismos efetores anti-*T. cruzi* sejam ativados diversos elementos regulatórios que impeçam ou minimizem o dano tecidual secundário à ação da resposta efetora ao parasita. Além disso, na miocardiopatia chagásica crônica, junto aos clones T parasito-específicos,

poderiam estar participando no infiltrado inflamatório e gênese da lesão, clones autorreativos ativados por reatividade cruzada entre o parasita e proteínas do tecido cardíaco.

Desta forma, estudos detalhados dos processos regulatórios da resposta imune que são ativados durante a infecção devem proporcionar um melhor entendimento da fisiopatologia da doença de Chagas. Tendo isso em mente, no presente projeto nos propusemos a estudar, em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*, o envolvimento das células T reguladoras (T_{REG} , $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) no controle da resposta imune ao parasita e no desenvolvimento da patologia.

2 OBJETIVOS

No presente trabalho nossos objetivos foram:

1) Analisar as mudanças na população de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

2) Analisar os efeitos do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD25 (clone PC61) na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*: efeito na população T_{REG}, assim como na carga parasitária e patologia cardíaca.

3) Analisar os efeitos do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD25 (clone PC61) na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*: efeito na população T_{REG}, assim como na resposta imune ao parasita, carga parasitária subpatente e patologia cardíaca.

3 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

O estudo das células T_{REG} na infecção murina pelo *T. cruzi* foi abordado em dois modelos diferentes, os modelos de infecção por parasitas das cepas Y e Sylvio X10/4.

Os estudos de fase aguda, assim como alguns dos estudos de fase crônica, foram realizados em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.

Para os estudos de patologia na fase crônica foram utilizados camundongos C3H/HePAS infectados pelo parasita miotrópico Sylvio X10/4, modelo que desenvolve um quadro de miocardiopatia progressiva, semelhante ao da doença humana.

Artigos sobre o papel das T_{REG} na infecção pelo *T. cruzi* publicados posteriormente ao início desta tese

No ano de 2007, ou seja, dois anos após o início desta tese, foi publicado o artigo “Endogenous CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice” de J. Kotner e R. Tarleton. Um ano mais tarde, P. Sales-Junior e colaboradores publicaram o artigo “The regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*” e logo em seguida, um outro artigo foi publicado, “The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection”, assinado por F.S. Mariano e colaboradores. Uma vez que esses três artigos lidam com o mesmo tópico abordado na presente tese e utilizam a mesma abordagem para examinar o papel das T_{REG} (o tratamento com monoclonais anti-CD25), optamos em fazer um pequeno resumo dos principais achados desses, o que deve servir de apoio, ou de contraste, na apresentação dos nossos resultados.

No trabalho de Kotner e Tarleton de 2007, foram utilizados dois modelos experimentais murinos de infecção pelo *T. cruzi*. No primeiro modelo, camundongos C57BL/6 foram tratados com anticorpos monoclonais anti-CD25 (do clone 7D4) e, a seguir, infectados por parasitas da cepa Tulahuen. No dia 6 pós infecção (p.i.) a frequência de células CD4⁺CD25⁺ mostrou-se bastante diminuída nos animais tratados, os quais apresentaram no dia 15 p.i. um modesto aumento na frequência de células TCD8⁺ específicas para o epítipo imunodominante do *T. cruzi* TSkb20. Contudo, não se observaram diferenças na sobrevivência dos grupos tratados com monoclonal 7D4 ou não tratados. No segundo modelo com parasitas da cepa Brazil, um parasita que permite a sobrevivência na fase aguda, não observaram mudanças no estado geral, longevidade ou curva de peso entre os animais infectados tratados com anti-CD25 e não tratados. Além disso, o número de células CD8⁺ específicas para peptídeos importantes do *T. cruzi*, assim como a frequência de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ e o nível de citotoxicidade *in vivo* frente a células alvo pulsadas com peptídeos de *T. cruzi* não se modificou nos animais infectados e tratados com anti-CD25. Finalmente, os autores analisaram a frequência de células FoxP3⁺

(scurfin⁺) no baço e linfonodos, não observando nenhuma diferença entre os animais infectados e os controles não infectados. Neste trabalho não avaliaram a frequência ou número de células FoxP3⁺ para verificar se houve depleção das T_{REG} após tratamento com anti-CD25, sendo que a efetividade do tratamento foi monitorada exclusivamente através da análise da frequência da população CD4⁺CD25⁺. Além disso, neste modelo não foi realizado nenhum estudo relativo ao efeito do tratamento com anti-CD25 na patologia da fase crônica.

No estudo de Sales-Junior e colaboradores, o tratamento com anti-CD25 (PC61) foi avaliado em infecções de camundongos C57BL/6 por *T. cruzi* de duas cepas diferentes: as cepas Colombiana e Y. O tratamento com PC61 não afetou o curso da infecção por 50 parasitas da cepa Y, ou por 1000 parasitas da cepa Colombiana. No entanto, o tratamento determinou uma diminuição da parasitemia e discreto aumento de sobrevivência na infecção por 50 parasitas da cepa Colombiana, sugerindo que o tratamento induz um reduzido efeito protetor. Para verificar se o maior controle do *T. cruzi* (da cepa Colombiana) ocorreu em consequência de um aumento da resposta imune, dada pela eliminação das células T_{REG}, os autores analisaram a produção de diversas citocinas no soro dos animais infectados, tratados ou não com anti-CD25. Entretanto, não verificaram qualquer diferença na produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 ou MCP-1 entre os dois grupos experimentais, apesar de que no grupo tratado com PC61 se observava uma tendência a uma maior produção de IFN- γ . Em forma análoga não observaram diferenças reprodutíveis na produção de IFN- γ ou IL-10 por esplenócitos dos animais infectados estimulados *in vitro* com anti-CD3 ou antígeno de epimastigotas. O estudo do coração de animais infectados por 30 dias revelou que a inflamação era similar nos grupos tratados com PC61 e não tratados, bem como não se observaram diferenças no nível de citocinas produzidos localmente no coração dos animais de ambos os grupos. Os autores finalizaram o trabalho analisando os níveis de mRNA para FoxP3 no coração dos animais infectados e verificaram que há um pequeno aumento no curso da infecção. Analogamente ao trabalho anterior, não foram analisados neste estudo os efeitos do tratamento com anti-CD25 na expressão de FoxP3 no coração ou baço.

Finalmente, Mariano e colaboradores estudaram o efeito do tratamento com PC61 em camundongos BALB/c infectados por *T. cruzi* da cepa Y. Neste artigo também avaliaram o efeito do tratamento com monoclonais anti-GITR, resultados que não resumiremos pelo fato de serem pouco relevantes a esta tese. Em um primeiro grupo de experimentos a presença de células FoxP3⁺ no coração de animais infectados por 16 dias foi demonstrada por imunohistoquímica. Apesar deste resultado, nos animais tratados com PC61 e infectados não observaram qualquer mudança no nível de patologia cardíaca (na intensidade do infiltrado, número de células CD4⁺ e CD8⁺, número de células IFN- γ ⁺ e presença de ninhos de amastigotas), apesar de mostrarem uma expressão diminuída de iNOS no coração em relação aos animais não tratados. Paradoxalmente, os animais tratados com PC61 exibiram uma tendência a maior parasitemia e sofreram uma redução importante na sobrevivência em relação aos animais não tratados. Em relação à resposta imune dos animais tratados com PC61, não se observaram mudanças nos níveis séricos de nitratos nos animais tratados, porém a expressão de IL-10, TGF- β , IFN- γ e IL-12 no coração se mostraram diminuídas em relação à dos animais não tratados. Por outro lado, os autores não observaram diferenças no número total de esplenócitos CD4⁺CD25⁺ (no dia 16 p.i.) entre os grupos tratado e não tratado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Camundongos e cepas de *T. cruzi* utilizadas

Foram utilizados camundongos C57BL6 machos para o estudo de células T_{REG} nas fases aguda e crônica, infectados com 10³ formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* por via intraperitoneal (i.p.). Na fase aguda, além da avaliação do fenótipo das células T_{REG}, também foram avaliados níveis de infiltrado inflamatório no coração destes camundongos e parasitemia do sangue.

Para o estudo da lesão cardíaca na fase crônica da doença, camundongos C3H/HePas, fêmeas, foram infectadas com 10⁵ formas tripomastigotas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*.

A manutenção “in vivo” da cepa Y de *T. cruzi* foi realizada em camundongos da linhagem A/J por repiques semanais.

Os clones X10/4 da cepa Sylvio de *T. cruzi* foram mantidos por sucessivas passagens em cultura de células LLCMK2 em meio RPMI suplementado com 3% de soro bovino fetal (SBF).

As cepas Y e Sylvio (clone X10/4) de *T. cruzi* são provenientes do Instituto Butantan e da UNIFESP, respectivamente.

4.2 Produção e purificação dos anticorpos

Os anticorpos monoclonais (MoAb) anti-CD25 utilizados nos ensaio de depleção de células TCD4⁺CD25⁺ foram obtidos do sobrenadante de cultura do hibridoma PC61, gentilmente cedido pela Dr^a Gláucia C. Furtado do Mount Sinai Hospital, New York, USA. Para a produção do sobrenadante, o hibridoma foi cultivado em frascos com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 2 mM de piruvato, 5,5 mM de 2-mercaptoetanol e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (10.000 Unid/mL e 10.000 µg/mL), a 37 °C, em estufa de CO₂.

O hibridoma GL113 (IgG1 de rato anti- β -galactosidase de *Escherichia coli*), controle isotípico do anti-CD25, foi cedido, gentilmente, pela prof^a Dr^a Ises Abrahamsohn, do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

Outro anticorpo utilizado como controle do anti-CD25 foi IgG total obtido do soro de ratos.

Para purificação dos anticorpos MoAb PC61, GL113 e IgG total de ratos, o sobrenadante das culturas e o soro de ratos foram purificados após passagem consecutiva por bomba peristáltica (Pump P-1, Pharmacia Biotech) e coluna de proteína G (HiTrapTM Protein G HP – GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7. Os MoAb ou IgG de rato adsorvidos à coluna foram eluídos pela passagem do tampão Glicina-HCl 100 mM, pH 2,7. O Ph do eluído fracionado foi neutralizado pela adição de solução Tris 1 M, pH 9 na concentração de 1:10 (v/v). A dosagem de proteína foi feita pela técnica de Lowry (LOWRY et al., 1951) para identificação das frações que continham os MoAb ou IgG. Das frações positivas para anticorpos, fez-se um pool e esse foi dialisado em tampão fosfato/salina (PBS). Após nova dosagem e ajuste da concentração de proteína [1 mg/mL] a solução foi filtrada (0,22 μ m), alíquotada em volumes de 10 ml e estocada a 4 °C.

O MoAb JES6-IA12 (anti-IL2) utilizado no experimento de proliferação de células CD25⁺, in vitro, foi gentilmente cedido pela Dr^a Cláudia Zago.

4.3 Tratamento com anticorpo anti-CD25 (PC61)

Nas experiências de fase aguda, os camundongos foram tratados com 1 mg de MoAb anti-CD25 nos dias -6, -4 e -2, relativos à data de infecção com a cepa Y de *T. cruzi*, por via i.p.. Nas experiências de fase crônica, o tratamento com anticorpo anti-CD25 ou controle (isótipo GL113 ou alternativamente IgG total de rato) foi realizado 1 mês antes do sacrifício dos animais a cada 2-3 dias com doses de 0,2 mg/animal por via i.p.. Para verificar a eficiência da depleção os camundongos foram sacrificados em diferentes dias durante e após o tratamento para avaliação da

freqüência de células T_{REG} (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ou CD4⁺FoxP3⁺) do baço e do sangue, por citometria de fluxo, como descrito posteriormente.

4.4 Determinação da parasitemia e carga parasitária

Na fase aguda, a parasitemia foi determinada pelo exame direto do sangue em diferentes intervalos após infecção (BRENER, 1962). Na fase crônica, a carga parasitária oculta foi revelada por cultura em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) a 29 °C, por 40 d, de alíquotas de 5 µL de sangue heparinizado (em triplicata).

4.5 Estudo histopatológico

Para este estudo, os animais foram sacrificados em câmaras de CO₂ de acordo com as recomendações da comissão de ética em experimentação animal. Os órgãos coletados foram imediatamente fixados por 24 h em solução de formaldeído 10% e depois armazenados em solução alcoólica 70% até serem emblocados em parafina. Dois cortes sagitais de 5 µm, não consecutivos de cada órgão (coração, fígado e quadríceps) foram corados por hematoxilina-eosina para posterior atribuição de “scores” através de microscopia óptica. Nos diferentes compartimentos do coração, pericárdio, endocárdio, miocárdio e aurículas foram atribuídas pontuações que variaram de 0 a 5 de acordo com a intensidade de infiltrado. Também foram contados os ninhos presentes no coração.

4.6 Obtenção de leucócitos do baço e do sangue

Os leucócitos foram obtidos pela maceração dos baços dos camundongos sacrificados como descrito anteriormente. Os leucócitos do sangue, coletados para monitoramento da ação do tratamento com anti-CD25 in vivo, foram obtidos pelo sangramento retrorbital, após os animais serem anestesiados, conforme recomendações da comissão de ética em experimentação animal. Estas células foram ressuspensas em tubos com RPMI 1640 suplementado com 3% de SBF e submetidas à centrifugação (300 x g), por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e

ao pellet de células adicionou-se 1 mL de tampão de lise de eritrócitos (150 mM de NH_4Cl , 10 mM de NaHCO_3 e 0,5 mM de EDTA), seguindo-se incubação por 5 min. Após ciclo de lavagens (2 x) o número de leucócitos foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer. Essas células permaneceram em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 2 mM de piruvato, 5,5 mM de 2-mercaptoetanol e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (10.000 Unid/mL e 10.000 $\mu\text{g/mL}$), a 4 °C, até o momento em que foram realizados os ensaios.

4.7 Análise de populações por citometria de fluxo

As células (1×10^6) obtidas como descrito anteriormente foram adicionadas a poços de fundo em U de placas de 96 wells. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 0,5 μL de anticorpos anti-CD16/32 (Fc Block) diluídos em 10 μL de staining buffer (PBS, 1% de SBF e 0,05 de azida sódica) por poço, seguindo-se de incubação por 20 min, a 4 °C. A esta diluição foram adicionados os MoAb conjugados a FITC, PE ou CyChrome em diferentes combinações para marcação celular externa, seguindo-se de incubação a 4 °C por 30 min. Os MoAb usados foram os anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-CD122, anti-GIRT, anti-CD25, anti-CD127, anti-CD44, anti-CD69 e anti-CD103 obtidos comercialmente da empresa BD-PharmingenTM. Para a marcação do fator de transcrição FoxP3, as moléculas externas das células, CD25, CD4 ou GITR, foram marcadas e após lavagem com staining buffer, incubadas em solução Cytofix/cytopermTM (Kit Cytofix/cytopermTM Plus da BD Bioscience) por 30 min, ao abrigo da luz. Após lavagem das células com PBS por centrifugação, adicionou-se solução de PBS, 0,1% paraformaldeído e 0,05% de Tween 20, seguindo-se nova incubação de 30 min, ao abrigo da luz. Após lavagem com PBS por centrifugação as células foram incubadas com anticorpo anti-FoxP3 da eBioscienceTM conjugados a FITC ou PE. Como controle utilizou-se o anticorpo isótipo de FoxP3 que é o anticorpo de rato da classe IgG2a- κ marcados com FITC ou PE (eBioscienceTM). Após lavagem com staining buffer por 3 vezes, as células foram ressuspensas em 0,3 mL de tampão e submetidas a citometria de fluxo em aparelho FACScan - Becton Dickinson Mountain View, USA. A análise dos dados foi realizada em

programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software) e os resultados foram expressos em figuras e gráficos.

4.8 Obtenção do Ag de *T. cruzi*

Parasitas provenientes do sobrenadante das culturas em células do rim de macaco (Lipid metabolism of monkey kidney - LLC-MK-2) foram lavados 3 vezes em PBS estéril por centrifugação e submetidos a 20 ciclos de congelamento e descongelamento para rompimento da membrana plasmática como descrito na literatura (SAKAGUCHI et al., 1995). A concentração de antígeno foi ajustada para $1,5 \times 10^8$ parasitas/mL e aliquotas de 1 mL foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.9 Determinação da produção de IFN- γ por células T

Para detecção intracelular de IFN- γ foi utilizado o kit de permeabilização Cytotfix/Cytoperm™ Plus (BD Biosciences), conforme protocolo do fabricante. Em resumo, 1×10^6 esplenócitos foram diluídas em solução com Stop Golgi (monensina) e incubadas na presença de antígeno de *T. cruzi* ou anti-CD3, por 12 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa de CO_2 . Após a incubação, foi realizada marcação extracelular das moléculas CD4 e CD8. Após esta etapa, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytotfix/Cytoperm por 20 minutos e em seguida lavadas com Permwash. As células foram incubadas com anticorpos anti-IFN- γ e após lavagem foram ressuspensas em 0,3 mL de staining buffer. As células marcadas foram submetidas à citometria de fluxo e a análise dos resultados foi feita em programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software).

4.10 Ensaio de Proliferação

Os esplenócitos (3×10^7) obtidos como descrito anteriormente, em condição estéril, foram incubados em 5 mL de tampão PBS, BSA 0,1% e carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) 5 nM, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 minutos. Após esta incubação, realizou-se a lavagem das células em RPMI suplementado com 3% de SBF. Nova

incubação a 37 °C, em RPMI suplementado com 3% de SBF foi realizada para eliminação do CFSE não adsorvido. Após centrifugação e eliminação do sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SBF, 2 mM L-glutamina, 2 mM de piruvato, 5,5 mM de 2-mercaptoetanol e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (10.000 Unid/mL e 10.000 µg/mL). As suspensões de células foram adicionadas em poços em duplicata em placas de 96 poços. Em cada poço foram adicionadas 1×10^6 de células diluídas em 200 µL de meio (controle negativo), para o controle positivo foram adicionados anti-CD3 na concentração de 0,3 µL/mL e para a proliferação antígeno-específica foram adicionados 10 µL de solução contendo lisado de *T. cruzi* (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ formas tripomastigotas). Após cultura de 72 ou 96 h, os esplenócitos foram lavados em staining buffer e incubados com anti-CD4-PE e anti-CD8- CyChrome, por 30 min, a 4 °C. Após lavagem por centrifugação os esplenócitos foram submetidos a citometria de fluxo. A análise dos resultados foi feita em programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software).

4.11 Ensaio de Proliferação de esplenócitos totais ou células CD25⁻

Este ensaio foi realizado para avaliarmos se a depleção de células CD25⁺ dos esplenócitos de animais crônicos (CD25⁻) teria com consequência uma maior proliferação quando esses, em cultura, fossem estimulados com antígenos específicos (solução de lisado de *T. cruzi*). Para cada tratamento foi utilizado um baço de animal crônico (5º mês de infecção). Os baços dos camundongos C57BL6 foram macerados em RPMI suplementado com 3% SBF e após centrifugação e eliminação do sobrenadante adicionou-se tampão de lise, incubando-se por 4 minutos a 0 °C. Após 3 ciclos de lavagem com RPMI suplementado com 3% de SBF, os esplenócitos utilizados para obtenção de células CD25⁻ foram ressuspensos em 2 mL de tampão PBS, pH 7,2, BSA 0,5% e EDTA 2 mM ao qual se adicionou 25 µL de anticorpo anti-CD25-PE. Após incubação de 20 minutos seguida de 3 ciclos de lavagem o pellet de células foi ressuspensão em 2 mL de tampão ao qual se adicionou 200 µL de solução de beads anti-PE. Após incubação e 3 ciclos de lavagem as células foram submetidas à coluna imantada que reteve as células

CD25⁺. A fração negativa para CD25 ainda foi submetida à passagem por uma nova coluna para retenção de eventuais células marcadas que não tivessem sido retiradas na primeira passagem. A avaliação da pureza das células foi feita por citometria de fluxo após marcação com FoxP3-FITC e CD4-Cycrome e análise pelo programa FlowJo (Flow Cutometry Analysis Software).

As células foram adicionadas em duplicata em número de 1×10^6 por poço em 200 μL meio de cultura completo com $1,5 \times 10^6$ tripomastigostas lisados, para outros tratamento foram adicionados anticorpos anti-IL2 (MoAb JES6-IA12) ou IL-2 recombinante (PeproTech).

4.12 Citocinas de esplenócitos estimulados com ag (*in vitro*)

A determinação dos níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5 do sobrenadante de culturas de 72 h de esplenócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* foi realizada pela utilização do kit CBA (Cytometric Bead Array) Th1/Th2 conforme recomendações do fabricante (BD Biosciences). A cada 50 μL de amostra de sobrenadante ou diluições padrão das citocinas Th1/Th2 adicionou-se um pool de beads de captura específicas para todas as citocinas citadas. A essas misturas foi adicionado o reagente de detecção conjugado ao fluorocromo PE. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, na ausência de luz, foram adicionados aos tubos 1 mL de tampão de lavagem seguindo-se a centrifugação a 200 x g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e os pellets de beads foram ressuspensos em tampão de lavagem para serem submetidos a citometria de fluxo, de acordo com a intensidade de fluorescência de cada bead de captura em FL3, para cada citocina. As concentrações das citocinas foram determinadas através da média de fluorescência em FL-2 com base na curva padrão obtida para cada citocina. O limite de detecção para todas as citocinas foi 20 pg/ml. A análise dos resultados foi feita em programa FlowJo (Flow Cutometry Analysis Software).

4.13 Real Time – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

As amostras de tecido do coração foram imediatamente armazenadas em criotubos imersos em nitrogênio líquido. Para extração do RNA utilizou-se um homogenizador de tecidos (MA102, Marconi) para processar as amostras adicionadas de Trizol (Invitrogen). A extração do RNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram estimadas por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e cálculo da razão 260/280, respectivamente (Biophotometer, Eppendorf). As amostras de RNA 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) e Oligo dT(12-18) primer (Invitrogen) em 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 temperaturas do fabricante dos reagentes. As amplificações por PCR foram realizadas em duplicatas e utilizando 50 ng de cDNA por reação. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems) adicionado dos conjuntos de primers e sonda específico para o gene IFN- γ . As condições da reação foram 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

5 RESULTADOS

5.1 Fenotipagem de células T_{REG} na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar o impacto da infecção por *T. cruzi* sobre a população de células T_{REG} (TCD4⁺CD25⁺) foi realizada a fenotipagem dessa subpopulação na fase aguda e na fase crônica da doença de Chagas.

Para o estudo da fase aguda foram utilizados camundongos C57BL6 e 10³ formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y inoculadas por via intra-peritoneal. Na fenotipagem celular de fase aguda, inicialmente, foram utilizados anticorpos específicos marcados com fluorocromo para as cadeias α e β do receptor de IL2 (IL-2R), CD25 e CD122, respectivamente, e a molécula CD4. Três subpopulações TCD4⁺ foram definidas no baço de camundongos C57BL/6 não infectados: 10% apresentaram fenótipo de T_{REG} (SAKAGUCHI et al., 1995), com tamanho pequeno, expressão intermediária de CD122 e expressão alta de CD25, chamada no texto de CD122^{INT}CD25⁺; 10% apresentaram uma expressão discretamente maior de CD122 e menor expressão de CD25 em relação a anterior, a que chamamos de CD122⁺CD25^{LOW} e 75% apresentaram fenótipo CD25⁻CD122⁻ (Figura 1). A análise populacional do baço na infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y foi realizada no dia 14 de infecção, data na qual a parasitemia está quase controlada, mas quando se observa o pico no número total de esplenócitos. Em concordância com esta observação, no dia 14 da infecção por *T. cruzi* da cepa Y, observa-se que nos camundongos C57BL/6 há um aumento drástico no número total de células TCD4⁺ esplênicas. Nos quatro experimentos de fase aguda observamos que o número de células TCD4⁺ aumenta em média 4 vezes no décimo quarto dia de infecção. Para o experimento representado pela figura 1, o aumento no número de células TCD4⁺ é de 4,1 vezes, sendo de 10,3 x 10⁶ para os animais controle e de 4,2 x 10⁷ (P < 0,005) para os animais infectados, com impacto diferenciado nas diferentes subpopulações.

Assim, apesar de afetar as 3 subpopulações TCD4⁺ definidas pela expressão de CD122 e CD25, o aumento no número de células é mais acentuado na subpopulação CD122⁺CD25^{LOW}, que passa de 1,1 x 10⁶ nos animais controle para

$21,5 \times 10^6$ nos animais infectados, o que representa 20,5 vezes ($P < 0,001$) (Figura 1). Nas populações $CD122^{INT}CD25^+$ e $CD122^-CD25^-$ esplênicas o aumento é mais discreto, de 3,6 e 1,7 vezes, respectivamente ($P < 0,01$ e $P < 0,05$). Um acréscimo no número de blastos (dados não mostrados) acompanha o aumento dos números totais, com destaque para a população $CD122^+CD25^{LOW}$, na qual o número de células aumenta 31 vezes ($P < 0,001$) nos esplenócitos de animais infectados. Para as populações $CD122^{INT}CD25^+$ e $CD122^-CD25^-$ os valores aumentam 7,3 vezes ($P < 0,001$) e 3,0 vezes ($P < 0,005$), respectivamente, no décimo dia de infecção. É importante destacar que a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD122 das células $CD122^{INT}CD25^{HIGH}$, população que inclui as T_{REGs} , aumenta com a infecção, sendo os valores de 17,0 e 34,2 para os animais controle e infectados por 14 dias, respectivamente. Os resultados destes experimentos sugerem que embora CD122 seja um bom marcador de células T_{REG} no camundongo não infectado, deixa de ser característico desta população na fase aguda da doença.

Caracterização de esplenócitos de camundongos controle e infectados (14 d) Expressão de CD122 versus CD25 de TCD4⁺

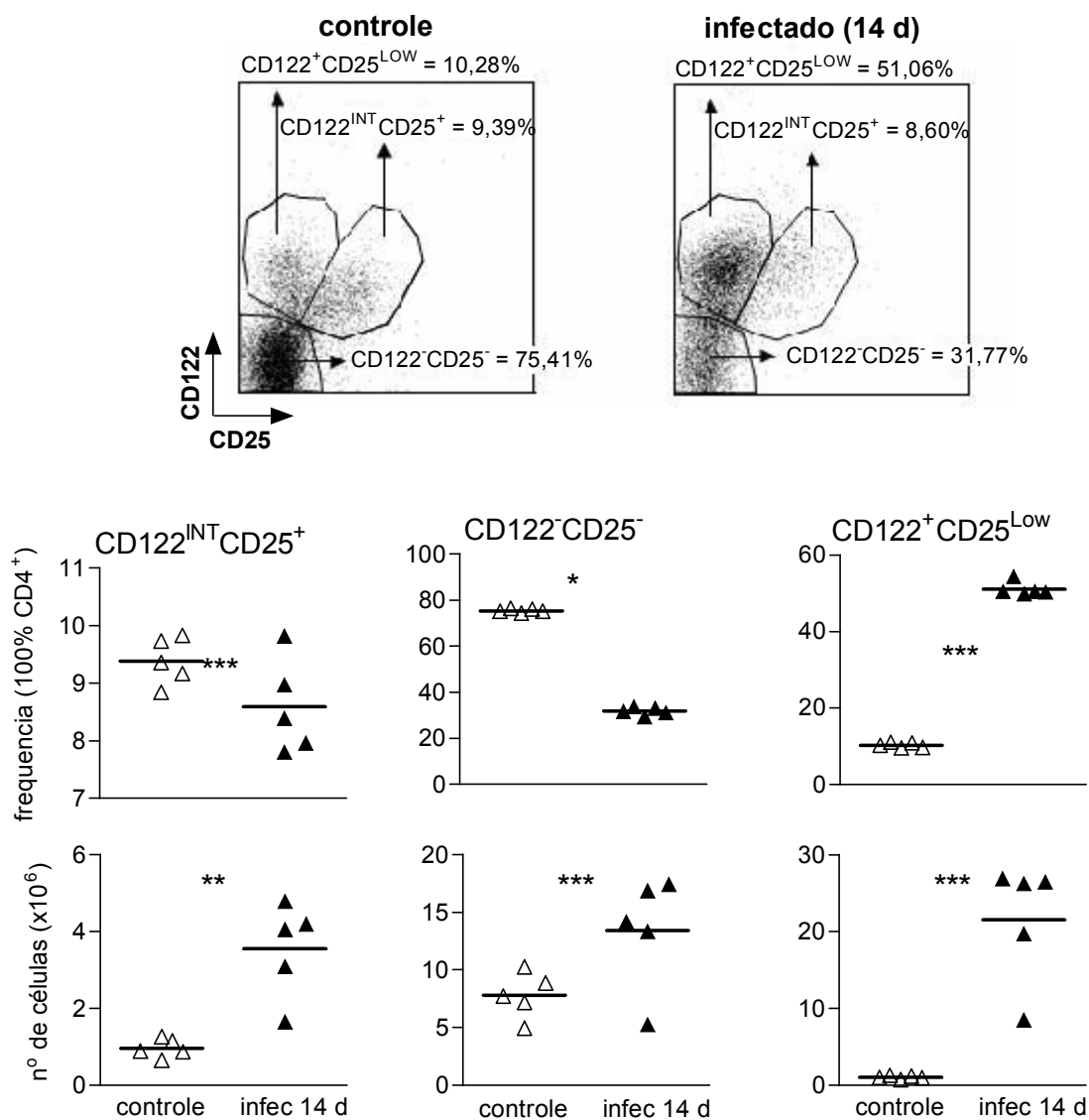


Figura 1. Expressão de CD25 por CD122 das células TCD4⁺ de camundongos C57BL/6 controle e no 14º dia de infecção com 10³ formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Dot-plots representativos de animais controle e infectados de 4 ensaios (acima) e frequência e número total por baço das subpopulações CD4⁺ (abaixo).

A necessidade de um marcador mais específico para a população de células T_{REG} nos levou a utilizar anticorpos anti-fator de transcrição FoxP3, descrito como marcador exclusivo desta população (SAKAGUCHI et al., 1995). Utilizamos anti-FoxP3 em associação com outros marcadores também presentes nesta população, para caracterizar esplenócitos de camundongos controle e infectados por 7 e 14 dias

com *T. cruzi*. A porcentagem de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ (T_{REG}) nos animais controle foi aproximadamente 10%, em concordância com os dados da literatura (FONTENOT *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003), mas nos animais infectados observamos um pequeno decréscimo de frequência no dia 7 de infecção e uma diminuição mais intensa no dia 14 da infecção (Figura 2).

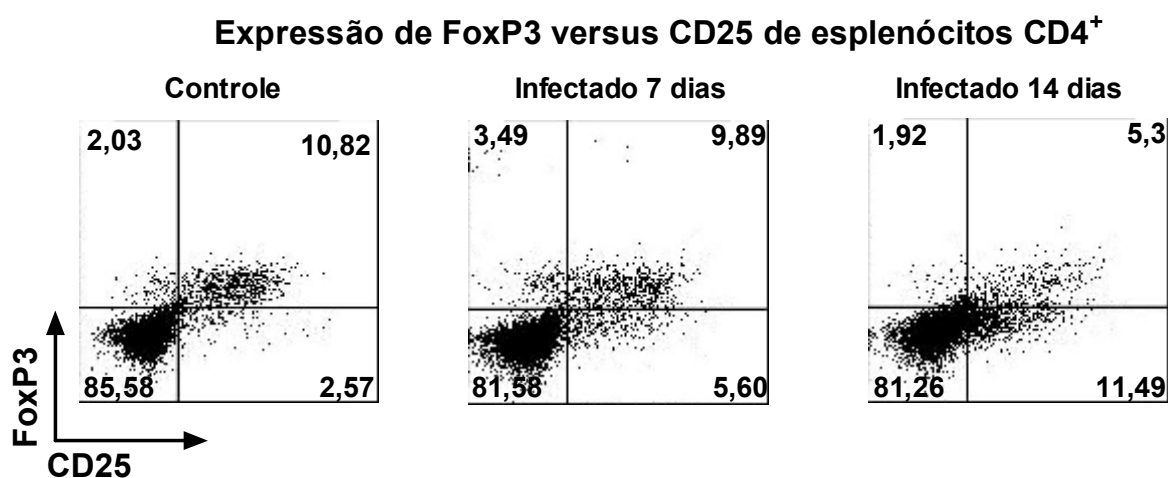


Figura 2. Dot-plots representativos da expressão de FoxP3 versus CD25 dos esplenócitos CD4^+ de animais C57BL/6 controle ou infectados por *T. cruzi* da cepa Y, 7º ou 14º dia.

O aumento significativo no dia 14 de infecção da frequência de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$, população que poderia estar constituída por células ativadas/efetoras, nos levou a analisar a população $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ em função da expressão de FoxP3 por tamanho, a fim de verificar se entre as células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$ havia maior frequência de blastos (Figura 3). Esta análise permitiu diferenciar claramente as células FoxP3^+ e FoxP3^- dentro da subpopulação $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, e verificar que as primeiras são predominantemente células pequenas, tanto para os animais controle quanto para os infectados. Por outro lado, a população $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$, constituída na sua maioria por blastos e minoritária nos animais controle, aumenta 8 vezes em frequência aos 14 dias de infecção, o que reforça a possibilidade de se tratar de células ativadas/efetoras.

A análise de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ do baço de animais infectados, de acordo com a expressão de FoxP3 por tamanho (FSC), permite visualizar a população de células grandes que invade o quadrante de células grandes FoxP3⁺. Esta invasão parece ocorrer por uma ligação de anticorpo FoxP3 inespecífica, uma vez que, uma invasão similar ocorre quando utilizamos anticorpo controle isotópico (IgG2a- κ de rato anti- β galactosidase de *E. Coli*) (Figuras 3 e 4).

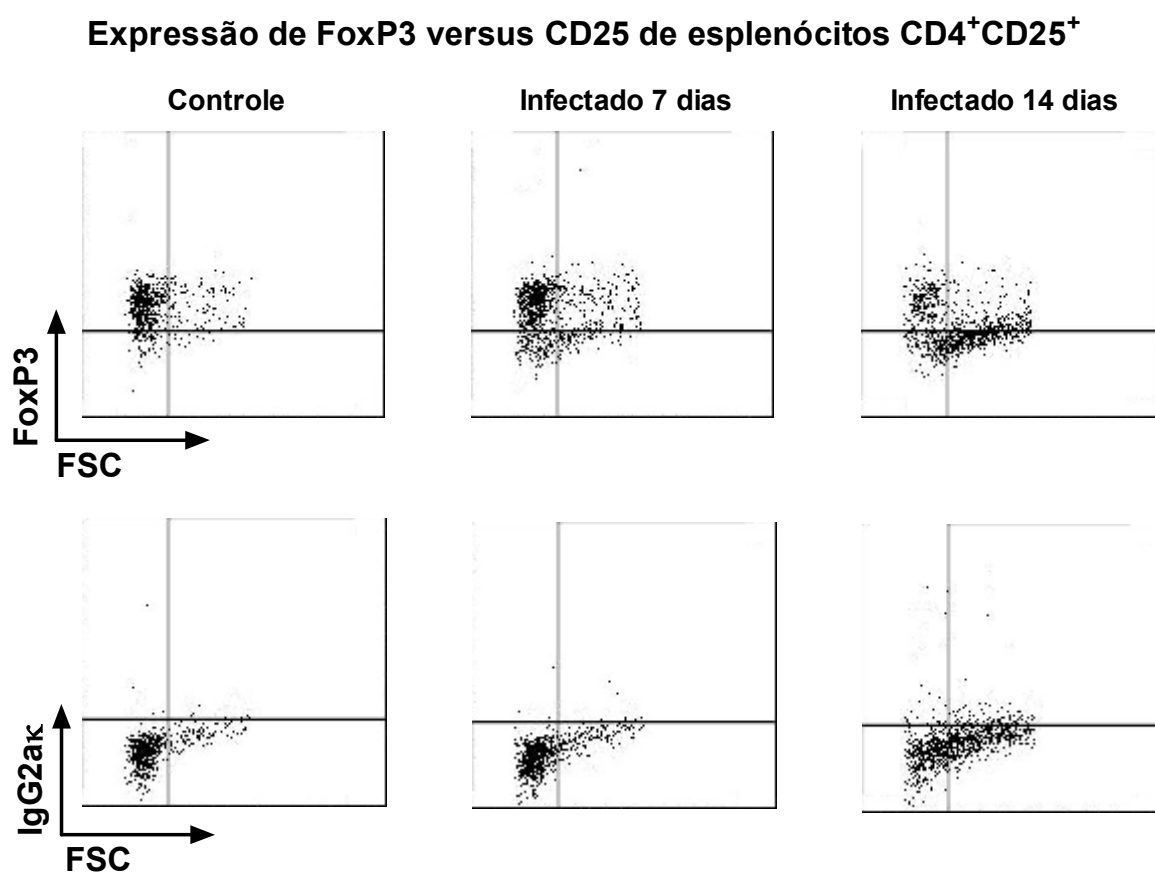


Figura 3. Dot-plots representativos da expressão de FoxP3 em função do tamanho nos esplenócitos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ de animal C57BL/6 controle e animais C57BL/6 no 7^o ou 14^o dia de infecção por *T. cruzi* da cepa Y.

Após delimitar nova janela para as células T_{REG} (Figura 4A), observamos que a frequência de células pequenas FoxP3⁺ no 14^o dia da infecção diminui de 50 a 65% enquanto que a população total de linfócitos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ diminui de 40 a 60%. Para o experimento representado na Figura 4B, no 14^o dia da infecção, há uma diminuição na frequência de $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ de 50%.

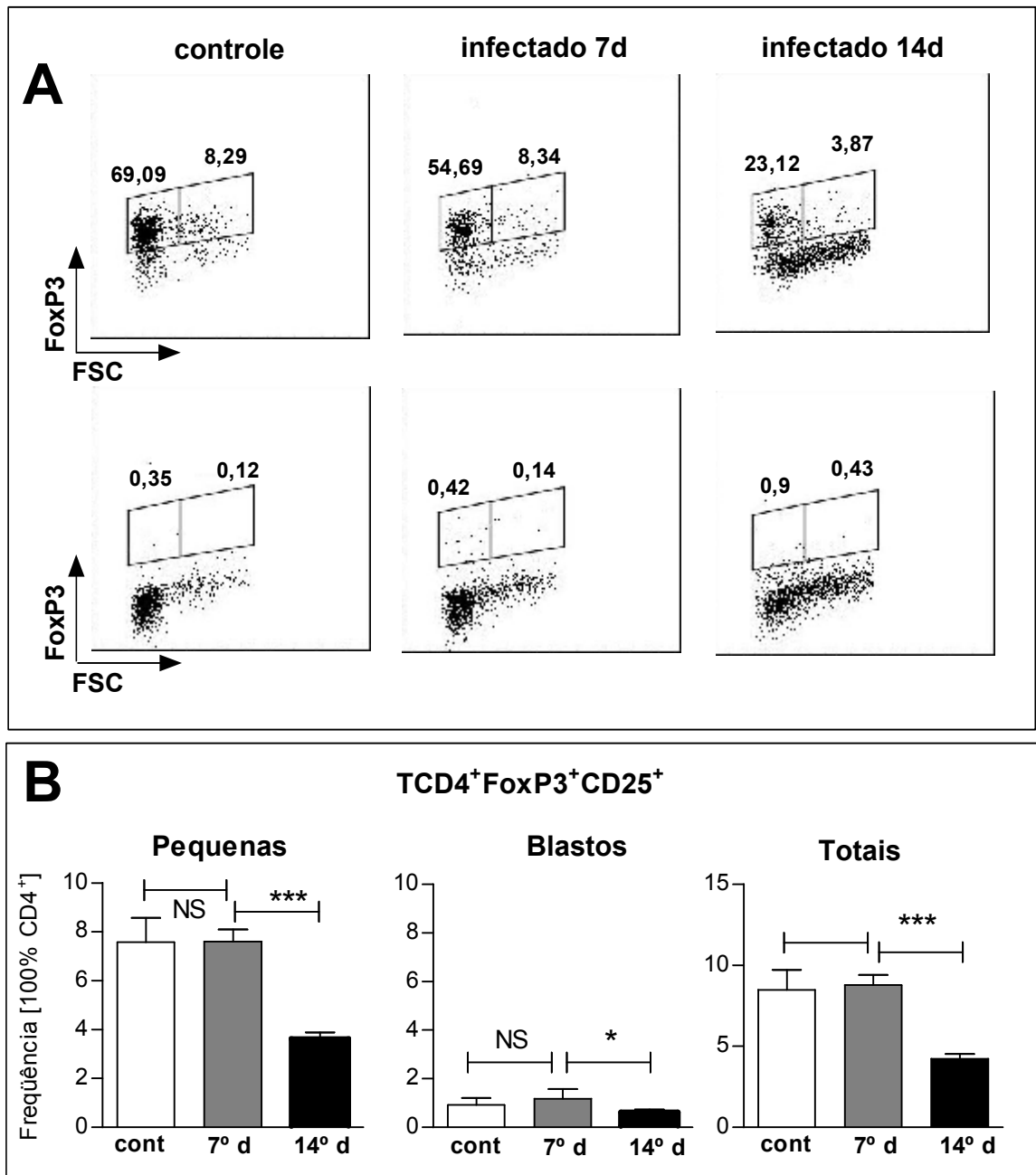
Expressão de FoxP3 versus tamanho de células TCD4⁺CD25⁺

Figura 4. (A) Dot-plots representativos da marcação intracelular com anticorpo anti-FoxP3 e controle (n=4) isotípico de células TCD4⁺CD25⁺ do baço de camundongos C57BL/6 controle, no 7º dia (n = 5) e 14º dia (n = 5) de infecção por *T. cruzi* da cepa Y. (B) Frequências de células CD25⁺FoxP3⁺ (pequenas, blastos e totais) na janela das células TCD4⁺.

Se em termos de frequência ocorre uma diminuição, em relação ao número total de células $\text{TCD4}^+\text{FoxP3}^+\text{CD25}^+$ esplênicas ocorre um aumento de duas vezes ($P < 0,005$), mudando de $1,3 \times 10^6$ nos animais controle para $2,7 \times 10^6$ nos animais no 14º dia da infecção (Figura 5), não se observando nenhuma mudança no 7º dia de infecção com relação ao grupo controle (dados não mostrados). Em nossas análises, observamos que a expressão de FoxP3 não está restrita à população de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, mas há células FoxP3^+ que não expressam, ou expressam níveis muito baixos da molécula CD25. Por esse motivo, a partir deste momento, a análise foi feita somando-se as populações $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ e $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-\text{FoxP3}^+$. No experimento mostrado na Figura 5, não ocorrem diferenças com significância estatística entre o número médio de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-\text{FoxP3}^+$ do baço de animais controle e no 14º dia de infecção. Para o número total de células FoxP3^+ , representada pela soma das populações $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ e $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-\text{FoxP3}^+$, ocorre um aumento de 75%, sendo de $2,0 \times 10^6$ para os animais controle e $3,5 \times 10^6$ para os animais no 14º dia da infecção ($P < 0,05$).

O fato do aumento no número de células apresentado após a infecção pelas células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ ser pequeno quando comparado ao das células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-\text{FoxP3}^+$, explica por que a frequência das primeiras diminui no baço dos animais infectados.

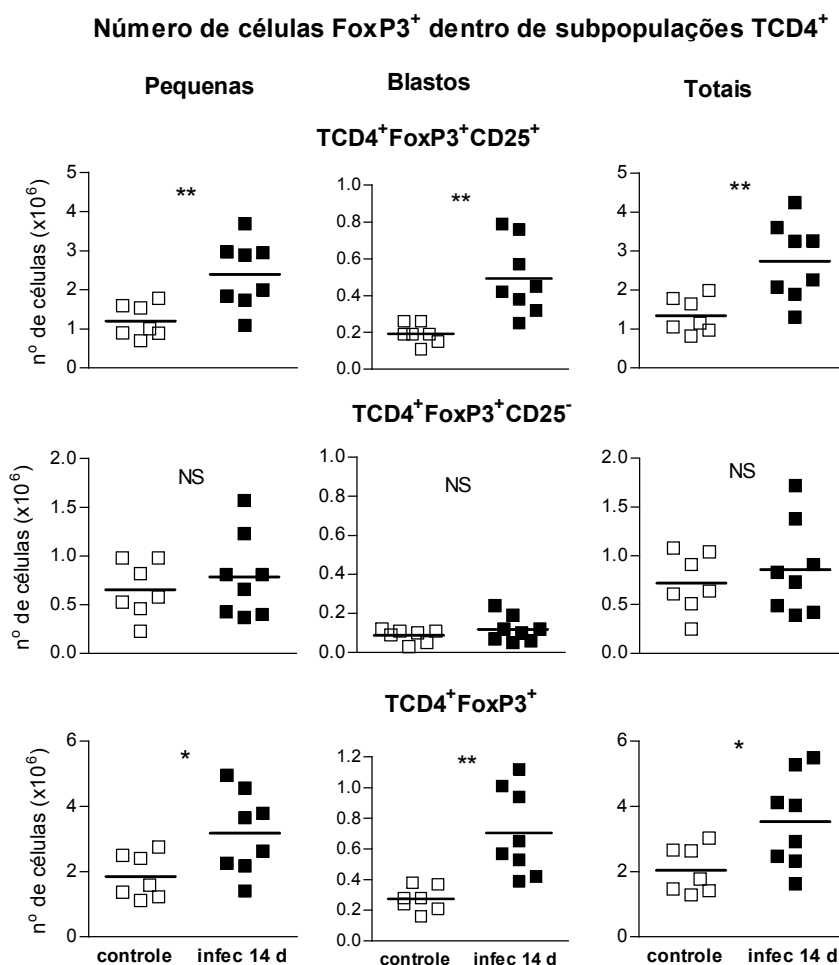


Figura 5. Número de esplenócitos TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, TCD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ e TCD4⁺FoxP3⁺ (pequenos, blastos e totais) de animais C57BL/6 controle (n = 7) e no 14º dia de infecção por *T. cruzi* da cepa Y (n=8).

Recentemente foi sugerido que a atividade reguladora das T_{REG} depende não somente do número absoluto de células desta população, mas da quantidade de moléculas FoxP3 por célula (LIU et al., 2006a). Neste contexto, analisamos se na infecção aguda pelo *T. cruzi* ocorre uma mudança na expressão de FoxP3 nas células TCD4⁺FoxP3⁺. A MFI de FoxP3 das células do baço TCD4⁺FoxP3⁺ nos dias 7 e 14 de infecção se mostrou idêntica (Figura 6). Por outro lado, em relação MFI de CD25 é importante mencionar que em concordância com a literatura, para ambos os grupos (controle e infectado), a expressão (MFI) dessa molécula foi maior para as células TCD4⁺FoxP3⁺ do que para as células efectoras TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ (Figura

6). Além disso, no 14º dia de infecção observa-se um aumento importante da expressão de CD25 nas células FoxP3⁺. Além disso, observa-se que para a população FoxP3⁻ há um aumento na mediana de fluorescência de CD25 no 7º dia de infecção com significância estatística ($P < 0,05$) e uma diminuição desta no 14º dia de infecção que a equipara ao animal controle.

Mediana de fluorescência de FoxP3 e CD25 dentro da população FoxP3⁺ e FoxP3⁻

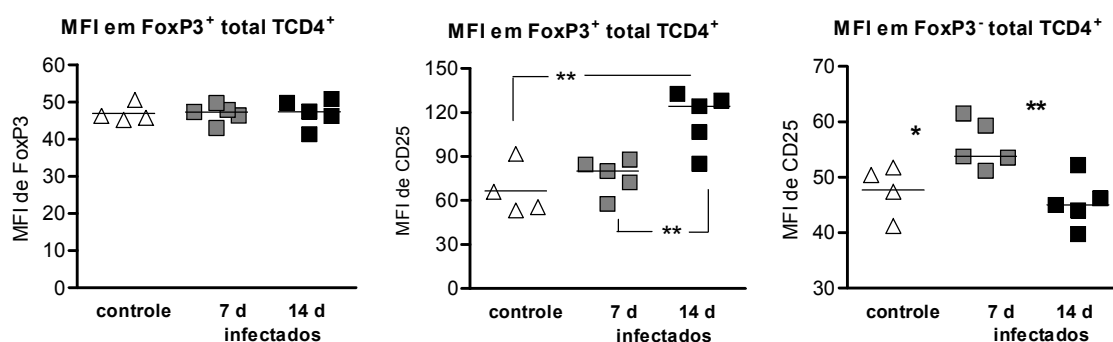


Figura 6. Mediana de fluorescência de FoxP3 e CD25 nas populações TCD4⁺FoxP3⁺ e TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ do baço de animais C57BL/6 controle ou no 7º ou 14º dia de infecção por *T. cruzi* da cepa Y.

5.2 Conclusão parcial

No 14º dia da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y há um aumento no número de células CD4⁺FoxP3⁺ esplênicas que não chega a 2 vezes, enquanto que para a população TCD4⁺ o aumento é de 4 vezes.

O nível de expressão (MFI) da molécula FoxP3 pelas células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas não muda com a infecção. Já para a expressão de CD25 e de CD122, há um aumento na expressão dessas moléculas nas células TCD4⁺FoxP3⁺.

5.3 Fenotipagem por molécula GITR e CD127

Devido à necessidade de purificação de células T_{REG} para avaliação da atividade supressora ao longo da infecção aguda e uma vez que não é possível

separar/eliminar diretamente das células FoxP3⁺, procuramos outros marcadores que poderiam ser utilizados como alvo para a depleção *in vivo*. Outro marcador descrito como característico das T_{REG}, o GITR (SHIMIZU et al., 2002), quando utilizado em conjunto com CD25, define três subpopulações nos esplenócitos CD4⁺ dos camundongos não infectados. A que apresenta maior expressão de CD25, que deve incluir as células T_{REG}, expressa níveis intermediários de GITR (Figura 7). Ao avaliarmos a expressão de GITR por TCD4⁺ nas células do baço de camundongo aos 14 dias de infecção, observamos que a subpopulação de células GITR^{INT}CD25⁺ sofre um aumento de 6,3 vezes no número total de células (de 0,97 x 10⁶ para 6,13 x 10⁶; P < 0,001; Figura 7) e de aproximadamente 11 vezes no número de blastos (P < 0,001), que corresponde a um aumento na frequência de 23% para 35% (P < 0,0001). Esse aumento é muito superior ao observado para as células FoxP3 dos animais infectados, que no máximo dobra com a infecção. Assim, esse fenótipo poderia representar as T_{REG} em animais controle, mas não em animais infectados. O aumento no número de células da subpopulação GITR^{INT}CD25⁺ foi, entretanto, muito inferior ao observado na subpopulação GITR^{HIGH} que aumentou 62,4 vezes, passando de 0,21 x 10⁶ nos animais controle para 13 x 10⁶ após 14 dias de infecção (P < 0,001). A subpopulação GITR^{CD25} aumentou 4,1 vezes, passando de 7,7 x 10⁶ nos animais controle para 31 x 10⁶ nos animais infectados (P < 0,01). Da mesma forma ao que ocorre com a molécula CD122, houve um aumento da expressão de moléculas GITR nas células CD25^{HIGH} após a infecção pelo *T. cruzi* (a mediana de fluorescência aumentou de 71,6 para 162,0, o que equivale a 2,3 vezes (ver dot-blots da figura 7 e dados não mostrados).

Caracterização de esplenócitos de camundongos controle e infectados (14 d) - expressão de GIRT versus CD25 em TCD4⁺

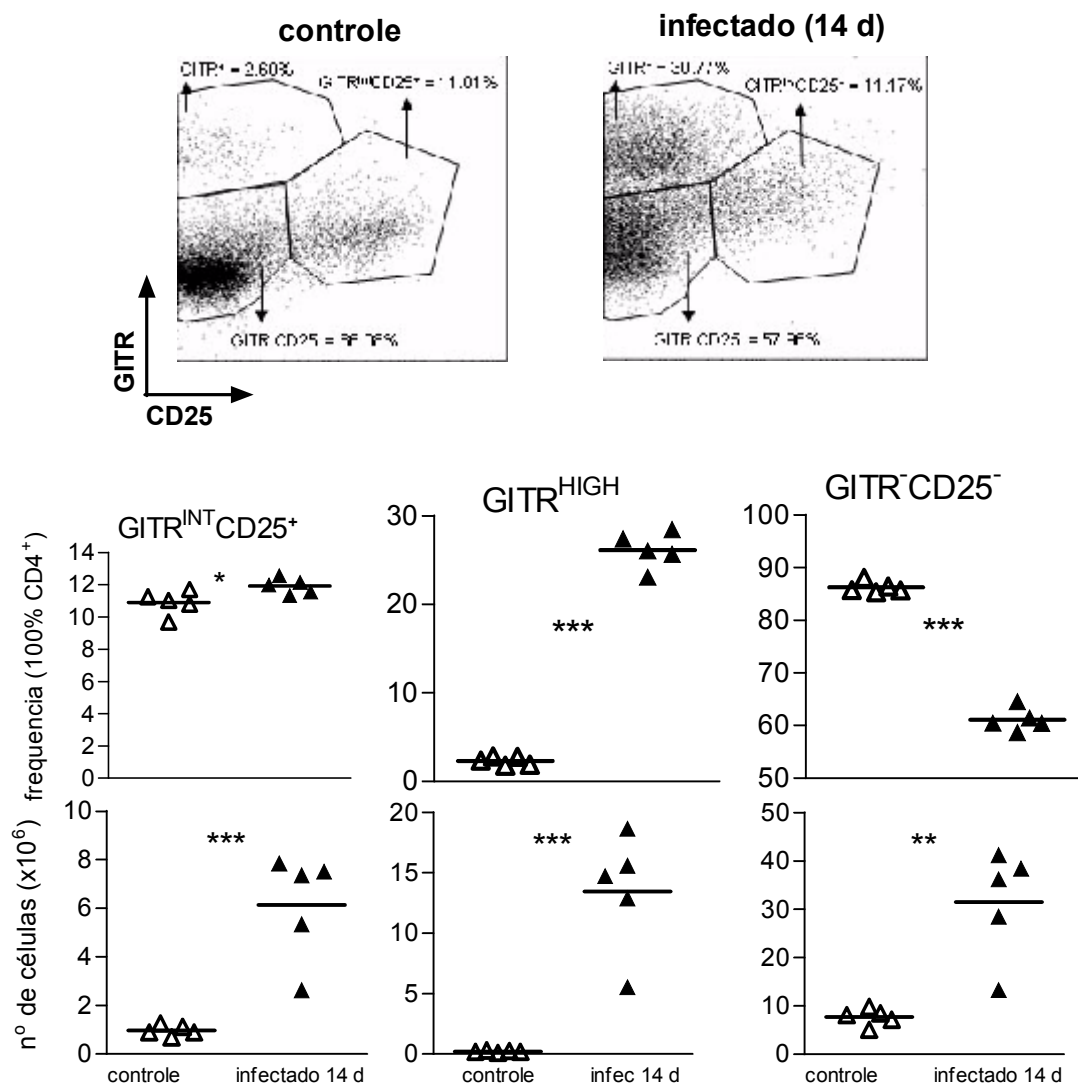


Figura 7. Expressão de CD25 versus GIRT das células TCD4⁺ de camundongos C57BL/6 controle e infectados (14^o dia) por *T. cruzi* da cepa Y. Dot-plots representativos de 4 ensaios (acima) e frequência e número total por baixo das subpopulações TCD4⁺ (abaixo).

Os resultados deste experimento indicam que o marcador GIRT não é apropriado como alvo para o tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais (MoAb) para a depleção de células T_{REG}. Com o objetivo de encontrar uma estrutura de membrana alternativa que possibilitasse separar por “sorting” as células T_{REG} dos animais infectados, avaliamos a expressão de CD127, a cadeia alfa do receptor para

IL-7 (LIU et al., 2006b), em paralelo à análise de FoxP3, pelas células TCD4⁺ esplênicas em camundongos infectados com *T. cruzi* da cepa Y e camundongos controle. Os resultados mostraram que no animal controle as células T_{REG} (TCD4⁺FoxP3⁺), pequenas ou blastos, têm uma expressão da molécula CD127 intermediária entre a expressão baixa observada nas células TCD4⁺ experimentadas e a expressão mais elevada própria das células TCD4⁺ naive (Figura 8). Curiosamente, a infecção aguda pelo *T. cruzi* não altera a expressão desta molécula nas células TCD4⁺FoxP3⁺, sugerindo que, mesmo após a infecção, as células T_{REG} poderiam responder a IL-7. Por outro lado, na população TCD4⁺FoxP3⁻, a infecção induz um aumento importante da frequência de células TCD4⁺CD127⁻. Contudo, apesar dos nossos resultados mostrarem que as células TCD4⁺FoxP3⁺ têm um perfil diferenciado de expressão de CD127, a sua expressão intermediária impossibilita o uso deste marcador como estrutura alvo para a separação/depleção das T_{REG}.

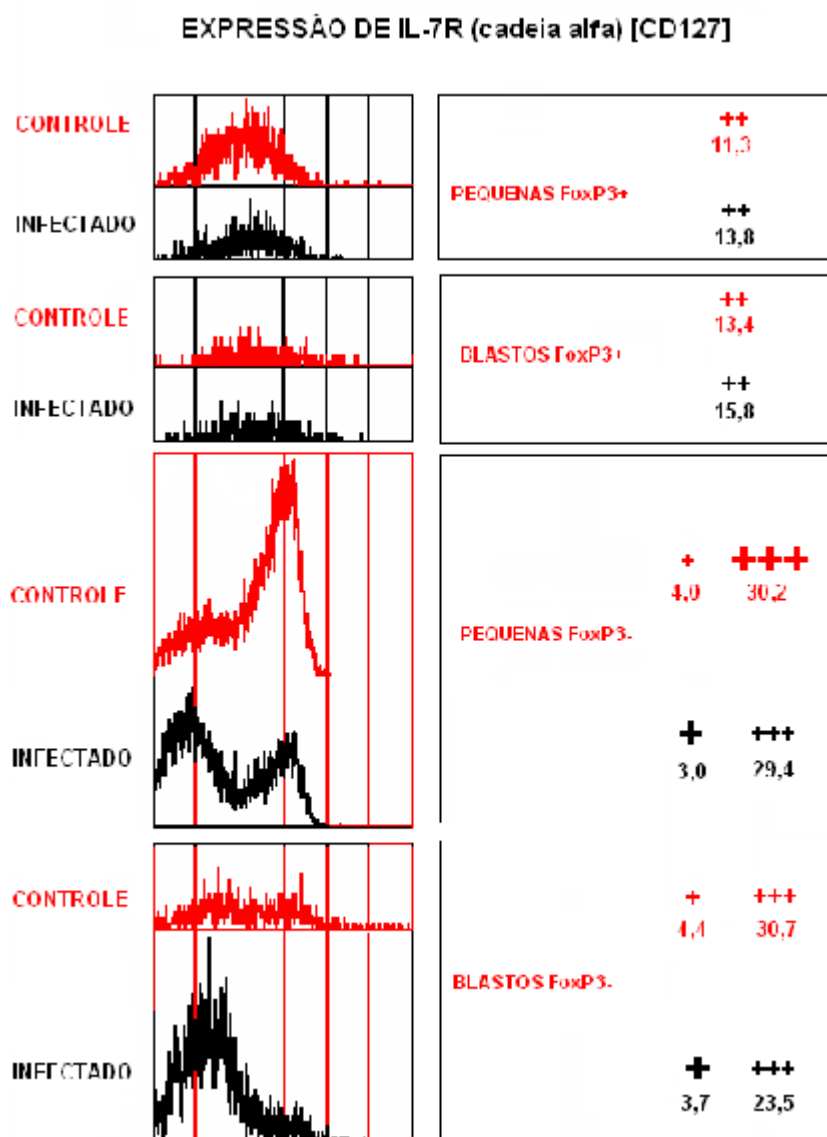


Figura 8. Expressão de CD127 (IL-7R α) por células TCD4⁺FoxP3⁺ e TCD4⁺FoxP3⁻, pequenas e grandes, no baço de camundongos C57BL/6 controle e infectados com *T. cruzi* da cepa Y. Os números à direita indicam a intensidade de fluorescência (MFI) para CD127 das diferentes subpopulações.

5.4 Conclusão parcial

Os marcadores de membrana GITR, CD122 e CD127 não possibilitam o isolamento das células TCD4⁺FoxP3⁺ do animal infectado pelas metodologias de coluna com microesferas imantadas ou “sorting”. Assim, a molécula CD25 pode ser considerada, por enquanto, o melhor alvo para se fazer a depleção das células T_{REG},

uma vez que esta população expressa os maiores níveis de CD25, tanto no animal controle, quanto no infectado.

5.5 Tratamento *in vivo* com MoAb PC61: efeito sobre a infecção aguda

Para responder à segunda questão deste projeto, que diz respeito ao papel das T_{REG} na infecção chagásica experimental, camundongos C57BL/6 foram tratados com anti-CD25 (MoAb PC61) nos dias -6, -4 e -2 em relação a infecção por *T. cruzi* da cepa Y. Nos animais tratados com anti-CD25 e não infectados não houve mudança significativa no peso dos baços em relação aos animais controle. Porém, em relação ao número de esplenócitos, observamos um discreto aumento (de 13 % em média) após tratamento com PC61, e essa diferença é significativa ($P < 0,01$) (dados não mostrados). Após a infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y, houve um aumento no número médio de esplenócitos de 3,7, 3,4 e 2,4 vezes nos animais infectados, infectados e tratados com anticorpo controle isotípico (GL113) e infectados e tratados com anti-CD25 (PC61), respectivamente, em relação aos animais controle (não infectados e não tratados com PC61). Assim, ao contrário do observado nos animais controle, após a infecção o grupo tratado com PC61 mostrou uma diminuição de 28% no número de esplenócitos em relação ao grupo tratado com GL113 ($P = 0,058$). O menor aumento no número de esplenócitos nos animais tratados com PC61 e infectados poderia sugerir uma interferência do anticorpo na expansão clonal pela IL-2 das células ativadas/efetoras. Alternativamente, a queda de 28% no índice de expansão (de 3,4-3,7 vezes para 2,4 vezes) poderia resultar de um estado de pré-ativação celular em consequência do tratamento com anti-CD25 que induziria a uma maior morte celular (AICD) após a infecção pelo *T. cruzi*. Assim, no conjunto, o tratamento com anti-CD25 resulta em discreto aumento de número de esplenócitos nos animais controle e em pequena queda nos animais infectados por 14 dias.

Nos animais controle, após 16 dias da finalização do tratamento os animais tratados não infectados mostraram uma redução intensa da frequência de esplenócitos $TCD4^+CD25^+$ ($FoxP3^+$ e $Foxp3^-$) em relação aos animais não tratados (Figura 9). Já nos animais tratados e infectados, na análise de CD25 versus $FoxP3$ é

muito difícil verificar as mudanças induzidas pelo tratamento na população de células TCD4⁺CD25⁺ (Figura 9).

Para contornar esta dificuldade na análise dos animais infectados, os efeitos do tratamento com PC61 foram também estimados pela análise da população TCD4⁺CD25⁺ de acordo com a expressão de FoxP3 por tamanho (FSC). Como em ensaios anteriores, foi delimitada uma janela que exclui/minimiza a entrada da população que vem do compartimento de células blásticas FoxP3⁻. Dot-blots representativos desta análise estão representados na figura 10, e os dados numéricos de frequência das subpopulações na Figura 11. Nos animais não infectados o tratamento com PC61 determinou uma queda drástica na frequência de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas (Figuras 10 e 11A), e curiosamente, um aumento na frequência de blastos TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. A diminuição da frequência das células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas também ocorre nos animais tratados com PC61 e infectados, porém, essa redução não é tão intensa quando àquela observada nos animais não infectados e tratados com o mesmo MoAb. Nos animais tratados com PC61 e infectados não se observam, entretanto, diferenças entre frequência de blastos de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em relação ao seu controle (Figura 11A).

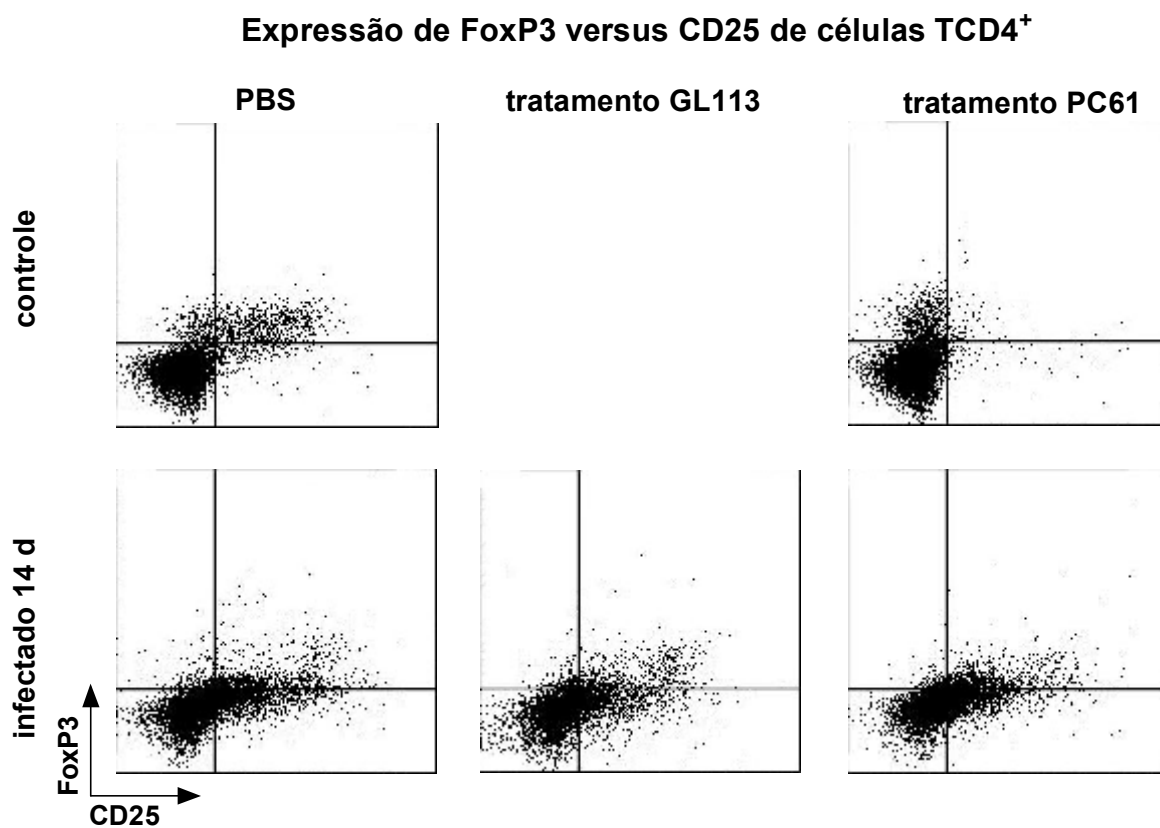


Figura 9. Dot-plots representativos da expressão de FoxP3 versus CD25 das células TCD4⁺ esplênicas de camundongos C57BL/6 controle (acima) e camundongos C57BL/6 no 14^o dia de infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y (abaixo), não tratados com anticorpos, tratados com o controle isotópico (GL113) e tratados com anti-CD25 (PC61).

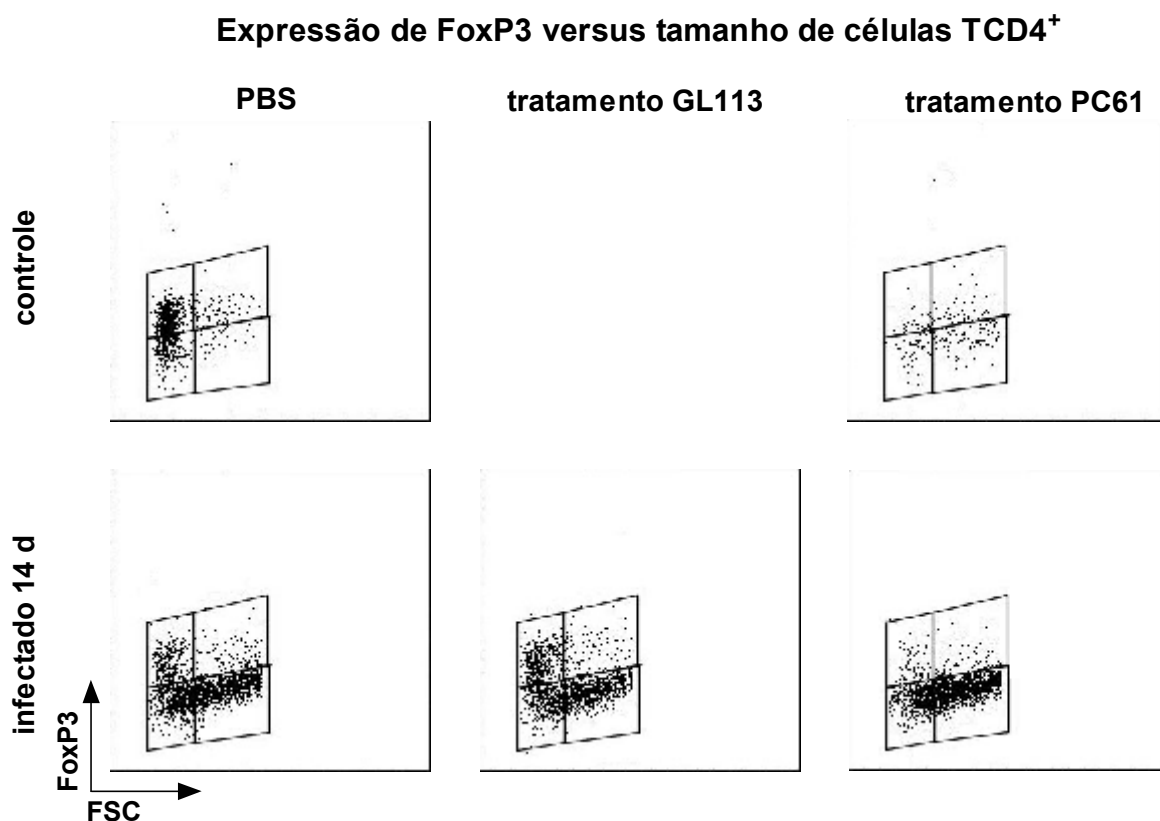


Figura 10. Dot-plots representativos da expressão de FoxP3 versus tamanho das células esplênicas TCD4⁺CD25⁺ de camundongos C57BL/6 controle tratados ou não com PC61, e infectados pelo *T. cruzi* da cepa Y (abaixo), não tratados ou tratados com MoAb controle isotópico (GL113) ou anti-CD25 (PC61).

Nestas experiências de depleção na fase aguda, a análise de CD25 foi realizada com o mesmo MoAb utilizado no tratamento, o que nos impede estimar quanto da redução observada no número de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ corresponde ao encobrimento ou modulação do epítipo. Em concordância com estas possibilidades, nos animais controle o tratamento com PC61 resultou em um aumento de frequência da população TCD4⁺CD25⁻FoxP3⁺, tanto para as células pequenas como para os blastos (Figura 11B). Já nos animais infectados, o tratamento com PC61 não alterou a frequência de células TCD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ pequenas ou blastos.

Para as células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ (células em proliferação/efetoras), tanto nos animais controle como nos animais infectados o tratamento com PC61 resultou em uma pequena redução da frequência das células pequenas e em um aumento importante da frequência de blastos (Figuras 11A, abaixo). O aumento da frequência de blastos nos esplenócitos TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ dos animais tratados com PC61 e infectados não é tão intensa quanto à observada para os animais não infectados tratados com o mesmo anticorpo, porém, as médias nos animais infectados são mais elevadas. As médias de frequência dos blastos de esplenócitos TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ dos animais infectados tratados com GL113 ou PC61 são de 54% e 73%, respectivamente, e para a mesma subpopulação nos esplenócitos de animais controle tratados com PC61 ou GL113 são de 8,5% e 50%, respectivamente (Figura 11A).

A população TCD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ total, predominante em frequência em todos os tratamentos, não sofre alterações consideráveis.

A análise global feita na população TCD4⁺FoxP3⁺ total (pequenas e blastos) mostra uma diminuição com significância estatística somente para os animais infectados e tratados com PC61. Assim, enquanto nos animais tratados com GL113 e infectados a frequência de células FoxP3⁺ entre as células TCD4⁺ é de 6,8%, nos tratados com PC61 e infectados é de 3,7% ($P < 0,05$).

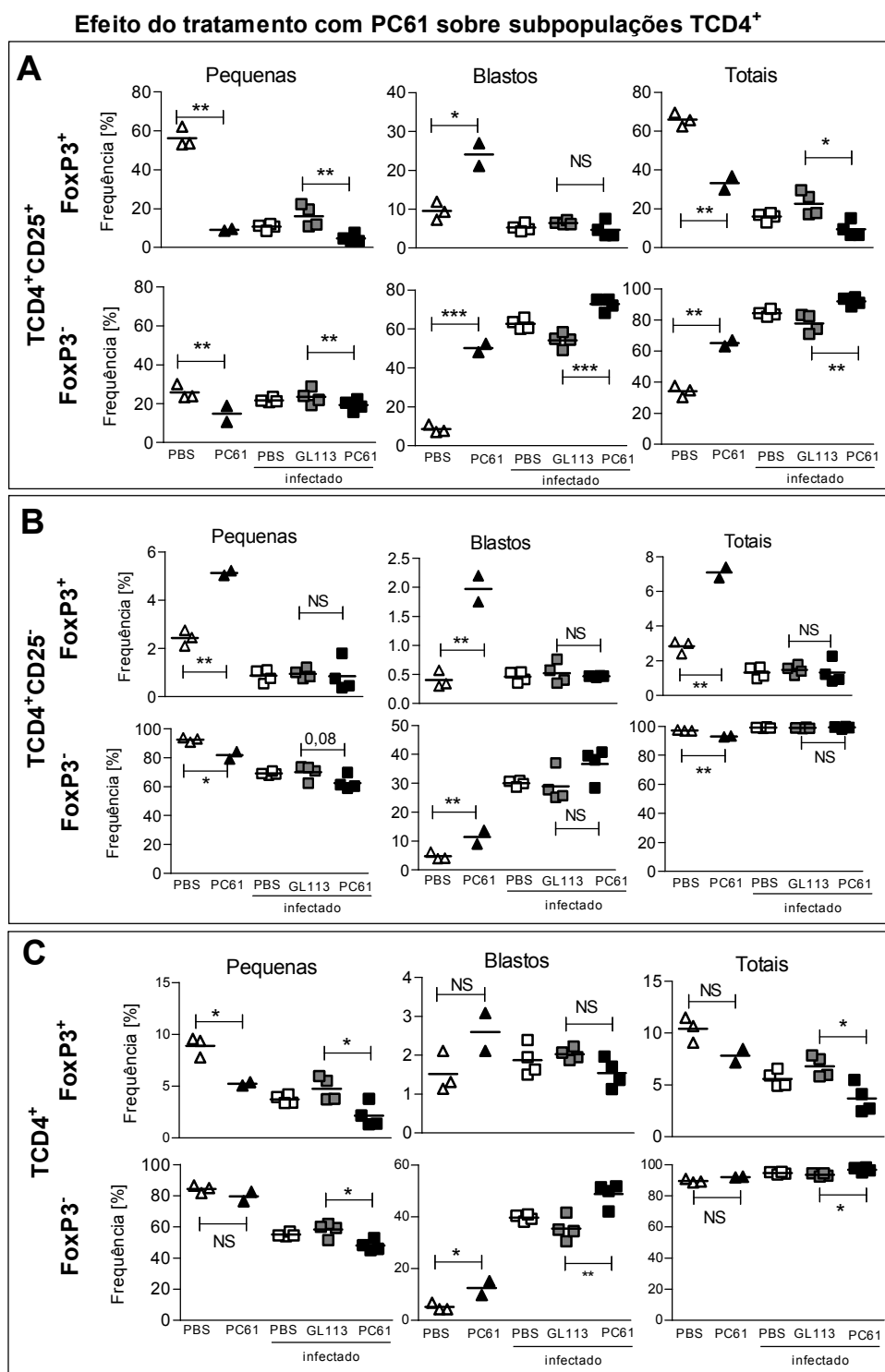


Figura 11. Frequências de células FoxP3⁺ e FoxP3⁻, pequenas, grandes e totais, nas populações (A) CD4⁺CD25⁺ (B) CD4⁺CD25⁻ e (C) CD4⁺, do baço de camundongos C57BL/6 tratados com GL113 ou PC61 e de camundongos C57BL/6 tratados com PBS, GL113 ou PC61, nos dias -6, -4, -2 em relação a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. O sacrifício dos animais foi realizado no 14º dia da infecção.

Se considerarmos os números totais de células no baço, enquanto nos animais não infectados o tratamento com PC61 resulta na eliminação quase que completa das células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas, nos animais tratados com PC61 e infectados a diminuição desta subpopulação, apesar de apresentar significância estatística, é parcial (Figura 12A). Para a população TCD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ total (o conjunto das pequenas e grandes), observa-se nos animais tratados com PC61 (não infectados) uma diminuição média de 8×10^5 células em relação aos animais controle (não infectados), passando de $0,92 \times 10^6$ para $0,12 \times 10^6$ células. Curiosamente, nos animais tratados com anti-CD25 e infectados há uma diminuição global similar, de $0,8 \times 10^6$ células, em relação aos animais tratados com GL113 e infectados, passando de $1,63 \times 10^6$ para $0,81 \times 10^6$ células (Figura 12A).

Nos animais não infectados e infectados, o tratamento com PC61 afeta principalmente o compartimento das células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas, sendo imperceptível no compartimento dos blastos TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Assim, o número de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas dos animais tratados com GL113 e infectados é $1,15 \times 10^6$ e diminui para $0,40 \times 10^6$ células nos animais tratados com anti-CD25 e infectados ($P < 0,01$) (Figura 12A). Assim, se considerarmos o decréscimo líquido no número de células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas, observamos que para no animal tratado com PC61 e infectado há uma queda de $0,75 \times 10^6$ células em relação ao animal tratado com GL113 e infectado. Esta queda é similar à observada para a mesma população nos animais tratados com PC61 e não infectados em relação aos animais não tratados (diminuição de $0,76 \times 10^6$ células) (Figura 12 A). Por outro lado, é importante frisar que, o aumento no número de células esplênicas TCD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ pequenas que ocorre nos animais tratados com PC61 e não infectados não foi observado nos animais tratados com PC61 e infectados (Figura 12A).

O conjunto dos dados nas figuras 11 e 12 permite concluir que o tratamento com PC61 induz uma queda pronunciada e com significância estatística na frequência e número de células TCD4⁺FoxP3⁺ dos animais infectados. Por outro lado, nos animais não infectados também se observa uma queda pronunciada na frequência e número de células TCD4⁺FoxP3⁺ após o tratamento com PC61, mas a

diminuição na frequência não atinge significância estatística em função do n pequeno.

Finalmente, em relação aos números de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$ (células em proliferação e/ou efectoras), observamos que o número de células pequenas se encontra diminuído no baço dos animais controle e infectados tratados com PC61. Já em relação aos blastos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$, observa-se que nos animais infectados estas células sofrem um grande aumento pós tratamento com PC61, efeito não observado no animal controle tratado (Figura 12). O aumento no número de blastos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$ nos animais tratados com PC61 e infectados é um resultado em certa forma esperado, uma vez que uma falta de regulação poderia determinar um maior número de células em ativação. Por outro lado, o aumento no número de blastos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^-$ nos animais tratados com PC61 e infectados sugere que o tratamento com MoAb anti-CD25 afeta em menor grau a população de células efectoras do que a população T_{REG} .

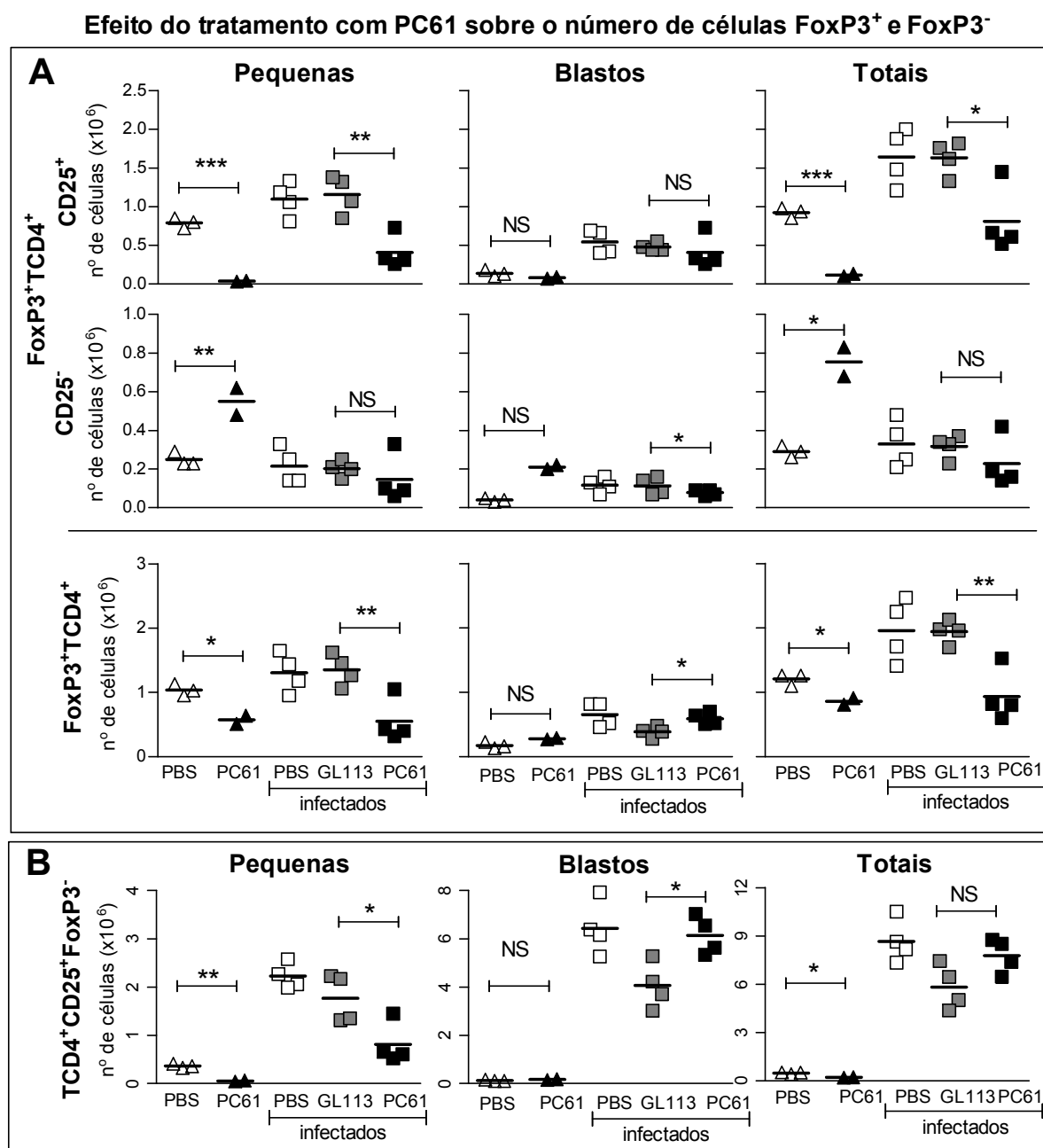


Figura 12. Caracterização fenotípica de esplenócitos de camundongos C57BL/6 tratados com G113 ou PC61, ou camundongos tratados com PBS, GL113 ou PC61 (dias -6, -4 e -2) e infectados pelo de *T. cruzi* (cepa Y) (dia 0). O sacrifício dos animais para fenotipagem das células ocorreu no 14º dia da infecção. (A) Número de FoxP3⁺ pequenas, grandes e totais das populações CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺. (B) Número de células FoxP3⁻ pequenas, grandes e total na população CD4⁺CD25⁺.

Nos animais tratados com PC61 e infectados pelo *T. cruzi*, observa-se uma diminuição pequena da expressão (MFI) de FoxP3 nas células TCD4⁺FoxP3⁺ pequenas quando se compara com a mesma população de animais infectados e tratados com GL113 (Figura 13). Já para os blastos de células TCD4⁺FoxP3⁺ dos

animais tratados com PC61 observa-se apenas uma tendência a menor expressão dessa molécula ($P = 0,058$).

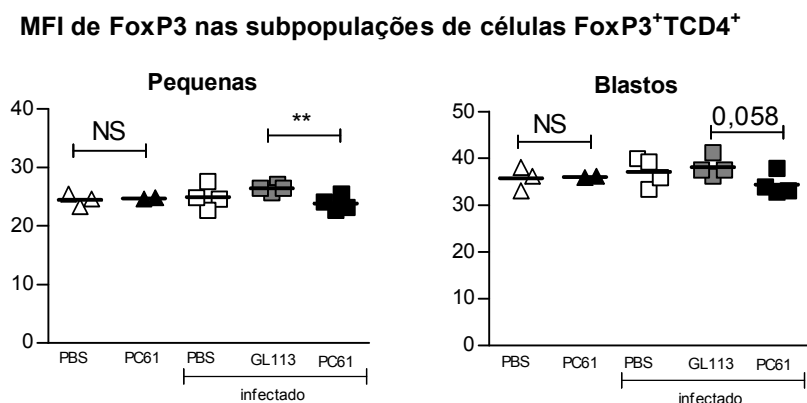


Figura 13. Mediana de fluorescência (MFI) de FoxP3 das células TCD4⁺FoxP3⁺ pequenas e grandes do baço de camundongos C57BL/6 tratados com GL-113 ou PC61 e camundongos tratados com PBS, GL113 e PC61 nos dias -6, -4 e -2 em relação a infecção por de *T. cruzi* da cepa Y. Os animais forma sacrificados no 14^o dia.

Uma vez que o tratamento com PC61 teve como consequência a eliminação parcial da população de células T_{REG}, analisamos o seu impacto na evolução da infecção. Neste contexto, a parasitemia (Figura 14) e patologia cardíaca de fase aguda (dados não mostrados) dos animais tratados com PC61 e infectados não foram diferentes daquelas observadas nos animais tratados com controle isotópico GL113 e infectados.

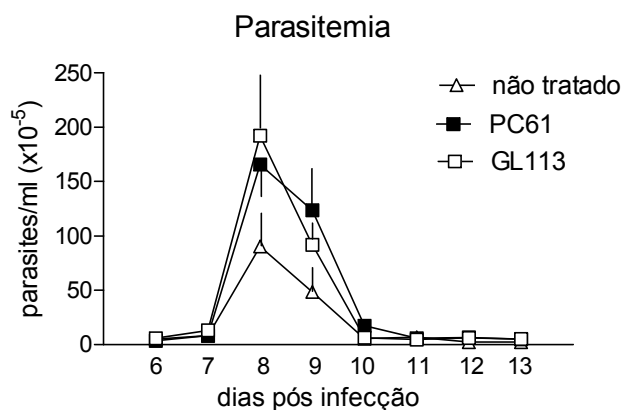


Figura 14. Curva parasitêmica de animais C57BL/6 não tratados, tratados com anti-CD25 (PC61) ou tratados com controle isotópico (GL113) e infectados com 10^3 *T. cruzi* da cepa Y. Os resultados são apresentados pelos valores médios dos 3 grupos.

5.6 Conclusão parcial

O tratamento com PC61 induz uma queda importante e significativa na frequência e número de esplenócitos $TCD4^+FoxP3^+$ tanto nos animais não infectados como nos animais infectados pelo *T. cruzi*. Esta diminuição é particularmente intensa na população de células $TCD4^+FoxP3^+$ pequenas. Para os blastos de células $TCD4^+FoxP3^+$ dos animais infectados, entretanto, observa-se até um pequeno aumento para o grupo tratado com PC61.

A depleção parcial das células T_{REG} pelo tratamento com anti-CD25 não promoveu alteração na curva de parasitemia ou na intensidade da patologia cardíaca dos animais infectados.

5.7 Fenotipagem de células T_{REG} na infecção crônica pelo *T. cruzi*

Uma vez definidas as mudanças ocorridas nas células $FoxP3^+$ na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, avaliamos as eventuais mudanças na fase crônica da infecção. As populações celulares de camundongos C57BL6 infectados por cinco a dez meses com 10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram analisadas em relação ao número total de células $TCD4^+FoxP3^+$. Para o número médio de

células TCD4⁺FoxP3⁺, pequenas ou blastos, não se constataram diferenças entre os animais crônicos e controle (Figura 15).

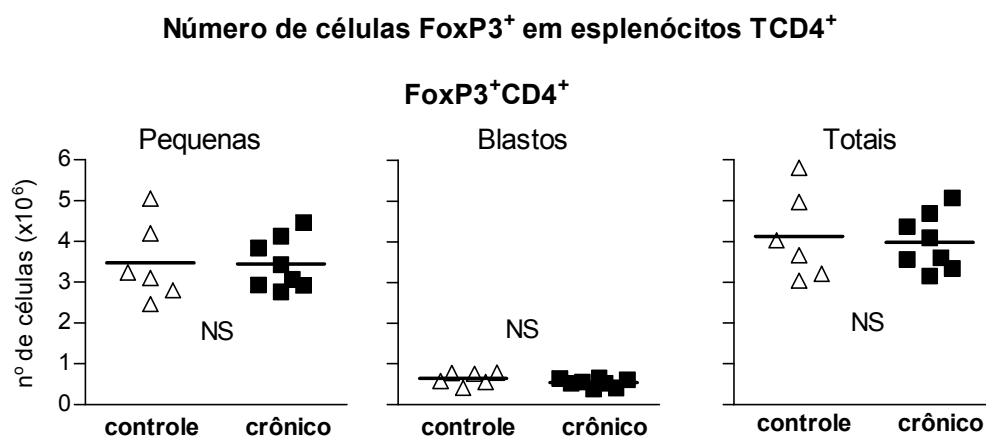


Figura 15. Número de células FoxP3⁺CD4⁺ no baço de camundongos machos C57BL6 controle e crônicos (10 meses de infecção) nas diferentes subpopulações de TCD4⁺ (pequenas, blastos e totais).

Além disso, analogamente ao observado nas análises das populações celulares dos animais controle e dos animais na fase aguda da infecção, a maior parte das células FoxP3⁺ dos animais na fase crônica da infecção são pequenas. Apesar do número de células TCD4⁺FoxP3⁺ não diferir entre animais controle e crônicos, a frequência de células FoxP3⁺ entre as células TCD4⁺ é menor nos animais crônicos, o que sugere que estes animais apresentam uma diminuição da relação células Tefetoras/T_{REG} em comparação aos animais controle (Figura 16).

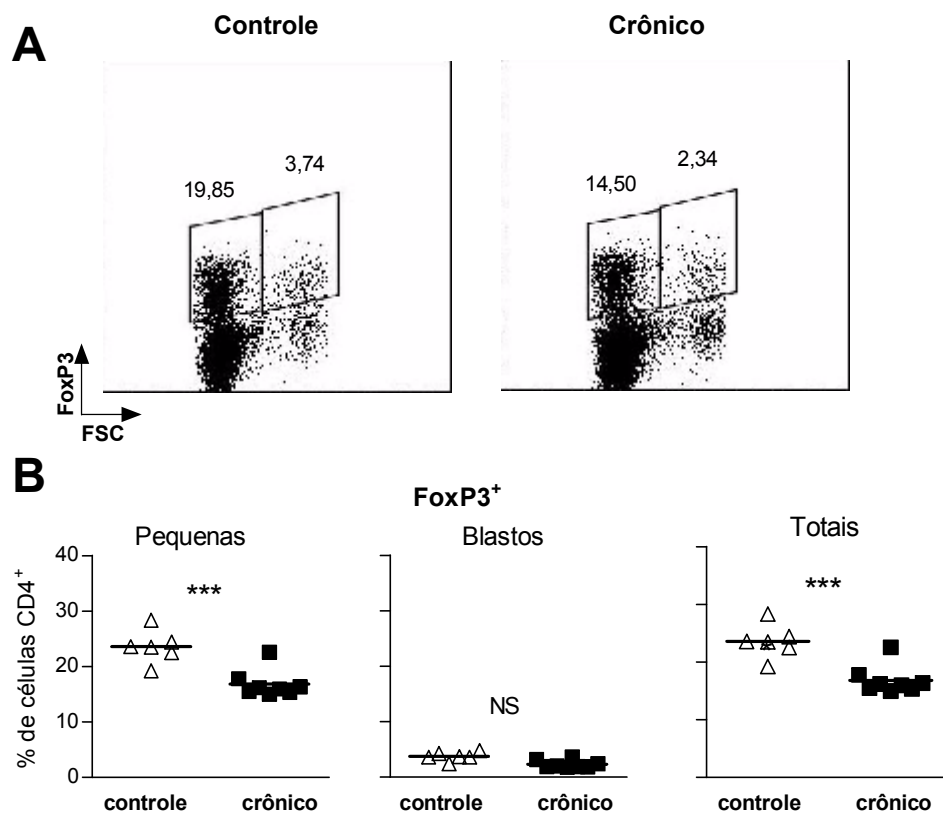
Frequência de FoxP3⁺ (pequenas e blastos) na população TCD4⁺

Figura 16. A) Dot-plots da expressão de FoxP3⁺ versus tamanho de células CD4⁺ no baço de camundongos machos C57BL6 controle e crônicos (10 meses de infecção). B) Frequências de células FoxP3⁺ em relação ao total de células TCD4⁺ pequenas, blastos ou totais.

Já em relação à mediana de fluorescência de FoxP3 das T_{REG} esplênicas, esta não foi diferente nos animais controle e crônicos (Figura 17).

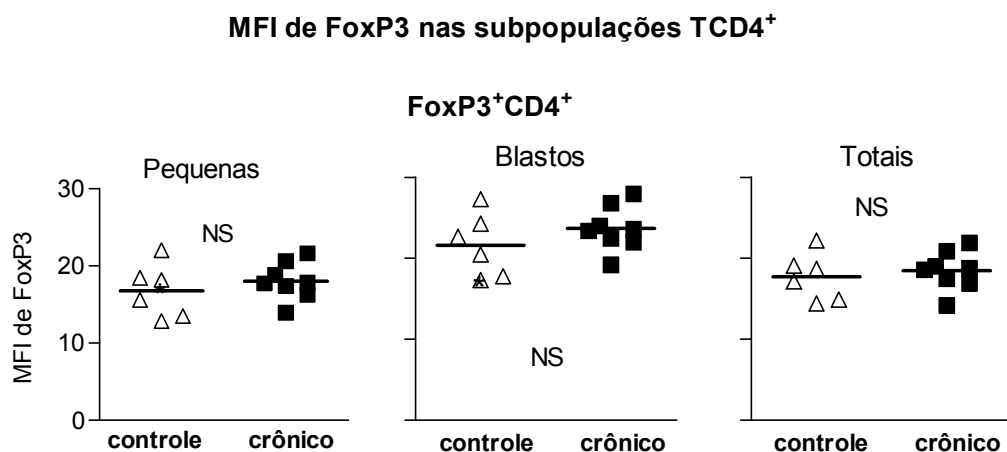


Figura 17. MFI de FoxP3 de esplenócitos TCD4⁺FoxP3⁺ de camundongos machos C57BL6 controle e crônicos (10^o mês de infecção).

Da mesma forma, não há diferença entre a MFI de CD25 de células TCD4⁺FoxP3⁺ dos animais controle e crônicos. A semelhança do que ocorre em camundongos controle, a expressão de CD25 foi notavelmente maior nos esplenócitos FoxP3⁺ do que nos FoxP3⁻ (Figura 18). Os resultados apresentados foram idênticos em animais infectados por 5 e 10 meses.

Expressão de CD25 das populações CD4⁺FoxP3⁺ ou CD4⁺FoxP3⁻

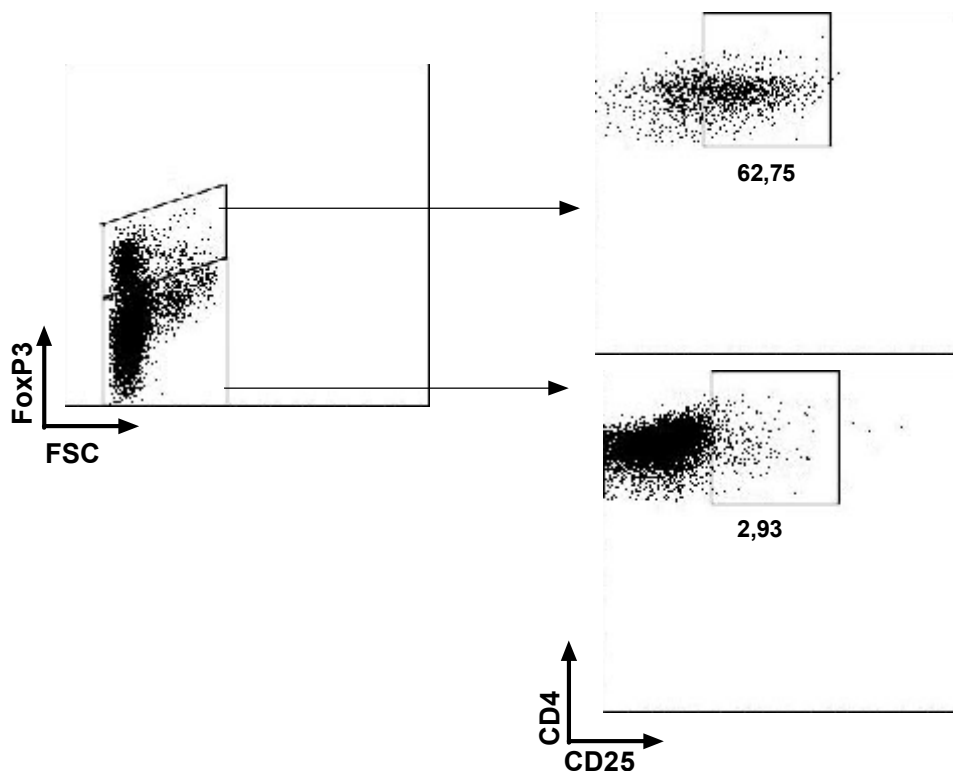


Figura 18. Expressão de CD25 nas subpopulações TCD4⁺FoxP3⁺ e TCD4⁺FoxP3⁻ de animais crônicos C57BL/6 (10^o mês da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y).

5.8 Conclusão parcial

Ao contrário do observado na fase aguda da infecção de camundongos C57BL/6 pelo *T. cruzi* da cepa Y, não houve mudanças significativas (em relação aos animais não infectados) no número de células TCD4⁺FoxP3⁺, pequenas ou grandes, ou na mediana de fluorescência para FoxP3 e CD25 durante a fase crônica da infecção.

5.9 Proliferação de esplenócitos CD25⁻ (ag-específico) *in vitro*

A elucidação do papel das T_{REG} na infecção chagásica experimental requer a avaliação de sua atividade supressora sobre a proliferação ou produção de citocinas pelas células efetoras parasito-específicas.

Com esse objetivo, em uma etapa prévia, padronizou-se o ensaio de proliferação, no qual se mediu a diluição da fluorescência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ marcadas com CFSE estimuladas *in vitro* por 72 e 96 h com antígeno de *T. cruzi* ou anti-CD3 ou não estimuladas (proliferação espontânea). A padronização foi realizada com esplenócitos de camundongos C57BL6 crônicos (após 5 meses de infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y) ou camundongos C57BL6 controle (não infectados). Os histogramas da figura 21 representam a proliferação após 96 h de estímulo. Para os esplenócitos dos animais crônicos a estimulação com antígeno de *T. cruzi* induziu uma maior proliferação do que a não estimulação, como esperado.

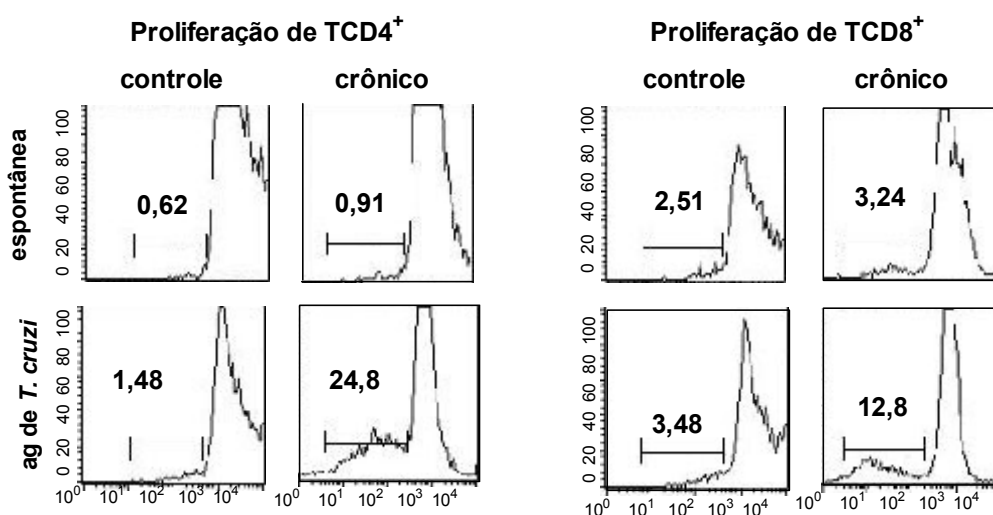


Figura 19. Proliferação espontânea ou ag-específica (solução de lisado de $1,5 \times 10^6$ tripanosomas de *T. cruzi* /mL) de esplenócitos CD4⁺ ou CD8⁺ de camundongos C57BL6 controle ou crônico (cepa Y de *T. cruzi*) após 96 h de cultura.

Uma vez que a maioria de células CD25⁺ no baço do camundongo crônico são FoxP3⁺, a abordagem para a avaliação do papel das células T_{REG} na infecção foi purificar ou eliminar a população CD25⁺ do animal crônico. Assim, na fase crônica, esta abordagem não tem o inconveniente observado na fase aguda, o fato da população CD25⁺ incluir, além das T_{REGs}, outras populações, como células ativadas e/ou efectoras.

A eliminação de células CD25⁺ nos possibilitou comparar a proliferação *in vitro* de esplenócitos destituídos da população CD25⁺ (esplenócitos CD25⁻) e a dos esplenócitos totais (ET), nos moldes do ensaio descrito anteriormente. Para a

purificação, os esplenócitos foram incubados com anti-CD25-PE e posteriormente com esferas metálicas acopladas a anti-PE e submetidos à ação de força magnética (imã) à medida que passaram por uma coluna. As células que não foram retidas na coluna (CD25⁻) foram utilizadas no ensaio. Após separação da coluna do suporte imantado a fração positiva foi também recolhida para avaliação de pureza. A suspensão de ET foi marcada com anti-FoxP3-FITC, anti-CD25-PE e CD4-Cy e as frações positiva (CD25⁺) e negativa (CD25⁻) com FoxP3-FITC e CD4-Cy, e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da pureza. A fração CD25⁺ mostrou-se altamente enriquecida em células FoxP3⁺, enquanto que a fração negativa (CD25⁻) mostrou um número baixo destas células (Figura 20). No entanto, observamos que a eliminação da população CD25⁺ ocorre principalmente para as células com maior expressão da molécula CD25 (CD25^{High}) permanecendo uma porcentagem pequena de células CD25^{LOW}.

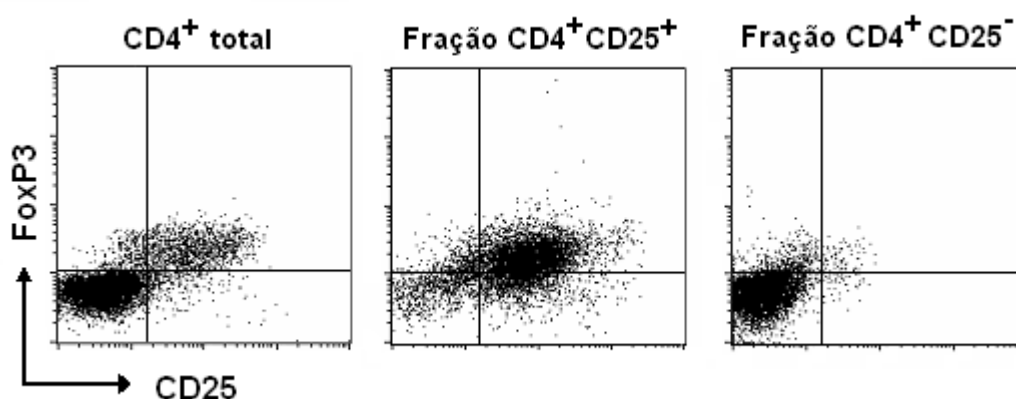


Figura 20. “Dot-plots” da expressão de FoxP3 e CD25 pelas células TCD4⁺ de animais crônicos. Da esquerda para direita estão representados os esplenócitos totais, a fração purificada CD25⁺ e a fração desprovida de CD25⁺.

Após verificação da pureza das frações, analisamos a proliferação *in vitro* espontânea e a induzida por antígeno de *T. cruzi* nas populações ET e CD25⁻, na presença de meio de cultura, anticorpos anti-IL2 (MoAb JES6-IA12) ou IL-2 recombinante. De acordo com a literatura, a citocina IL-2 é relacionada à manutenção de células T_{REG} (FONTENOT et al., 2005), mas também há muito vem sendo relacionada à expansão e ativação de células T (MORGAN et al., 1976).

Diferentemente do esperado, que seria uma proliferação intensa, a proliferação ao antígeno de *T. cruzi* pelas células TCD4⁺ na população CD25⁻ mostrou-se pouco superior à das células TCD4⁺ na população ET (Figura 21). Por outro lado, a adição às culturas do anticorpo anti-IL-2 (JES6-1A12) induziu uma diminuição da proliferação da população TCD4⁺, tanto para ET quanto para CD25⁻, indicando que esta citocina está envolvida na proliferação. Além disso, respaldando esta interpretação, a suplementação com IL-2 recombinante induziu um pequeno aumento na proliferação das células TCD4⁺ da população ET (em comparação as células não tratadas com IL-2), o que não foi observado para as células da fração CD25⁻.

Por outro lado, para a subpopulação TCD8⁺ a proliferação ao antígeno de *T. cruzi* é claramente maior na fração CD25⁻ do que na população ET (Figura 21). A adição de anticorpo anti-IL2 e da citocina IL-2 tem respectivamente efeito inibitório e estimulante da proliferação, que são observados tanto para os esplenócitos totais quanto para os esplenócitos CD25⁻. Também, pode-se constatar que a IL-2 recombinante estimula a proliferação espontânea de linfócitos TCD8⁺, tanto na suspensão de ET como na de esplenócitos CD25⁻. O aumento da proliferação espontânea das células TCD8⁺ na suspensão celular CD25⁻ é inesperado, já que em teoria não há células com receptor para IL-2 nestas culturas. A explicação mais plausível para este achado é que as células que respondem *in vitro* a IL-2 (células efetoras) têm um número muito baixo de moléculas de CD25 na sua superfície, insuficientes para grudarem nas esferas magnéticas. Alternativamente poderíamos pensar que na cultura são induzidos receptores para IL-2 (IL-2R) na suspensão celular CD25⁻. Neste sentido, é conhecido de longa data que a IL-2 é um estímulo potente para a indução do IL-2R (ROTTENBERG et al., 1989).

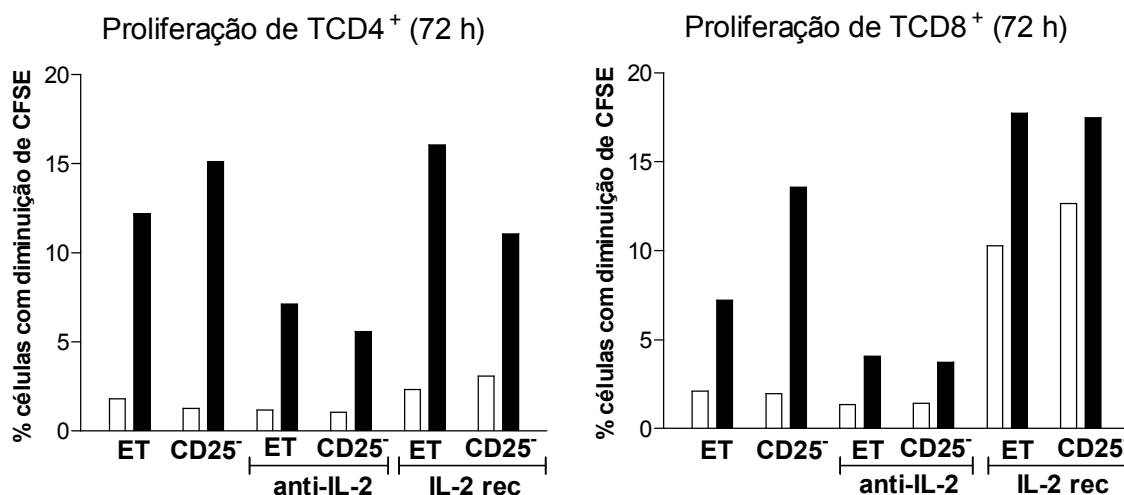


Figura 21. Proliferação espontânea (branco) ou em resposta a estimulação com ag de *T. cruzi* (preto) de esplenócitos TCD4⁺ (esquerda) e TCD8⁺ (esquerda) de animal crônico depletados de células CD25⁺ (CD25⁻) ou esplenócitos totais (ET), sem adição de citocina, com adição de anti-IL-2 ou com adição de IL-2 rec. A proliferação foi avaliada pela queda de fluorescência de CFSE após cultura de 72 horas.

5.10 Conclusão parcial

A remoção das células CD25⁺ da suspensão de esplenócitos de camundongo crônico resulta em aumento da resposta proliferativa a antígeno de *T. cruzi* pelas células TCD8⁺ (e em menor intensidade pelas células TCD4⁺) em relação à resposta na suspensão celular de esplenócitos totais. Estes resultados sugerem que as células T_{REG} participem de alguma forma na infecção crônica pelo *T. cruzi*.

5.11 Lesão cardíaca (animais crônicos) após tratamento com PC61

Para verificar o efeito da depleção das células T_{REG} na patologia de fase crônica, e nos valendo do fato de que a maior parte das células CD25⁺ do animal crônico são FoxP3⁺, camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 foram tratados com anticorpo anti-CD25 (PC61) ou com o MoAb irrelevante GL113 (controle isotópico, IgG1 de rato específico para β-galactosidase de *E. Coli*) ou alternativamente com IgG total de rato. Os camundongos receberam 13 doses de 0,2 mg de PC61 ou do anticorpo controle,

administradas a cada 2-3 dias, por 30 dias. Os animais foram sacrificados 2 dias após a administração da última dose de anticorpo para caracterização das populações celulares e demais ensaios.

Nestas experiências utilizamos camundongos C3H/HePas cronicamente infectados por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, ao invés do modelo C57BL6 infectado por parasitas da cepa Y. A razão para a mudança de modelo, se deve ao fato de que na infecção por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4 os camundongos C3H/HePas desenvolvem uma miocardiopatia crônica, com muitas das características da doença humana. Animais controle não infectados e não tratados com anticorpo também foram analisados.

No dia do sacrifício, o número médio de esplenócitos totais, estimado por contagem em câmara de Neubauer, dos animais crônicos tratados com PC61 foi similar ao observado no grupo tratado com GL113. Em forma análoga, para o número de linfócitos por baço, estimada por citometria de fluxo não se observam diferenças estatísticas entre os tratamentos (dados não mostrados). Além disso, não observamos diferenças significativas consistentes em relação ao número de células TCD4⁺ (ou blastos CD4⁺), TCD8⁺ ou linfócitos B (B220⁺) do baço entre os grupos crônicos tratados com PC61 e GL113, mas, como esperado, em ambos os grupos infectados estes números foram claramente superiores aos observados nos animais controle não infectados (dados não mostrados).

A expressão da molécula CD25 foi avaliada por citometria de fluxo tanto pela marcação com anticorpo do clone PC61 (anti-CD25-Pe), quanto pelo anticorpo do clone 7D4 (anti-CD25-FITC), que reconhece na molécula CD25 um epítipo diferente daquele reconhecido pelo PC61 utilizado no tratamento. Na figura 22, pode se observar as diferenças de resultados obtidas em frequência de TCD4⁺CD25⁺ de acordo com o anticorpo anti-CD25 utilizado para marcação das células, clones PC61 ou 7D4.

Expressão da molécula CD25 pelas células TCD4⁺ esplênicas de camundongos crônicos tratados com PC61 ou GL113

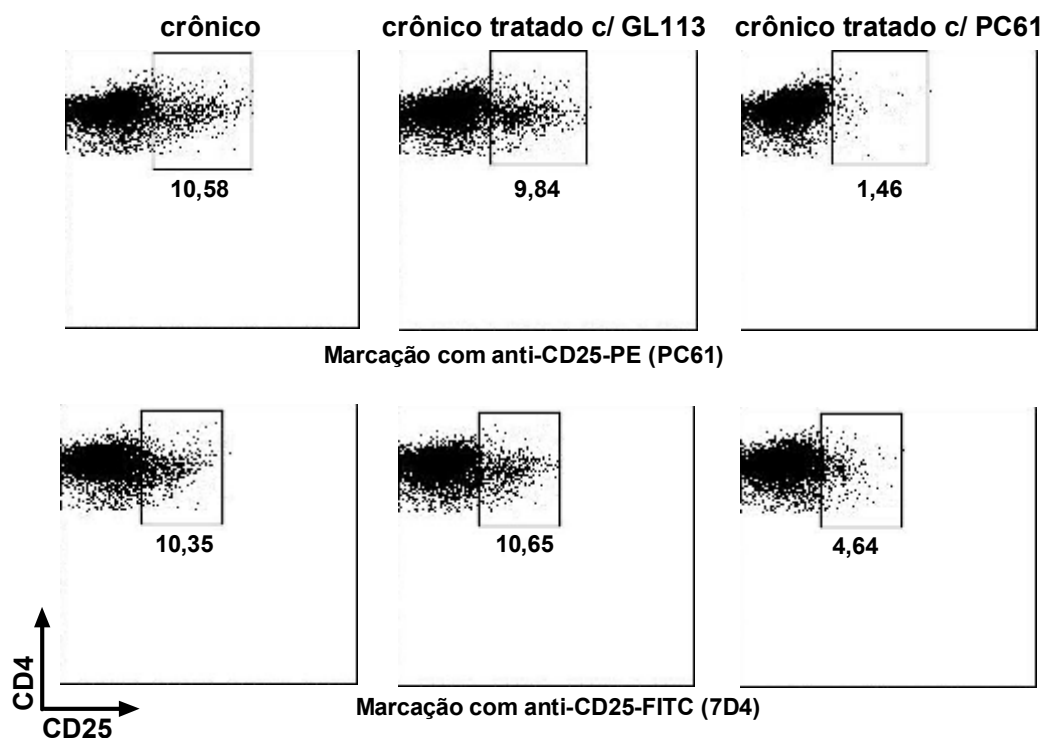


Figura 22. Efeito do tratamento com anticorpo anti-CD25 na frequência de células CD25⁺ (dentre as células TCD4⁺) no baço de camundongos crônicos. Camundongos C3H/HePas foram infectados com 10⁵ tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4. Na fase crônica, os animais foram tratados com PC61 (anti-CD25) ou com controle isotópico GL-113 e examinados por citometria de fluxo em relação à expressão da molécula CD25 na janela das células TCD4⁺. A avaliação da expressão de CD25 foi realizada com anticorpos anti-CD25, marcados, dos clones PC61 e 7D4.

Na avaliação com anti-CD25-PE (PC61), o número médio de células TCD4⁺CD25⁺ esplênicas nos animais crônicos tratados *in vivo* com GL113 foi de 2,1 x 10⁶ células enquanto que nos animais tratados com PC61 foi de 0,3 x 10⁶, o que corresponde a uma depleção de 85% no número de células TCD4⁺CD25⁺ (P < 0,0001) (Figura 23). Na avaliação com o anticorpo anti-CD25-FITC (clone 7D4) observamos uma redução de 54% na população TCD4⁺CD25⁺, sendo que os números totais de células TCD4⁺CD25⁺ no baço foram de 2,18 x 10⁶ células para os animais tratados com GL113 e de 1,0 x 10⁶ células para os animais tratados com PC61, diferença que apesar de inferior à detectada na análise com os anticorpos

anti-CD25-PE (clone PC61) também exibe significância estática ($P < 0,0001$) (Figura 23). Como complemento desta análise, a população $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-$ esplênica também foi avaliada. Nos animais tratados com PC61 observamos uma tendência a um pequeno aumento das células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-$, com incremento médio de $1,79 \times 10^6$ células na análise realizada com anti-CD25-Pe (PC61) e de $2,41 \times 10^6$ células na análise com anti-CD25-FITC (7D4), sobre os números observados nos animais tratados com GL113.

Número de esplenócitos $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ e $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-$ de animais crônicos tratados com anticorpo GL113 ou PC61 (marcação com anti CD25 pelos clones PC61 e 7D4)

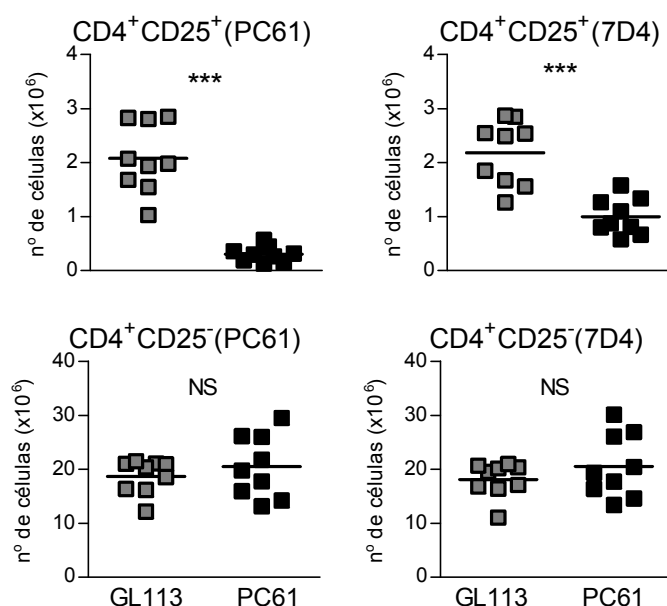


Figura 23. Efeito do tratamento com anticorpo anti-CD25 no número total de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ e células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^-$ no baço de camundongos crônicos. Camundongos C3H/HePas foram infectados com 10^5 tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4. Na fase crônica, os animais foram tratados com PC61 (anti-CD25) ou com controle isotópico GL-113. Os esplenócitos foram examinados por citometria de fluxo em relação à expressão da molécula CD25 nas células TCD4^+ . A avaliação da expressão de CD25 foi realizada com anticorpos anti-CD25, marcados, dos clones PC61 e 7D4.

A menor diminuição no número de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ na análise em que se utiliza o marcador de CD25, o anticorpo 7D4, indica que parte das moléculas CD25 está recoberta pelo anticorpo PC61 nos animais que foram tratados com anti-CD25. Além disso, devemos considerar que apesar de haver uma diminuição de 54% na população de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+$ na análise quando se utiliza o anticorpo 7D4, é

difícil afirmar que essas células tenham sido eliminadas, uma vez que elas poderiam ter perdido momentaneamente este marcador (modulação da expressão). Portanto, o impacto da depleção deve ser avaliado através da marcação com FoxP3.

Para avaliar se o tratamento com anti-CD25 (PC61) leva a uma redução de células FoxP3⁺ realizamos a análise desta molécula a partir da janela de células TCD4⁺. Esta análise de FoxP3 é mais apropriada que a análise a partir da população TCD4⁺CD25⁺, não somente pelos motivos acima citados, mas também pelo fato de parte das células FoxP3⁺ expressarem poucas moléculas CD25 (Figura 18).

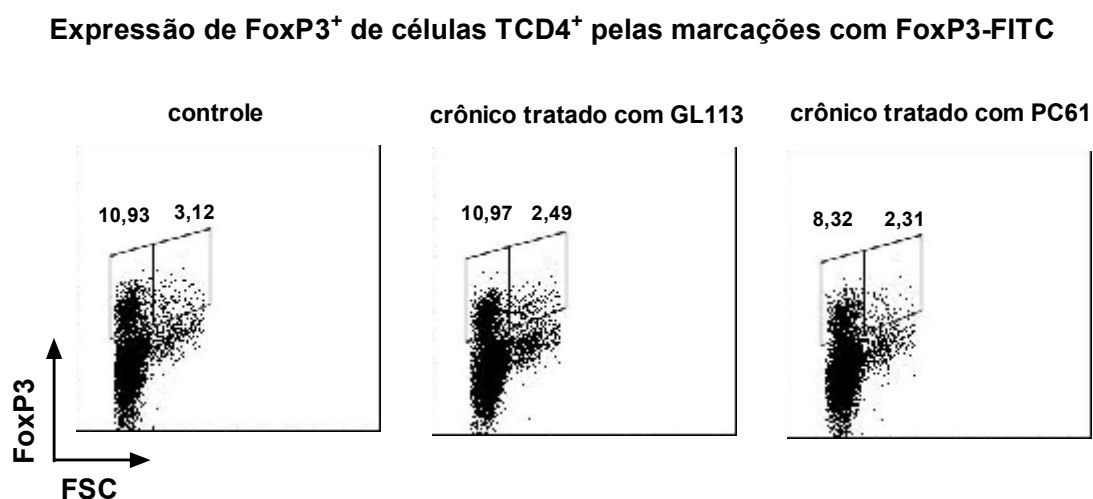


Figura 24. Dot-blots representativos da expressão de FoxP3 por tamanho das células TCD4⁺ esplênicas dos animais controle e animais crônicos tratados com GL113 ou com PC61. A avaliação das células FoxP3⁺ foi realizada utilizando-se o anticorpo anti-FoxP3-FITC. Na figura estão relacionadas as médias para os respectivos grupos das frequências das subpopulações FoxP3⁺ pequenas e FoxP3⁺ grandes em relação ao total de células TCD4⁺.

Em relação ao grupo controle não infectado, a frequência de células TCD4⁺FoxP3⁺ foi reduzida discretamente no grupo tratado com PC61 (Figura 24). De maneira semelhante, o número de esplenócitos CD4⁺FoxP3⁺ mostrou uma tendência à diminuição nos camundongos tratados com PC61 em relação ao grupo controle (Figura 25), observado nos 3 experimentos realizados. Essa tendência à diminuição no número de células FoxP3⁺ do grupo tratado com PC61 foi observada tanto em relação ao grupo controle tratado com GL113 (Figura 25A, direita), quanto

para o grupo tratado com IgG (Figura 25B, direita). É importante dizer que o tratamento com PC61 induziu uma maior diminuição de células FoxP3⁺ nos camundongos não infectados do que nos animais crônicos. Este resultado pode indicar que, mesmo havendo eliminação de parte dessa população em decorrência do tratamento, essas células poderiam estar sendo continuamente induzidas nos animais crônicos (Figura 25B).

Frequência e número de esplenócitos TCD4⁺FoxP3⁺ de animais crônicos tratados com anticorpo PC61 e anticorpos controle (GL113 ou IgG de rato)

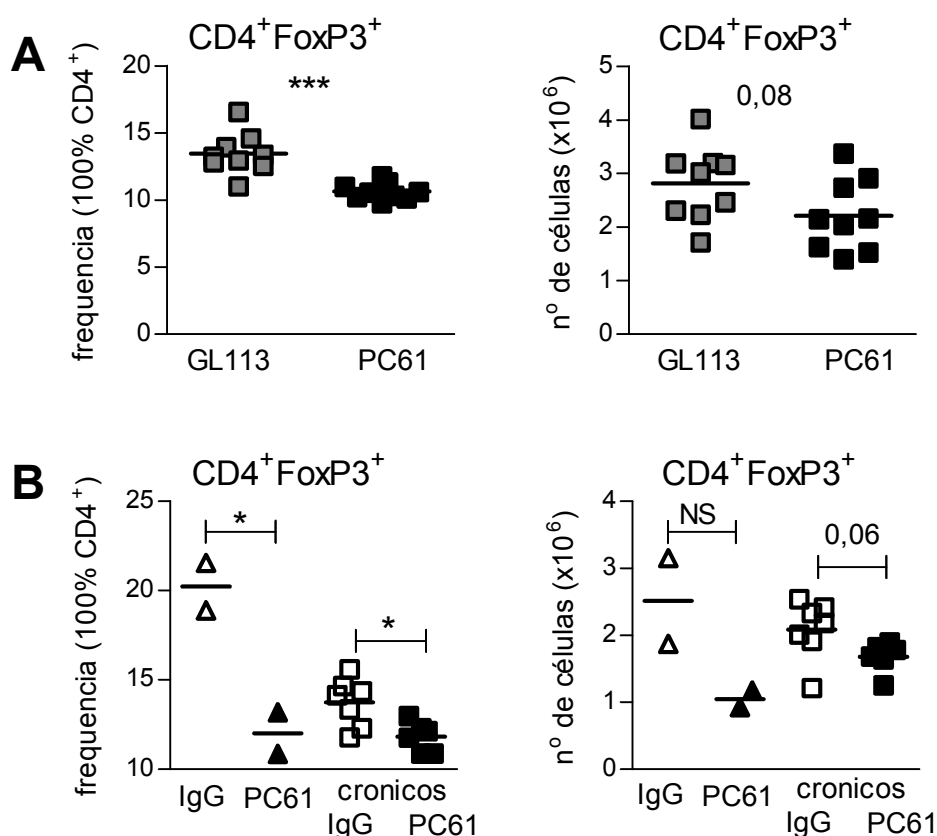


Figura 25. Frequência e número total de células TCD4⁺FoxP3⁺ do baço de camundongos C3H/HePAS infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4. A: animais crônicos tratados com anticorpos GL113 ou PC61. B: animais não infectados e infectados, tratados com anticorpos IgG ou PC61.

Por outro lado, a mediana de intensidade de fluorescência para a molécula FoxP3 das células TCD4⁺FoxP3⁺ não apresentou diferença com significância entre

os animais crônicos tratados com PC61 ou os tratados com anticorpo controle (GL113 ou IgG de rato) (dados não mostrados).

Em resumo, o tratamento de animais crônicos com anti-CD25 resultou em uma pequena diminuição em frequência e número de células esplênicas TCD4⁺FoxP3⁺.

Para avaliar se a produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais crônicos aumenta após o tratamento com anti-CD25, o que poderia refletir um estado de maior ativação devido à ausência de regulação, 10⁶ células esplênicas de cada animal crônico tratado com GL113 ou PC61 foram incubadas por 12 horas com anti-CD3, a 37 °C, e após marcação externa com anti-CD4 e anti-CD8, foram permeabilizadas e marcadas com anti-IFN- γ e submetidas à citometria de fluxo. Como esperado, as frequência de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ foram maiores nos animais crônicos do que nos animais controle. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais crônicos tratados com PC61 ou GL113 ou IgG de rato (Figura 26).

Produção de IFN- γ de esplenócitos de camundongos C3H/HePas crônicos (*T. cruzi* cepa sylvio X10/4) tratados com anti-CD25 (PC61) ou controles (GL113 ou IgG)

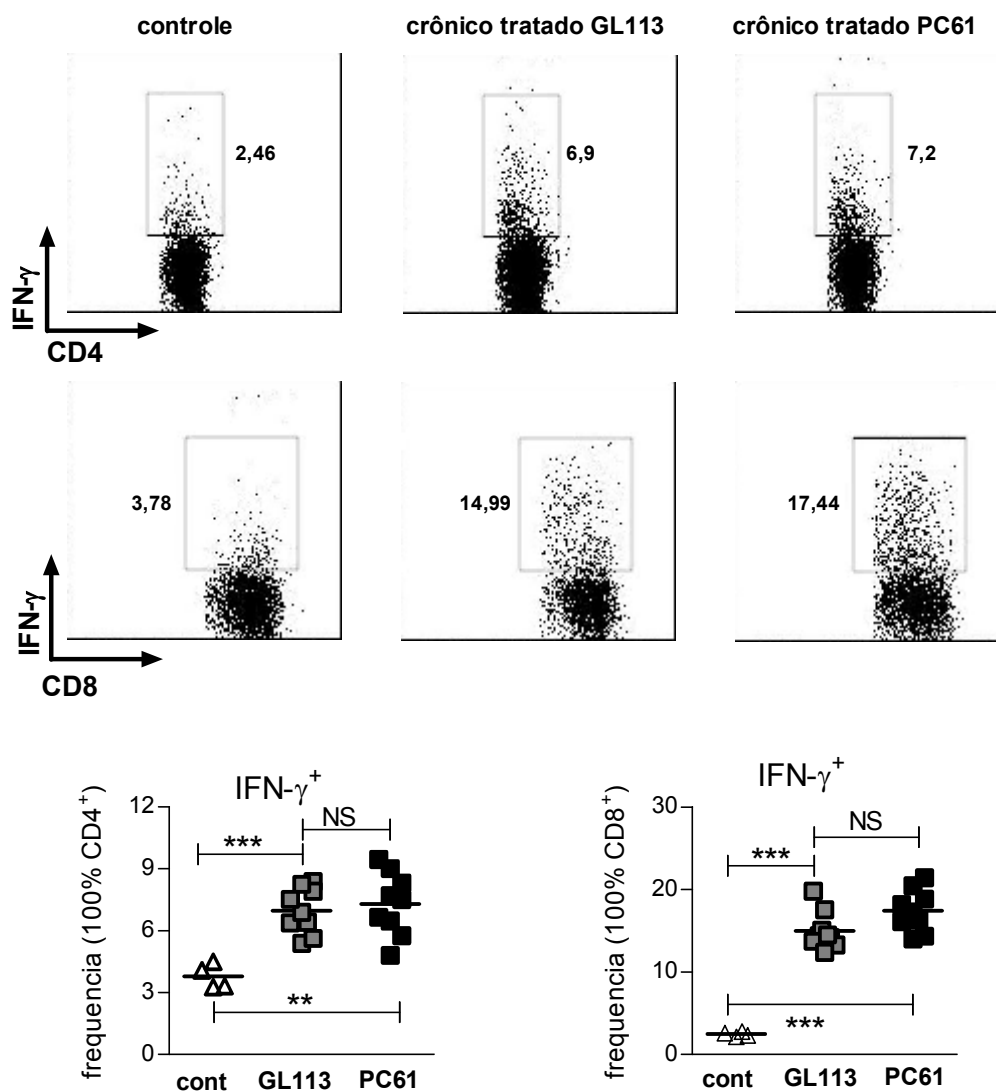


Figura 26. Dot-plots (acima) e frequência (abaixo) de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ no baço de animais não infectados ou de animais crônicos (infecção por *T. cruzi* Sylvio X10/4) tratados com anticorpo controle isotípico (GL113) ou anti-CD25 (PC61), após estimulação in vitro com anti-CD3.

Os mesmos resultados, porém, em níveis mais discretos, foram obtidos quando os esplenócitos de camundongos crônicos foram estimulados com antígeno de *T. cruzi*, ao invés de anti-CD3 (Figura 27).

Produção de IFN- γ de esplenócitos de camundongos C3H/HePas crônicos (cepa sylvio X10/4) tratados com anti-CD25 (PC61) ou controle (IgG)

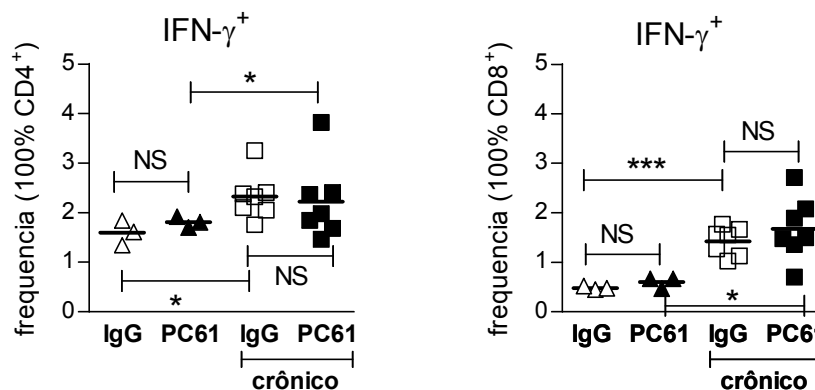


Figura 27. Frequência de células CD4 $^+$ e CD8 $^+$ produtoras de IFN- γ do baço de camundongos C3H/HePAS crônicos (infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4) tratados com anticorpo controle, IgG de rato ou anti-CD25 (PC61), após estimulação in vitro com ag de *T. cruzi*.

Para avaliar mais detalhadamente se haveria diferenças nos níveis de ativação entre esplenócitos dos animais crônicos e controles, tratados ou não com PC61 ou IgG de rato, utilizamos o Kit-CBA para mensurar por citometria de fluxo as quantidades de citocinas presentes no sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados por 72 h com antígeno de *T. cruzi*. Os resultados foram similares aos mostrados para produção intracelular de IFN- γ por células TCD4 $^+$ e TCD8 $^+$, ou seja, níveis mais elevados de IFN- γ nos animais crônicos do que nos animais controle, mas não apresentaram significância estatística entre os grupos crônicos tratados com PC61 ou anticorpo controle (Figura 28). Também não foram observadas diferenças nos níveis de IL-2 ou citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-5, entre os animais não infectados e os grupos crônicos ou entre os grupos tratados com PC61 e IgG de rato. Nos animais crônicos tratados com PC61, paradoxalmente, observamos níveis discretamente inferiores de TNF- α . Mais interessante foi o fato de observarmos nos animais não infectados tratados com PC61 uma tendência a um aumento nos níveis de IFN- γ e um discreto aumento naqueles de TNF- α , resultado que sugere que a resposta das células naïve dos animais não infectados se encontra sob controle das T_{REG} (Figura 28).

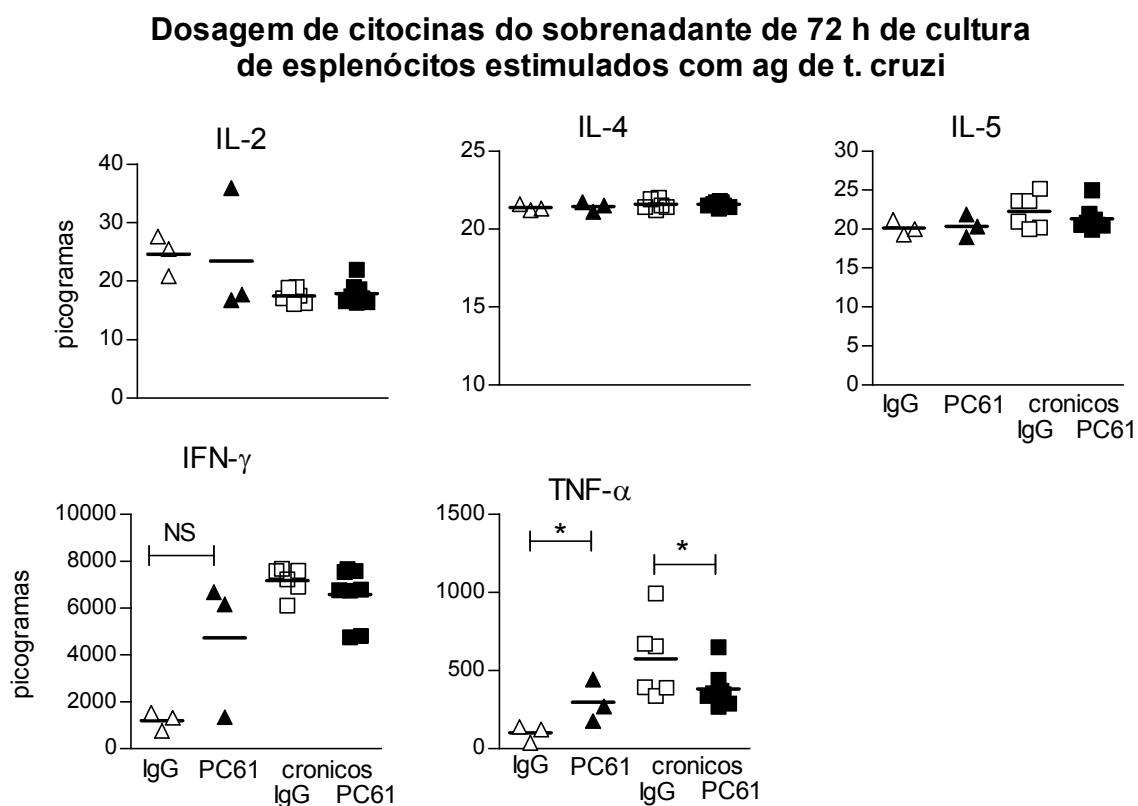


Figura 28. Dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura de 72 h de esplenócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* procedentes de camundongos C3H/HePas controle ou crônicos (*T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4) tratados com anti-CD25 ou controle IgG total de rato. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo utilizando o Kit-CBA da BD Bioscience.

Ainda para avaliar se haveria diferenças nos níveis de ativação entre esplenócitos dos animais crônicos e controles, tratados ou não com PC61, caracterizamos as células TCD4⁺ com relação à expressão das moléculas CD44 e CD69. O número de células duplo positivas (CD44⁺CD69⁺, células ativadas) não diferiu entre os animais crônicos tratados com IgG ou PC61. Porém entre os animais crônicos e os controles observa-se um aumento com significância estatística, como pode ser observado no gráfico da Figura 29.

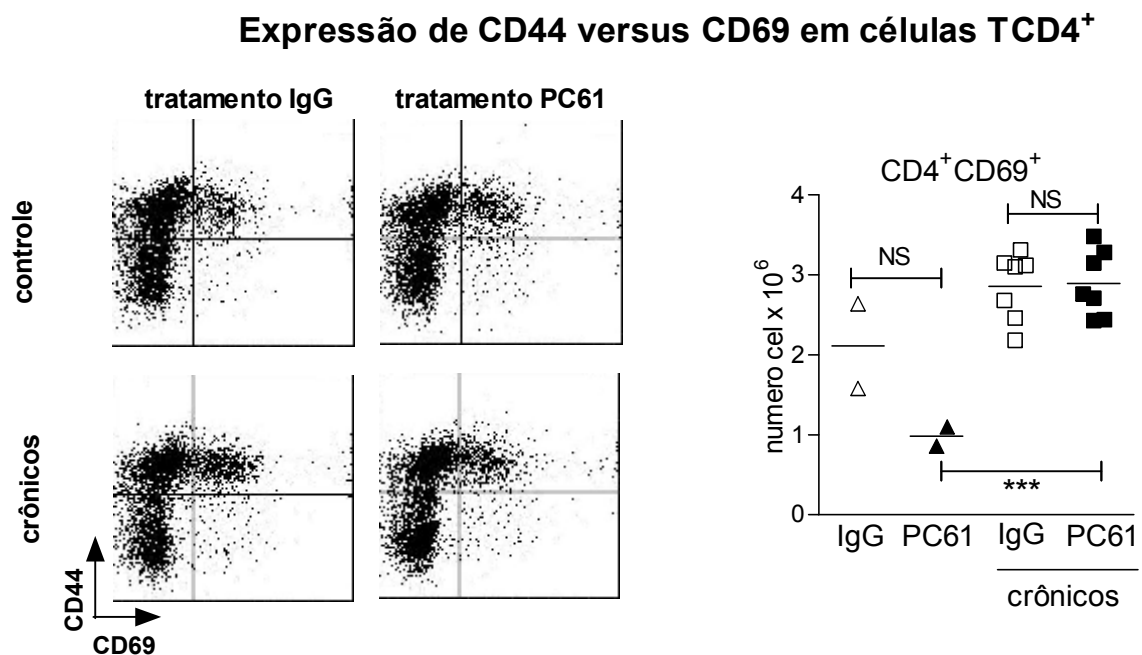


Figura 29. Dot-plots representativos da expressão de CD44 versus CD25 das células TCD4⁺ esplênicas de animais controle ou animais crônicos tratados com IgG ou com PC61 (esquerda). Número de esplenócitos TCD4⁺CD44⁺CD69⁺ de animais controle ou animais crônicos tratados com IgG ou com PC61 (direita).

Os níveis de mRNA para IFN- γ presentes no coração dos camundongos crônicos tratados com o MoAb PC61 ou IgG total de rato, avaliados por RT-PCR, não foram diferentes. Porém, os níveis exibidos pelos animais crônicos foram muito superiores daqueles observados no coração dos animais controle (Figura 30).

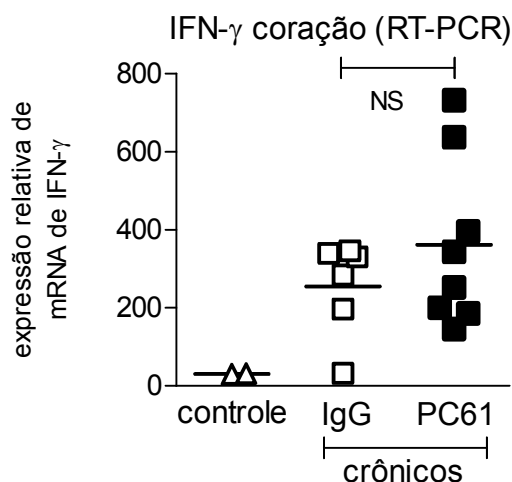


Figura 30. Dosagem de mRNA para IFN- γ no coração de camundongos C3H/HePas controle, crônicos (Sylvio X10/4) tratados com anti-CD25 ou controle IgG total de rato. A avaliação foi realizada por RT-PCR.

Para verificar se o tratamento prolongado com anti-CD25 resulta em um aumento da atividade efetora e maior controle do parasita, avaliamos a carga parasitária subpatente sistêmica através de hemocultura em meio “liver infusion tryptose” (LIT). Assim, por ocasião do sacrifício dos animais, alíquotas de 5 μ L de sangue dos camundongos crônicos tratados com PC61 ou GL113 foram cultivadas, em triplicata, em meio LIT, e as culturas visualizadas a cada semana para verificar crescimento do *T. cruzi*. Entretanto, o nível de parasitismo sistêmico revelado nas culturas em meio LIT não mostrou diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 31).

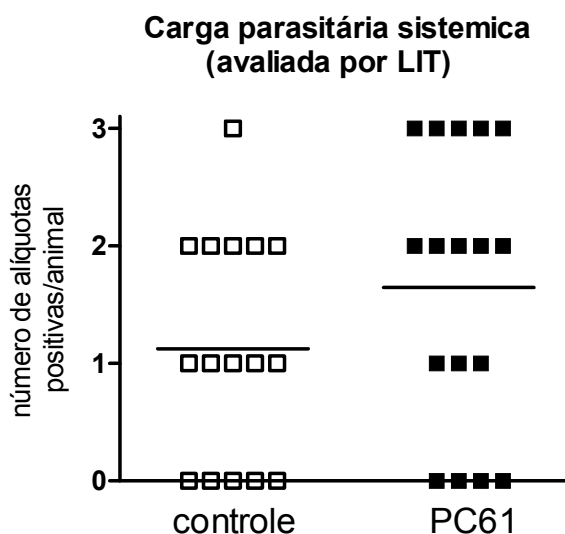


Figura 31. Carga parasitária sistêmica avaliada por positividade de cultura de LIT com alíquotas de 5 μ L de sangue de animais C3H/HePas crônicos (infectados pela cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*) tratados com anticorpo IgG de rato controle ou PC61.

Imediatamente após o sacrifício dos animais, os órgãos foram fixados em solução tamponada de formaldeído 10% por 48 h, com posterior hidratação com álcool 70%. Este material foi enviado para a seção de histopatologia do Departamento de Imunologia para preparo das lâminas histológicas. Os órgãos foram emblocados em parafina e cortes sagitais de 5 μ m, não consecutivos, corados com hematoxilina-eosina. Através de análise por microscopia óptica, estimou-se a área de infiltrados inflamatórios e lesões dos tecidos e de acordo com sua severidade, atribuíram-se notas que variaram de 0 a 5.

No primeiro dos três experimentos realizados, a análise dos cortes histopatológicos do coração dos animais crônicos mostra que o tratamento com PC61 resulta em diminuição moderada da patologia no pericárdio e miocárdio, quando comparado ao tratamento com o anticorpo controle GL113 (Figura 32A). No entanto, nos outros dois experimentos não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 32B e C). Como as diferenças no experimento 1 são moderadas (Figura 32A), é razoável concluir que o tratamento com anti-CD25 não altera ou altera minimamente a lesão cardíaca

causada no camundongo C3H/HePas pela infecção crônica por *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4.

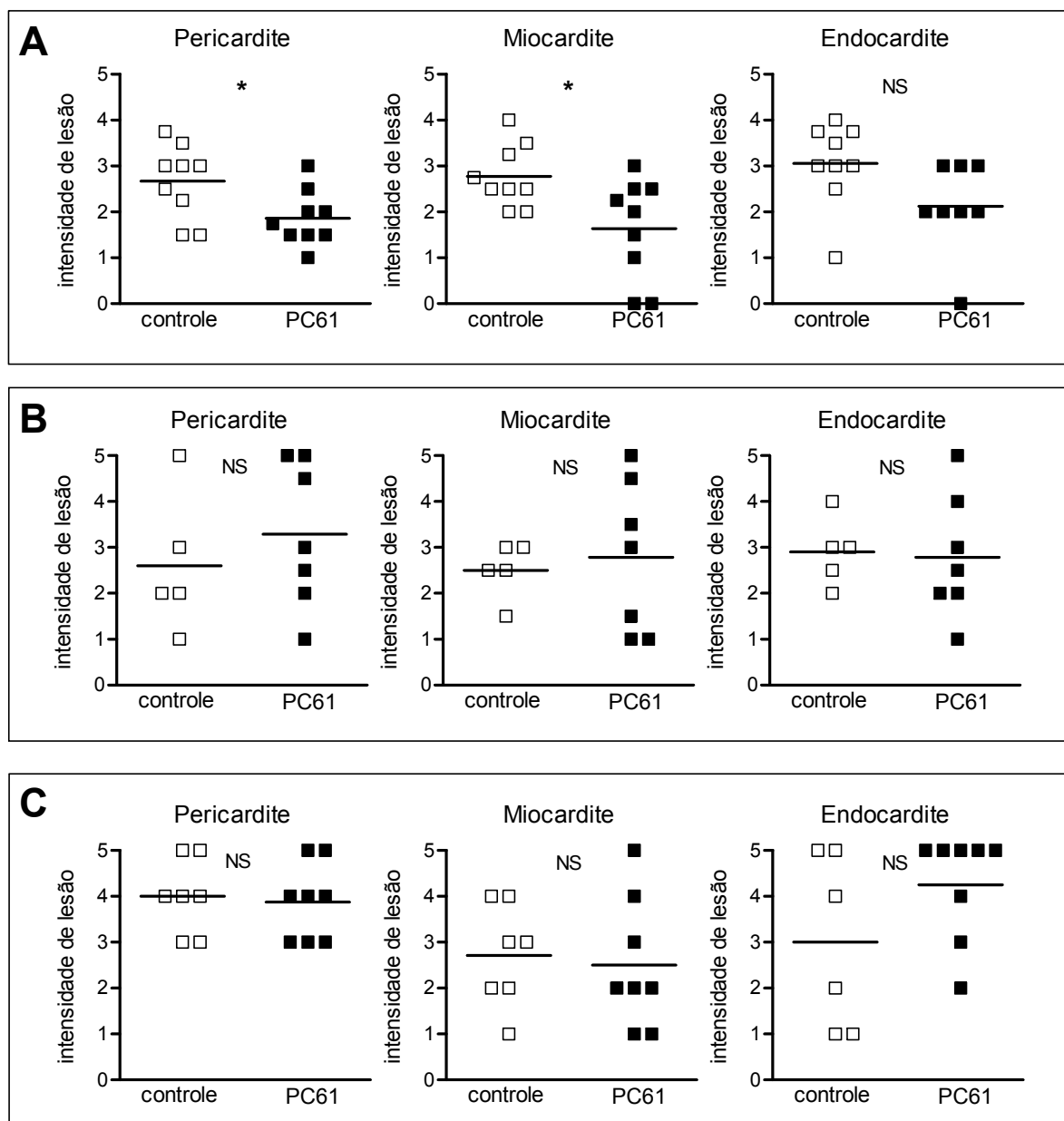


Figura 32. Intensidade do infiltrado inflamatório no coração de camundongos C3H/HePAS crônicos (infecção com *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4) tratados com anticorpo controle ou MoAb PC61: (A) Experimento 1 (B) Experimento 2 e (C) Experimento 3.

5.12 Conclusão parcial

Os camundongos crônicos tratados com o MoAb anti-CD25 (PC61) apresentam uma redução na frequência de células FoxP3⁺ e uma tendência a diminuição no número total destas células. No entanto, a resposta imune ao parasita, medida pela produção de citocinas, assim como a carga parasitária sistêmica e a patologia cardíaca não foram alteradas em decorrência do tratamento.

6 DISCUSSÃO

A eliminação do *T. cruzi* pelos indivíduos infectados, como descrito na literatura, é rara (FRANCOLINO *et al.*, 2003). Assim, apesar da forte resposta imune contra este protozoário um pequeno número de parasitas geralmente persiste nos tecidos do hospedeiro. Independentemente de qual sejam as causas que permitem o escape do parasita, o indivíduo cronicamente infectado deve lidar com uma resposta contínua e de longa duração contra os parasitas persistentes, que causa lesão tissular. Assim, durante a resposta frente ao parasita, concomitantemente a indução de elementos efetores que agem na eliminação do parasita, mecanismos reguladores são ativados, minimizando a lesão tissular provocada pela própria resposta imune (KOTNER; TARLETON, 2007; BELKAID, 2008).

Neste trabalho, nós avaliamos a participação de um dos elementos do controle da resposta imune mais estudados, as células T_{REG}, e o seu envolvimento na modulação dos mecanismos que propiciam a destruição do *T. cruzi* e na patologia decorrente da infecção por este parasita.

Em um primeiro momento, avaliamos a dinâmica da população caracterizada como T_{REG} (TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção por *T. cruzi* em modelo experimental murino. Nossos resultados mostram um pequeno aumento em número de células TCD4⁺FoxP3⁺ na fase aguda da infecção. No entanto, devido a uma expansão drástica de células TCD4⁺FoxP3⁻ (e TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁻) nesse período da infecção, a frequência de células T_{REG} dentre as células CD4⁺ apresenta uma diminuição significativa. Assim, o pequeno aumento relativo acompanha uma forte ativação do sistema imune na fase aguda. Aumentos moderados no número de células FoxP3⁺ têm sido observados durante o curso de infecções aguda, como a por *Plasmodium chabaudi adami*, no qual o número de células FoxP3⁺ aumenta na ordem de 1,5 a 3 vezes (VIGARIO *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2008). O moderado aumento das T_{REG} no palco da infecção aguda pode ser explicado pelo efeito inibidor que têm as citocinas Th1 e Th2 (IFN- γ e IL-4) no desenvolvimento de células FoxP3⁺ (WEI *et al.*, 2007).

Qual é a origem dessas células que representam o moderado aumento no número de T_{REG} na fase aguda da infecção, seria proliferação ou a geração “de novo” de células FoxP3⁺? Neste aspecto, a possibilidade de que estas células surjam em decorrência da geração “de novo” é sustentada pelas nossas observações de que 80-85% de células T_{REG} do baço de animais na fase aguda da infecção são pequenas, frequência similar à observada em camundongos não infectados.

Durante a fase aguda da infecção as células TCD4⁺FoxP3⁺ passam por mudanças fenotípicas, tais como um aumento no número de moléculas CD25, GITR e CD122; no entanto, os níveis de expressão de FoxP3 permanecem na maioria das vezes iguais.

Uma vez que não é possível analisar a atividade funcional das células FoxP3⁺ na fase aguda da infecção, o seu envolvimento na regulação da resposta contra o *T. cruzi* e na patologia na fase aguda foi avaliado pelo tratamento com MoAb anti-CD25. Este procedimento tem sido amplamente utilizado para avaliar a participação das T_{REG} na resposta imune contra tumores, doenças autoimune e infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, *Herpes simplex* e *Plasmodium berghei* NK65 (ONIZUKA *et al.*, 1999; MCHUGH; SHEVACH, 2002; LONG *et al.*, 2003; FERNANDEZ *et al.*, 2008; JARON *et al.*, 2008; BOUDOUSQUIE *et al.*, 2009), bem como por *T. cruzi* (KOTNER; TARLETON, 2007; MARIANO *et al.*, 2008; SALES *et al.*, 2008).

Uma das críticas a esta abordagem é que o tratamento com anti-CD25 atinge outras populações além das células T_{REG} tais como as células FoxP3⁻ efectoras/ativadas. Apesar disso, acreditamos que o tratamento com anti-CD25 deva ser a melhor alternativa, uma vez que, a maioria das T_{REG} expressa altos níveis de CD25 em comparação às células efectoras/ativadas e, além disso, porque outras moléculas candidatas como CD122, GITR e CD127 são expressas em maiores níveis nas células FoxP3⁻ do que nas FoxP3⁺ na fase aguda da infecção. Apoiando a nossa suspeita, o tratamento com anti-CD25, induziu uma diminuição significativa, apesar de parcial, no número de células TCD4⁺FoxP3⁺ e um aumento importante no número de células grandes TCD4⁺CD25^{LOW}FoxP3⁻ (células efectoras/ativadas). Este

último resultado deve ser interpretado, entretanto, com prudência, uma vez que dois efeitos de sinais contrários poderiam ocorrer após tratamento com anti-CD25 no animal com infecção aguda. Assim, por um lado, a eliminação/diminuição de células T_{REG} induzida pelo PC61 poderia resultar secundariamente em aumento da proliferação das células TCD4⁺CD25^{LOW}FoxP3⁻. Por outro lado, a proliferação das células TCD4⁺CD25^{LOW}FoxP3⁻ poderia ainda ser maior, caso os anticorpos anti-CD25 estejam depletando estas células.

A despeito da redução das células TCD4⁺FoxP3⁺ nos animais com infecção aguda, a parasitemia e os níveis de miocardite não foram afetados pelo bloqueio das células T_{REG}. Numa primeira análise, este resultado poderia indicar que as T_{REG} não estão envolvidas na modulação negativa da resposta imune ao *T. cruzi*. O mesmo foi concluído pelos autores que utilizaram esta mesma abordagem para estudar a participação das T_{REG} na resposta imune frente ao *T. cruzi*. Assim, Kotner e Tarleton (2007) observaram que o curso da infecção pela cepa Tulahuen, não é afetado pelo tratamento com anti-CD25 pelo MoAb 7D4 (KOTNER; TARLETON, 2007). Em outro trabalho, Mariano et al. (2008) observaram que o tratamento com PC61 não afeta a parasitemia de camundongos infectados pela cepa Y, apesar dos animais tratados apresentarem uma diminuição paradoxal do tempo de sobrevivência (MARIANO *et al.*, 2008). Por outro lado, o grupo de Gazzinelli (2008) observou que, de maneira similar, o tratamento com PC61 não afeta o curso da infecção por 50 parasitas da cepa Y ou 1000 parasitas de *T. cruzi* da cepa Colombiana (SALES *et al.*, 2008). No entanto, constataram uma pequena redução na parasitemia e mortalidade dos animais tratados com PC61 quando a infecção foi feita com 50 parasitas da cepa Colombiana.

O fato do tratamento com PC61 dos animais infectados não ter alterado o curso da parasitemia ou patologia, em comparação aos animais infectados e tratados com anticorpo controle, pode ser devido à depleção de células T_{REG} ter ocorrido somente de forma parcial. No entanto, outros autores têm observado que a administração de PC61 resulta em uma inativação funcional, e não na depleção física de células T_{REG} TCD4⁺CD25⁺ (KOHM *et al.*, 2006). Assim, de acordo com nossos resultados e dos outros grupos, nós podemos concluir que o desenvolvimento de uma resposta específica anti-*T. cruzi* responsável pelo controle

da parasitemia e sobrevivência do hospedeiro não parece estar sob influência das T_{REG} $CD4^+CD25^+FoxP3^+$.

Uma possível explicação para a observação de que não ocorrem diferenças no curso da infecção e patologia após o tratamento com anticorpo anti-CD25 (em relação ou grupo tratado com anticorpo controle) é que o *T. cruzi*, na fase aguda, poderia ter induzido um bloqueio funcional das células T_{REG} , bloqueio que permitiria o desenvolvimento de uma resposta protetora anti-parasita nos estágios iniciais da inflamação. Corroborando esta hipótese, Pasare e Medzhitov (2003) demonstraram que a atividade supressora das células T_{REG} é bloqueada pelo estímulo com agonistas de TLR (PASARE; MEDZHITOV, 2003). Estes autores demonstraram que o bloqueio funcional de T_{REG} depende da estimulação de células dendríticas via TLR, que ao secretar IL6 torna as células naïve refratárias a sinais das células T_{REG} . Em adição, Liu *et al.* (2006) estenderam estes resultados ao mostrar que agonistas de TLR, além de tornarem as células T resistentes a ação supressora das T_{REG} , induzem uma momentânea perda da atividade supressora com diminuição da indução de mRNA de FoxP3 (LIU *et al.*, 2006a). Uma vez que a detecção de *T. cruzi* pelo sistema envolve diferentes moléculas de TLR (CAMPOS *et al.*, 2001; BAFICA *et al.*, 2006) que sinalizam através das vias MyD88 e TRIF (KOGA *et al.*, 2006) e devido a IL-6 ser produzida em abundância nos estágios iniciais da fase aguda (GAO; PEREIRA, 2002), existe a possibilidade que a atividade das T_{REG} seja momentaneamente cancelada no começo da infecção por *T. cruzi*, momento em que o sistema imune é intensamente estimulado (D'IMPERIO LIMA *et al.*, 1985). Além disso, não podemos deixar de considerar o trabalho de Wei *et al.*, citado acima, que demonstra que o IFN- γ , uma citocina produzida em altos níveis na infecção pelo *T. cruzi*, age negativamente na indução de células T_{REG} pelo TGF β (WEI *et al.*, 2007).

Na fase crônica da infecção, o número de células FoxP3⁺ no baço retorna àquele dos animais controle da mesma idade. Adicionalmente, nossas observações de que a frequência de células FoxP3⁺ dentre as células TCD4⁺ diminui com significância estatística nos animais crônicos sugerem uma relativa diminuição na atividade das T_{REG} . O retorno do número de células FoxP3⁺ aos níveis basais provavelmente acompanham uma diminuição da carga parasitária sistêmica que ocorre na fase crônica. Em consonância com isso, quando os camundongos

crônicos foram desafiados por via intravenosa com parasitas *T. cruzi* homólogos, um significativo aumento no número de células FoxP3⁺ foi observado (dados não mostrados).

Células FoxP3⁺ do baço de animais crônicos são pequenas e constituem a maior parte da população de células CD25⁺ neste órgão. Estas células apresentam um moderado efeito regulador *in vitro* sobre células T parasito-específicas. Isso pode ser observado pelo pequeno aumento na proliferação de células T dos esplenócitos depletados de células CD25⁺, em resposta a antígeno de *T. cruzi*, quando comparado ao de esplenócitos totais. O fato do aumento na proliferação ser maior para células TCD8⁺ do que para TCD4⁺, sugere que as células TCD8⁺ sejam mais intensamente reguladas pelas T_{REG}.

Para avaliar se as T_{REG} estão envolvidas no controle da resposta parasito-específica em camundongos crônicos, animais de 5-8 meses foram submetidos a tratamento com anticorpo anti-CD25. O protocolo de depleção empregado neste experimento foi diferente daquele usado na fase aguda. Neste, os animais receberam 13 doses de 200 µg do MoAb PC61, em intervalos de 2-3 dias. Este tratamento contínuo resultou em um pequeno decréscimo no número de células FoxP3⁺ no baço de camundongos crônicos, sendo os níveis de depleção menores em amplitude do que aqueles observados nos animais controles ou daqueles nos animais depletados na fase aguda. Nós não sabemos o motivo da depleção ser tão baixa em animais crônicos. Em princípio, fatores decorrentes do ambiente no animal crônico ou do protocolo utilizado no tratamento poderiam estar envolvidos, por outro lado, há também a possibilidade de que estas células sejam geradas (repostas) em maior número nos animais crônicos. Em nossos experimentos o tratamento com o MoAb PC61 não alterou a resposta parasito-específica dos animais crônicos, avaliadas pela produção de IFN-γ, TNF-α e citocinas Th2, em relação àquela apresentada pelos animais crônicos tratados com o anticorpo controle. Além disso, o tratamento com MoAb PC61 não alterou os níveis de IFN-γ do coração. Já em relação à cardiopatia, dos três experimentos feitos, nós observamos uma redução de pequena intensidade no infiltrado inflamatório no primeiro experimento, mas isso não foi confirmado nos outros dois experimentos realizados. Nossos resultados não diferem daqueles obtidos pelo grupo do Gazzinelli, que após avaliar a patologia

cardíaca induzida pela cepa Colombiana (que apresenta pico de patologia cardíaca nos dias 35-40 p.i.) de camundongos tratados com MoAb PC61, concluem não haver alteração na intensidade ou cinética dos infiltrados no coração (SALES *et al.*, 2008).

Assim, como demonstrado para a fase aguda, o conjunto de dados da infecção na fase crônica indica que o tratamento com MoAb anti-CD25 não interfere com a resposta específica anti-*T. cruzi*, nem com o desenvolvimento da patologia ou parasitismo sistêmico. Enquanto isso poderia ser devido a uma depleção insuficiente de T_{REG}, também poderia ser devido à falta de envolvimento das T_{REG} no controle desses parâmetros. Neste sentido, também podemos supor que a resposta imune ao *T. cruzi* seja controlada por muitos circuitos reguladores que possuem ação redundante, em tal forma que a eliminação parcial das células T_{REG} poderia ser totalmente compensada por outros sinais supressores.

A etiologia da lesão cardíaca permanece controversa, sendo que as principais hipóteses apontam para a reatividade local frente aos parasitas de *T. cruzi* persistentes (TARLETON; ZHANG, 1999) ou para a autoimunidade (DOS SANTOS *et al.*, 1992; CUNHA-NETO; KALIL, 1995; LEON; ENGMAN, 2001). Assim, ainda que as T_{REG} não estejam envolvidas na regulação da resposta imune parasito-específica e, em consequência, na regulação do controle ao *T. cruzi*, deveríamos esperar que as T_{REG} participassem no controle da autorreatividade contra antígenos do tecido cardíaco. Assim, o fato da miocardite não ter piorado após a depleção parcial de T_{REG} sugere que no modelo de infecção de camundongos C3H/HePAs por parasitas Sylvio X10/4 o componente de autoimunidade não é o principal elemento envolvido no desenvolvimento da miocardiopatia crônica.

7 CONCLUSÕES FINAIS

No 14º dia da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Y (fase aguda), há um aumento no número de células CD4⁺FoxP3⁺ esplênicas que não é superior a 2 vezes, enquanto que para a população TCD4⁺ o aumento é de 4 vezes. O nível de expressão (MFI) da molécula FoxP3 pelas células TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pequenas não muda com a infecção. Já para a expressão de CD25 e de CD122, há um aumento na expressão dessas moléculas nas células TCD4⁺FoxP3⁺.

Os marcadores de membrana GITR, CD122 e CD127 não possibilitam o isolamento das células TCD4⁺FoxP3⁺ do animal infectado pelas metodologias de coluna com microesferas imantadas ou “sorting”. Assim, a molécula CD25 pode ser considerada, por enquanto, o melhor alvo para se fazer a depleção das células T_{REG}, uma vez que esta população expressa os maiores níveis de CD25, tanto no animal controle, quanto no infectado.

O tratamento com PC61 induz uma queda importante e significativa na frequência e número de esplenócitos TCD4⁺FoxP3⁺ tanto nos animais não infectados como nos animais infectados pelo *T. cruzi*. Esta diminuição é particularmente intensa na população de células TCD4⁺FoxP3⁺ pequenas. Para os blastos de células TCD4⁺FoxP3⁺ dos animais infectados, entretanto, observa-se até um pequeno aumento para o grupo tratado com PC61. A depleção parcial das células T_{REG} pelo tratamento com anti-CD25 não promoveu alteração na curva de parasitemia ou na intensidade da patologia cardíaca dos animais infectados na fase aguda.

Ao contrário do observado na fase aguda da infecção de camundongos C57BL/6 pelo *T. cruzi* da cepa Y, não houve mudanças significativas (em relação aos animais não infectados) no número de células TCD4⁺FoxP3⁺, pequenas ou grandes, ou na mediana de fluorescência para FoxP3 e CD25 durante a fase crônica da infecção.

A remoção das células CD25⁺ da suspensão de esplenócitos de camundongo crônico resulta em aumento da resposta proliferativa a antígeno de *T. cruzi* pelas células TCD8⁺ (e em menor intensidade pelas células TCD4⁺) em relação à resposta na suspensão celular de esplenócitos totais. Estes resultados sugerem que as células T_{REG} participam de alguma forma na infecção crônica pelo *T. cruzi*.

Os camundongos crônicos tratados com o MoAb anti-CD25 (PC61) apresentam uma redução na frequência de células FoxP3⁺ e uma tendência a diminuição no número total destas células. No entanto, a resposta imune ao parasita, medida pela produção de citocinas, assim como a carga parasitária sistêmica e a patologia cardíaca não foram alteradas em decorrência do tratamento.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.155, p. 3955-3963, 1995.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate I. **Immun. Cell.**, v.124, p. 783-801, 2006.

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta. Trop.**, v.35, p. 209-219, 1978.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v.64, p. 1961-1967, 1996.

ARGIBAY, P.F.; DI NOIA, J.M.; HIDALGO, A.; MOCETTI, E.; BARBICH, M.; LORENTI, A.S.; BUSTOS, D.; TAMBUTTI, M.; HYON, S.H.; FRASCH, A.C.; SANCHEZ, D.O. *Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. **Glycobiology**, v.12, p. 25-32, 2002.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H.C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.177, p. 3515-3519, 2006.

BARRAT, F.J.; CUA, D.J.; BOONSTRA, A.; RICHARDS, D.F.; CRAIN, C.; SVELKOU, H.F.; DE WAAL-MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; HAWRYLOWICZ, C.M.; 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.**, v.195, p. 603-616, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420, p. 502-507, 2002.

BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. **Eur. J. Immunol.**, v.38, p. 918-921, 2008.

BENNETT, C.L.; CHRISTIE, J.; RAMSDELL, F.; BRUNKOW, M.E.; FERGUSON, P.J.; WHITESELL, L.; KELLY, T.E.; SAULSBURY, F.T.; CHANCE, P.F.; OCHS, H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome IPEX is caused by mutations of FOXP3. **Nat. Genet.**, v.27, p. 20-21, 2001.

BLUESTONE, J.A.; ABBAS, A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, p. 253-257, 2003.

BOUDOUSQUIE, C.; PELLATON, C.; BARBIER, N.; SPERTINI, F. CD4+CD25+ T cell depletion impairs tolerance induction in a murine model of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v.39, p. 1415-1426, 2009.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.**, v.18, p. 247-292, 1980.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.49, p. 175-200, 1995.

CAMBOS, M.; BELANGER, B.; JACQUES, A.; ROULET, A.; SCORZA, T. Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi adami* infection and do not contribute to immune evasion. **Int. J. Parasitol.**, v.38, p. 229-238, 2008.

CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E.P.; PROCOPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; SMITH, J.A.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v.167, p. 416-423, 2001.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.**, v.64, p. 128-134, 1996.

CERRONE, M.C.; KUHN, R.E. Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cell Immunol.**, v.138, p. 423-436, 1991.

CHAGAS, C.R.J.D. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218, 1909.

CHATENOUD, L.; PRIMO, J.; BACH, J.F. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. **J. Immunol.**, v.158, p. 2947-2954, 1997.

CHATILA, T.A.; BLAESER, F.; HO, N.; LEDERMAN, H.M.; VOULGAROPOULOS, C.; HELMS, C.; BOWCOCK, A.M. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. **J. Clin. Invest.**, v.106, p. R75-81, 2000.

CHAUSSABEL, D.; PAJAK, B.; VERCRUYSSSE, V.; BISSEYE, C.; GARZE, V.; HABIB, M.; GOLDMAN, M.; MOSER, M.; VRAY, B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab. Invest.**, v.83, p. 1373-1382, 2003.

CHIARI, E.; DIAS, J.C.; LANA, M.; CHIARI, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.22, p. 19-23, 1989.

CORTEZ, M.; SILVA, M.R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G.R.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. **Microbes Infect.**, v.8, p. 36-44, 2006.

COSTA, V.M.; TORRES, K.C.; MENDONÇA, R.Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K.J.; ABRAHAMSOHN, I.A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.177, p. 3193-3200, 2006.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Med. J.**, v.113, p. 757-766, 1995.

CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R.E.; ROWLAND, E.C. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. **Infect. Immun.**, v.22, p. 155-160, 1978.

DE OLIVEIRA, R.B.; TRONCON, L.E.; DANTAS, R.O.; MENGHELLI, U.G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 884-889, 1998.

D'IMPERIO LIMA, M.R.; 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.**, v.15, p. 201-203, 1985.

DIAS, J.C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.22, p. 147-156, 1989 .

DIAS, E.; LARANJA, F.S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v.14, p. 1035-1060, 1956.

DOS SANTOS, R.R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SILVA, J.S.; SAVINO, W.; MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, v.175, p. 29-39, 1992.

DOSREIS, G.A.; PECANHA, L.M.; BELLIO, M.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. **Microbes Infect.**, v.4, p. 1007-1013, 2002.

DOSREIS, G.A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M.P.; LOPES, M.F. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. **Trends Parasitol.**, v.21, p. 237-243, 2005.

DOSREIS, G.A.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; GUILLERMO, L.V.; LOPES, M.F. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.18, p. 97-105, 2007.

DUTRA, W.O; GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.21, p. 287-292, 2008.

DVORAK, J.A.; HYDE, T.P. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp. Parasitol.**, v.34, p. 268-283, 1973.

FERNANDEZ, M.A.; PUTTUR, F.K.; WANG, Y.M.; HOWDEN, W.; ALEXANDER, S.I.; JONES, C.A. T regulatory cells contribute to the attenuated primary CD8+ and CD4+ T cell responses to herpes simplex virus type 2 in neonatal mice. **J Immunol.**, v.180, p. 1556-1564, 2008.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v.4, p. 330-336, 2003.

FONTENOT, J.D.; RASMUSSEN, J.P.; WILLIAMS, L.M.; DOOLEY, J.L.; FARR, A.G.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v.22, p. 329-341, 2005.

FRANCOLINO, S.S.; ANTUNES, A.F.; TALICE, R.; ROSA, R.; SELANIKIO, J.; DE REZENDE, J.M.; ROMANHA, A.J.; DIAS, J.C. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.36, p. 103-107, 2003.

GASCÓN, J.; ALBAJAR, P.; CAÑAS, E. FLORES; M.; GÓMEZ, I.; PRAT, J.; HERRERA, R.N.; LAFUENTE, C.A.; LUCIARDI, H.L.; MONCAYO, A.; MOLINA, L.; MUÑOZ, J.; PUENTE, S.; SANZ, G.; TREVIÑO, B.; SERGIO-SALLES, X. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v.26, p. 99-106, 2008.

GAO, W.; PEREIRA, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to Trypanosoma cruzi. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 167-170, 2002.

GAVIN, M.A.; CLARKE, S.R.; NEGROU, E.; GALLEGOS, A.; RUDENSKY, A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. **Nat. Immunol.**, v.3, p. 33-41, 2002.

GOBLE, F.C.; BOYD, J.L. Reticulo-endothelial blockade in experimental Chagas' disease. **J. Parasitol.**, v.48, p. 223-228, 1962.

GODFREY, V.L.; WILKINSON, J.E.; RUSSELL, L.B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy sf mutant mouse. **Am. J. Pathol.**, v.138, p. 1379-1387, 1991.

GOLDEN, J.M.; TARLETON, R.L. Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.**, v.72, p. 391-402, 1991.

GONZALEZ, A.; ANDRE-SCHMUTZ, I.; CARNAUD, C.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. **Nat. Immunol.**, v.2, p. 1117-1125, 2001.

GRAEFE, S.E.; STREICHERT, T.; BUDDE, B.S.; 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**, v.1, p. 1-11, 2006.

GREINER, D.L.; MORDES, J.P.; HANDLER, E.S.; ANGELILLO, M.; NAKAMURA, N.; ROSSINI, A.A. Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreeding/Worcester BB/W rats. **J. Exp. Med.**, v.166, p. 461-475, 1987.

GRISOTTO, M.G.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; MARINHO, C.R.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A.; ALVAREZ, J.M. Most parasite-specific CD8+ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha and CD8 molecules. **Immunology**, v.102, p. 209-217, 2001.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G.. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v.389, p. 737-742, 1997

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G.A.; YOCKTENG, R.; CÁRDENAS-ARROYO, F.; FORNACIARI, G.; ARRIAZA, B.; AUFDERHEIDE, A.C. Isolation of Trypanosoma cruzi DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.108, p. 401-407, 1999.

HAYASHI, T.; HASEGAWA, K.; ADACHI, C. Elimination of CD4+ CD25+ T cell accelerates the development of glomerulonephritis during the preactive phase in autoimmune-prone female NZB x NZW F mice. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.86, p. 289-296, 2005.

HAYES, M.M.; KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic Trypanosoma cruzi infection. **Infect. Immun.**, v.31, p. 1117-1124, 1981.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C.A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A.W.; SHEVACH, E.M.; WYNN, T.A. The pathogenesis of

schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. Immunol.**, v.172, p. 3157-3166, 2004.

HIGUCHI, M.D.; RIES, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.56, p. 485-489, 1997.

HIGUCHI M.D.E.; L.; BENVENUTI, L.A.; MARTINS, REIS. M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res.**, v.60, p. 96-107, 2003.

HISAEDA, H.; MAEKAWA, Y.; IWAKAWA, D.; OKADA, H.; HIMENO, K.; KISHIHARA, K.; TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nat. Med.**, v.10, p. 29-30, 2004.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect. Immun.**, v.66, p. 1208-1215, 1998.

HORI, S.; CARVALHO, T.L.; DEMENGEOT, J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by Pneumocystis carinii in immunodeficient mice. **Eur. J. Immunol.**, v.32, p. 1282-1291, 2002.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.**, v.299, p. 1057-1061, 2003.

HUANG, H.; CHAN, J.; WITTNER, M.; JELICKS, L.A.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; BRAUNSTEIN, V.L.; BACCHI, C.J.; YARLETT, N.; CHANDRA, M.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H.B. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected mice. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.31, p. 75-88, 1999.

INOBE, J.; SLAVIN, A.J.; KOMAGATA, Y.; CHEN, Y.; LIU, L.; WEINER, H.L. 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.**, v.28, p. 2780-2790, 1998.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p. 95-97, 2007.

JARON, B.; MARANGHI, E.; LECLERC, C.; MAJLESSI, L. Effect of attenuation of Treg during BCG immunization on anti-mycobacterial Th1 responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS. One.**, v.3, e2833, 2008.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.192, p. 1213-1222, 2000.

JUNQUEIRA JUNIOR, L.F.; BERALDO, P.S.; CHAPADEIRO, E.; JESUS, P.C. Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas' disease. **Cardiovasc. Res.**, v.26, p. 324-329, 1992.

KEMPER, C.; CHAN, A.C.; GREEN, J.M.; BRETT, K.A.; MURPHY, K.M.; ATKINSON, J.P. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. **Nature**, v.421, p. 388-392, 2003.

KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S.A.; RAMSDELL, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **Nat. Immunol.**, v.4, p. 337-342, 2003.

KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v.112, p. 1839-1844, 1974.

KIERSZENBAUM, F.; HOWARD, J.G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J Immunol.**, v.116: p. 1208-1211, 1976.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev.*, v.12, p. 210-223, 1999.

KINGSLEY, C.I.; KARIM, M.; BUSHELL, A.R.; WOOD, K.J. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. **J. Immunol.**, v.168, p. 1080-1086, 2002.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-

dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v.177, p. 7059-7066, 2006.

KOHN, A.P.; MCMAHON, J.S.; PODOJIL, J.R.; BEGOLKA, W.S.; DEGUTES, M.; KASPROWICZ, D.J.; ZIEGLER, S.F.; MILLER, S.D. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. **J. Immunol.**, v.176, p. 3301-3305, 2006.

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.**, v.75, p. 861-869, 2007.

KRETTLI, A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* chronic infections in humans: usefulness of the complement regulatory protein antigens and lytic antibodies in the control of cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p. 301-304, 1999.

KROPF, S. P. Science, health and development: Chagas disease in Brazil, 1943-1962. **Parassitologia**, v.47, p. 379-386, 2005.

KUMAR, S. & TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, v.20, p. 207-216, 1998.

LEIBY, D.A.; HERRON, R.M.J.R.; READ, E.J.; LENES, B.A.; STUMPF, R.J. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. **Transfusion**. v.42, p. 549-55, 2002.

LEON, J.S. & ENGMAN, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p. 555-561, 2001.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M.G. Human cd25 + cd4 + t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. **J. Exp. Med.**, v.193, p. 1295-1302, 2001.

LEVY-LAHAD, E.; WILDIN, R.S. Neonatal diabetes mellitus, enteropathy, thrombocytopenia, and endocrinopathy: Further evidence for an X-linked lethal syndrome. **J. Pediatr.**, v.138, p. 577-580, 2001.

LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; XU, D.; LIEW, F.Y. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Proc. Natl. Acad. Science. U.S.A.**, v.103, p. 7048-7053, 2006a.

LIU, W.; PUTNAM, A.L.; XU-YU, Z.; SZOT, G.L.; LEE, M.R.; ZHU, S.; GOTTLIEB, P.A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T.R.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D.M.; ZIEGLER, S.F.; BLUESTONE, J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J. Exp. Med.**, v.203, p. 1701-1711, 2006b.

LONG, T.T.; NAKAZAWA, S.; ONIZUKA, S.; HUAMAN, M.C.; KANBARA, H. Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. **Int. J. Parasitol.**, 33, p. 175-183, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; ROSSI, M.A.; ESPER, L.; TANOWITZ, H.B.; ALIBERTI, J.; SILVA, J.S. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect.**, v.10, p. 1558-1566, 2008.

MALOY, K.J. & POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat. Immunol.**, v.2, p. 816-822, 2001.

MARIANO, F.S.; GUTIERREZ, F.R.; PAVANELLI, W.R.; MILANEZI, C.M.; CAVASSANI, K.A.; MOREIRA, A.P.; FERREIRA, B.R.; CUNHA, F.Q.; CARDOSO, C.R.; SILVA, J.S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect.**, v.10, p. 825-833, 2008.

MARINHO, C.R.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v.67, p. 308-318, 1999.

MARINHO, C.R.; BUCCI, D.Z.; DAGLI, M.L.; BASTOS, K.R.; GRISOTTO, M.G.; SARDINHA, L.R.; BAPTISTA, C.R.; GONCALVES, C.P.; LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a Trypanosoma cruzi clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v.72, p. 2350-2357, 2004.

MARINHO, C.R.; NUNEZ-APAZA, L.N.; MARTINS-SANTOS, R.; BASTOS, K.R.; BOMBEIRO, A.L.; BUCCI, D.Z.; SARDINHA, L.R.; LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 Trypanosoma cruzi parasites. **Scand. J. Immunol.**, v.66, p. 297-308, 2007.

MARTIN, D.L.; TARLETON, R.L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v.174, p. 1594-1601, 2005.

MARTIN, D.L.; WEATHERLY, D.B.; LAUCELLA, S.A.; CABINIAN, M.A.; CRIM, M.T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, S.H.; ROSENBERG, C.S.; COLLINS, M.H.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, R.L. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS. Pathog.**, v.2, e77, 2006.

MARTINEZ-DIAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96, p. 53-59, 2001.

MATSUSHITA, N.; PILON-THOMAS, S.A.; MARTIN, L.M.; RIKER, A.I. Comparative methodologies of regulatory T cell depletion in a murine melanoma model. **J. Immunol. Methods**, v.333, p. 167-179, 2008.

MCHUGH, R.S.; WHITTERS, M.J.; PICCIRILLO, C.A.; YOUNG, D.A.; SHEVACH, E.M.; COLLINS, M.; BYRNE, M.C. CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v.16, p. 311-323, 2002.

MEYER ZUM BUSCHENFELDE, C.; CRAMER, S.; TRUMPFHELLER, C.; FLEISCHER, B.; FROSCH, S. *Trypanosoma cruzi* induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma IFN-gamma production. **Clin. Exp. Immunol.**, v.110, p. 378-385, 1997

MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A.; PEREIRA, P.; MOTA SANTOS, T.; COUTINHO, A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. **Int. Immunol.**, v.1, p. 176-184, 1989.

MORDES, J.P.; GALLINA, D.L.; HANDLER, E.S.; GREINER, D.L.; NAKAMURA, N.; PELLETIER, A.; ROSSINI, A.A. Transfusions enriched for W3/25+ helper/inducer T lymphocytes prevent spontaneous diabetes in the BB/W rat. **Diabetologia**, v.30, p. 22-26, 1987.

MORGAN, D.A.; RUSCETTI, F.W.; GALLO, R.. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, v.193, p. 1007-1008, 1976

MORRISSEY, P.J.; CHARRIER, K.; BRADY, S.; LIGGITT, D.; WATSON, J.D. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when

transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. **J. Exp. Med.**, v.178, p. 237-244, 1993.

MULLER, U.; KOHLER, G.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; ALBER, G.; DI SANTO, J.P.; BROMBACHER, F.; HOLSCHEER, C. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. **J. Immunol.**, v.167, p. 3346-3353, 2001.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A.; FERNÁNDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.**, V.22, 301-307, 1992.

NAKAMURA, K.; OKAMURA, H.; NAGATA, K.; KOMATSU, T.; TAMURA, T. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v.61, p. 64-70, 1993.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 + CD25 + regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v.194, p. 629-644, 2001.

NICKELL, S.P.; KEANE, M.; SO, M. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. **Infect. Immun.**, v.61, p. 3250-3258, 1993.

NISHIZUKA, Y.; SAKAKURA, T.; SHISA, H.; NISHIZUKA, Y.; SAKAKURA, T.; MIYAWAKI, H.; NAKAKUKI, K.. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice Interference of leukemogenesis by mammary tumorigenesis in a colony of AKR mice. **Science.**, v.166, p. 753-755, 1969

OLIVEIRA, A.C.; PEIXOTO, J.R.; DE ARRUDA, L.B.; CAMPOS, M.A.; GAZZINELLI, R.T.; GOLENBOCK, D.T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J. Immunol.**, v.173, p. 5688-5696, 2004.

ONIZUKA, S.; TAWARA, I.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S.; FUJITA, T.; NAKAYAMA, E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. **Cancer. Res.**, v.59, p. 3128-3133, 1999.

PASARE, C. & MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science**, v.299, p. 1033-1036, 2003.

PENHALE, W.J.; FARMER, A.; MCKENNA, R.P.; IRVINE, W.J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. **Clin. Exp. Immunol.**, v.15, p. 225-236, 1973.

PENHALE, W.J.; IRVINE, W.J.; INGLIS, J.R.; FARMER, A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v.25, 6-16, 1976.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, v.193, p. 90-98, 1999.

PINTO DIAS, J.C. Natural history of Chagas disease. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.65, p. 359-366, 1995.

POWELL, B.R.; BUIST, N.R.; STENZEL, P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. **J. Pediatr.**, v.100, p. 731-737, 1982.

POWRIE, F.; MASON, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. **J. Exp. Med.**, v.172, p. 1701-1708, 1990.

POWRIE, F.; LEACH, M.W.; MAUZE, S.; CADDLE, L.B.; COFFMAN, R.L. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **Int. Immunol.**, v.5, p. 1461-1471, 1993.

RAD, R.; BRENNER, L.; BAUER, S.; SCHWENDY, S.; LAYLAND, L.; DA COSTA, C.P.; REINDL, W.; DOSSUMBEKOVA, A.; FRIEDRICH, M.; SAUR, D.; WAGNER, H.; SCHMID, R.M.; PRINZ, C. CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. **Gastroenterology**, v.131, p. 525-537, 2006.

RAMSEY, J.M.; ALVEAR, A.L.; ORDONEZ, R.; MUNOZ, G.; GARCIA, A.; LOPEZ, R.; LEYVA, R. Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. **Med. Vet. Entomol.**, v.19, p. 219-228, 2005.

READ, S.; MALMSTROM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25 + CD4 + regulatory cells that control intestinal inflammation. **J. Exp. Med.**, v.192, p. 295-302, 2000.

REED, S.G.; LARSON, C.L.; SPEER, C.A. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. **Z. Parasitenkd.**, v.52, p. 11-17, 1977.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S., JR.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.48, p. 637-644, 1993.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MENGEL, J.O.; POSTOL, E.; SOARES, R.A.; FERREIRA-FERNANDEZ, E.; SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, v.23, p. 93-101, 2001.

RONCHETTI, S.; ZOLLO, O.; BRUSCOLI, S.; AGOSTINI, M.; BIANCHINI, R.; NOCENTINI, G.; AYROLDI, E.; RICCARDI, C. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. **Eur. J. Immunol.**, v.34, p. 613-622, 2004.

ROTTENBERG, M.; CARDONI, R.L.; ANDERSSON, R.; SEGURA, E.L.; ORN, A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**, v.28, p. 573-582, 1988.

ROTTENBERG, M.E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immunol.**, v.61, p. 5129-5133, 1993.

ROTTENBERG, M.E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHEH, J.; PETRAY, P.; RUIZ, A.M.; WIGZELL, H.; ORN, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol. Lett.**, v.45, p. 53-60, 1995.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur. Immunol.**, v.139, p. 225-236, 1988.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M.C.; MINOPRIO, P.; HONTEYBERIE-JOSKOWICZ, M. The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. **Immunol. Lett.**, v.49, p. 163-168, 1996.

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.**, v.156, p. 1577-1586, 1982.

SAKAGUCHI, S.; FUKUMA, K.; KURIBAYASHI, K.; MASUDA, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. **J. Exp. Med.**, v.161, p. 72-87, 1985.

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.**, v.155, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v.6, p. 345-352, 2005.

SALES, P.A., JR.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R.V.; VIEIRA, V.; ARANTES, R.M.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R.T. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, v.10, p. 680-688, 2008.

SARDINHA, L.R.; ELIAS, R.M.; MOSCA, T.; BASTOS, K.R.; MARINHO, C.R.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. 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.**, v.74, p. 2031-2042, 2006.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends. Parasitol.**, v.22, p. 583-588, 2006.

SCOTT-BROWNE, J.P.; SHAFIANI, S.; TUCKER-HEARD, G.; ISHIDA-TSUBOTA, K.; FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y.; BEVAN, M.J.; URDAHL, K.B. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **J. Exp. Med.**, v.204, p. 2159-2169, 2007.

SHEVACH, E.M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2, p. 389-400, 2002.

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.**, v.3, p. 135-142, 2002.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia. Clin. Biol**, v.20, p. 191- 203, 1953.

SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J. Exp. Med.**, v.174, p. 539-545, 1991.

SILVEIRA, F.V.D., M.; 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 Medica, Belém**, v.1, p. 61- 62, 1979.

SMITH, H.; LOU, Y.H.; LACY, P.; TUNG, K.S. Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v.149, p. 2212-2218, 1992.

SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.73, p. 547-559, 2001.

SOUTO-PADRON, T.; CHIARI, E.; DE SOUZA, W. The surface charge of trypanosomatids of the genus *Trypanosoma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.85, p. 215-219, 1990.

SOSA-ESTANI, S., SEGURA, E.L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.19, p. 583-587, 2006.

Steindel, M.; Kramer Pacheco, L.; Scholl, D.; Soares, M.; de Moraes, M.H.; Eger, I.; Kosmann, C.; Sincero, T.C.; Stoco, P.H.; Murta, S.M.; de Carvalho-Pinto, C.J.; Grisard, E.C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.60, p. 25-32, 2008.

STEMPIN, C.; GIORDANENGO, L.; GEA, S.; CERBAN, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. **J. Leukoc. Biol.**, v.72, p. 727-734, 2002.

STEPHENS, L.A.; GRAY, D.; ANDERTON, S.M. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.102, p. 17418-17423, 2005.

SUFFIA, I.; RECKLING, S.K.; SALAY, G.; BELKAID, Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v.174, p. 5444-5455, 2005.

SUVAS, S.; AZKUR, A.K.; KIM, B.S.; KUMARAGURU, U.; ROUSE, B.T. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. **J. Immunol.**, v.172, p. 4123-4132, 2004

TADOKORO, C.E.; VALLOCHI, A.L.; RIOS, L.S.; MARTINS, G.A.; SCHLESINGER, D.; MOSCA, T.; KUCHROO, V.K.; RIZZO, L.V.; ABRAHAMSOHN, I.A. Experimental autoimmune encephalomyelitis can be prevented and cured by infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Autoimmun.**, v.23, p. 103-115, 2004.

TAKAHASHI, T.; TAGAMI, T.; YAMAZAKI, S.; UEDE, T.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, N.; MAK, T.W.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25 + CD4 + regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J. Exp. Med.**, v.192, p. 303-310, 2000.

TANOWITZ, H.B.; MACHADO, F.S.; JELICKS, L.A.; SHIRANI, J.; DE CARVALHO, A.C.; SPRAY, D.C.; FACTOR, S.M.; KIRCHHOFF, L.V.; WEISS, L.M. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease Chagas disease . **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v.51, p. 524-539, 2009.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v.144, p. 717-724, 1990.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v.356, p. 338-340, 1992.

TARLETON, R.L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today**, v.11, p. 7-9, 1995.

TARLETON, R.L. & ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol. Today**, v.15, p. 94-99, 1999.

TARLETON, R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Immunol.**, v.19: p. 430-434, 2007.

TEIXEIRA, A.R.; TEIXEIRA, M.L.; SANTOS-BUCH, C.A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. **Am. J. Pathol.**, v.80, p. 163-180, 1975.

TEIXEIRA, A.R.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **J. Clin. Invest.**, v.62, p. 1132-1141, 1978

TRZONKOWSKI, P.; SZMIT, E.; MYSLIWSKA, J.; DOBYSZUK, A.; MYSLIWSKI, A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. **Clin. Immunol.**, v.112, p. 258-267, 2004.

UENAKA, A. & NAKAYAMA, E. Murine leukemia RL male 1 and sarcoma Meth A antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes CTL. **Cancer Sci.**, v.94, p. 931-936, 2003.

VIGARIO, A.M.; GORGETTE, O.; DUJARDIN, H.C.; CRUZ, T.; CAZENAVE, P.A.; 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.**, v.37, p. 963-973, 2007.

VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **Br. Med. Bull.**, 41: p. 105-114, 1985.

VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; MASSARA, R.L.; BORGES, J.D.; LAGE, P.S.; LANA, M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DIAS, J.C.; ELOI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25^{high} T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin. Exp. Immunol.**, v.145, p. 81-92, 2006.

WALDMANN, T.A. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. **Science**, p. 232,727-732, 1986.

WEI, J.; DURAMAD, O.; PERNG, O.A.; REINER, S.L.; LIU, Y.J.; QIN, F.X. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p. 18169-18174, 2007.

WEINER, Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol. Rev.**, v.182, p. 207-214, H.L. 2001.

WILDIN, R.S.; RAMSDELL, F.; PEAKE, J.; FARAVELLI, F.; CASANOVA, J.L.; BUIST, N.; LEVY-LAHAD, E.; MAZZELLA, M.; GOULET, O.; PERRONI, L.; BRICARELLI, F.D.; BYRNE, G.; MCEUEN, M.; PROLL, S.; APPLEBY, M.; BRUNKOW, M.E. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. **Nat. Genet.**, v.27, p. 18-20, 2001.

ZELENAY, S. & DEMENGEOT, J. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". **J. Immunol.**, v.177, p. 2036-2037, author reply 2037-2038, 2006.