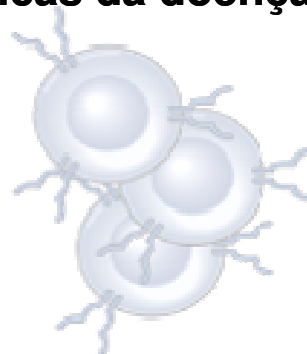
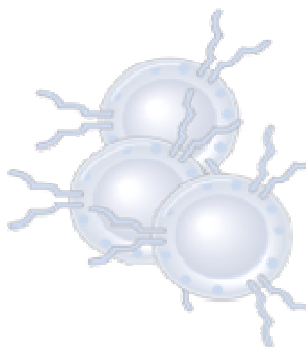
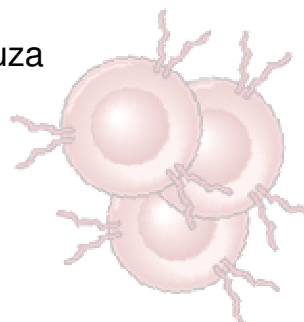


**Avaliação do perfil de migração, ativação e produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.**



Jacqueline Araújo Fiuza



Belo Horizonte-MG  
Agosto/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jacqueline Araújo Fiuza

**Avaliação do perfil de migração, ativação e produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em biomedicina

Orientador: Dr. Rodrigo Correa-Oliveira<sup>1</sup>

1- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Belo Horizonte-MG

Agosto/2008

O trabalho experimental desta dissertação foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

## **COLABORADORES:**

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau<sup>1,2</sup>

Dra. Andréa Teixeira Carvalho<sup>2</sup>

Dr. Olindo Assis Martins Filho<sup>2</sup>

Dr. Manoel Otávio Costa Rocha<sup>3</sup>

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1,4</sup>

Ana Thereza Chaves<sup>5,1</sup>

Fernanda Fortes de Araújo<sup>1</sup>

Rafaelle Christine Gomes Fares<sup>1</sup>

**1-** Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

**2-** Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

**3-** Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias(CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

**4-** Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine- The George Washington University

**5-** Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Biomedicina da Santa Casa de Misericórdia de BH/MG

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico(CNPq)

PAPES/FIOCRUZ

FAPEMIG

Dedico este trabalho a minha mãe, Tica e Flaviano, por fazerem parte da minha vida. Ao meu pai, vivo  
em minha memória e em meu coração.  
Ao André, que me completa com o seu infinito amor.

**“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.**

*Dalai Lama*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>01</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>02</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>03</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
1. População Estudada	22
2. Obtenção do antígeno solúvel de <i>Trypanosoma cruzi</i> (EPI)	24
3. Análise do fenótipo celular dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico	24
4. Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>	25
10. Análise estatística	33
<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
1. Expressão da molécula de adesão CD62L por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico	35
2. Expressão do receptor de quimiocina CCR7 por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico	43
3. Expressão das moléculas co-estimulatórias CD45RA e CD45RO por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico	48
4. Expressão das moléculas co-estimulatórias/adesão CD45RA/CCR7 e CD45RO/CCR7 por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de doença de Chagas e indivíduos não infectados	60
5. Expressão de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ e IL-10) por células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> apresentando o fenótipo celular CD45RA <sup>high</sup> e CD45RO <sup>high</sup> no sangue periférico de indivíduos portadores de doença de Chagas e não infectados	67
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>

<b>CONCLUSÃO</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>111</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2- Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo</b>	<b>32</b>

## LISTA DE TABELA

**TABELA 1: Características da população estudada**

**22**

## LISTA DE QUADRO

**QUADRO 1: Relação dos anticorpos usados para caracterização das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> 27**

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>high</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> do sangue periférico	35
GRÁFICO 2- Avaliação do percentual de células T CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>high</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> do sangue periférico	37
GRÁFICO 3- Avaliação da razão de células T CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>Total</sup> /CD62L <sup>-</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>high</sup> /CD62L <sup>-</sup> do sangue periférico	39
GRÁFICO 4- Avaliação da razão de células T CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>Total</sup> /CD62L <sup>-</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>high</sup> /CD62L <sup>-</sup> do sangue periférico	40
GRÁFICO 5- Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>high</sup> e CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> do sangue periférico	42
GRÁFICO 6- Avaliação do percentual de células T CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>high</sup> e CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>-</sup> do sangue periférico	43
GRÁFICO 7- Avaliação da razão de células T CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> /CCR7 <sup>-</sup> e CD8 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> /CCR7 <sup>-</sup> do sangue periférico	45
GRÁFICO 8- Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> do sangue periférico	47
GRÁFICO 9- Avaliação do percentual de células T CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> do sangue periférico	48
GRÁFICO 10- Avaliação da razão de células T CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>Total</sup> /CD45RA <sup>-</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> /CD45RA <sup>-</sup> do sangue periférico	50
GRÁFICO 15- Avaliação da razão de células T CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>Total</sup> /CD45RO <sup>-</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> /CD45RO <sup>-</sup> do sangue periférico	57
GRÁFICO 16- Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> /CCR7 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> CCR7 <sup>-</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>-</sup> do sangue periférico	60
GRÁFICO 17- Avaliação do percentual de células T CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> /CCR7 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>high</sup> CCR7 <sup>-</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> /CCR7 <sup>-</sup> do sangue periférico	61
GRÁFICO 18- Avaliação do percentual de células T CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> /CCR7 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> CCR7 <sup>-</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> /CCR7 <sup>+</sup> do sangue periférico	63
GRÁFICO 19- Avaliação do percentual de células T CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> /CCR7 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>high</sup> CCR7 <sup>-</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> /CCR7 <sup>+</sup> do sangue periférico	64

<b>GRÁFICO 20-</b>	<b>Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN-γ<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> do sangue periférico</b>	<b>66</b>
<b>GRÁFICO 21-</b>	<b>Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN-γ<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> do sangue periférico</b>	<b>67</b>
<b>GRÁFICO 22-</b>	<b>Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN-γ<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> do sangue periférico</b>	<b>69</b>
<b>GRÁFICO 23-</b>	<b>Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN-γ<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> do sangue periférico</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – alofococianina
- BCR**- receptor de células B
- BSA** – albumina sérica bovina
- CARD** – indivíduos portadores da forma clínica cardíaca
- CCL**- ligante de quimiocinas
- CCR**- receptor de quimiocina
- CD** –grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CD3**- marcador de superfície celular da população de linfócitos T
- CD5**- marcador de superfície de células T e B secretoras de IgM
- CD20**- marcador de células B maduras
- CD25** – cadeia  $\alpha$  do receptor para a citocina IL-2
- CD4** – marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD8** – marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD69**- marcador de células T ativadas
- CD62L**- molécula de adesão expressa em leucócitos não ativados
- CD45RA**- marcador de superfície celular da população de linfócitos T virgens
- CD45RO**- marcador de superfície celular da população de linfócitos T de memória
- CDG** – indivíduos portadores da forma clínica cardiodigestiva
- COEP**- Comitê de Ética em Pesquisa
- CTL**- células citotóxicas
- CTR-DIP**- Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
- CXCR3**- receptor de quimiocina expresso em células T e NK ativadas
- DNA**- ácido desoxirribonucléico
- DIG** – Indivíduos portadores da forma clínica digestiva
- DTH**- Reação de Hipersensibilidade Tardia
- ECG**- eletrocardiograma
- EDTA**- ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA**- ensaio imunoenzimático
- HAI**- hemaglutinação indireta
- HAS**- hipertensão arterial sistêmica
- EPI** – formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína
- FL** – fluorescência
- FLS**- solução de lise
- FOXP<sub>3</sub>**- Forkhead Box P3 (regulador transcrricional)

**FSC** – Foward scalter, dispersão frontal relativa ao tamanho

**GITR**- receptor da família do receptor de TNF induzido por glicocorticóides

**GlyCAM-1**- molécula expressa nas vênulas do endotélio alto

**HEV**- vênulas especializadas do endotélio

**HLA-DR** – Antígeno Leucocitário Humano

**Id**- anticorpo anti-idiotípico

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gamma

**Ig** – imunoglobulina

**IL** – interleucina

**IND** – indivíduos portadores da forma clínica indeterminada

**KO**- knock-out

**LCMV**- Vírus da Coriomeningite Linfocítica

**LFA-1**- função do linfócito associado ao antígeno 1

**LIT** – meio de cultivo para formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (Liver Infusion Tryptose)

**LT**- linfócitos T

**MFF** – solução fixadora

**MHC**- complexo maior de histocompatibilidade

**mRNA**- RNA mensageiro

**n**- número de indivíduos analisados

**NHS**- soro humano AB

**NO**- óxido nítrico

**NK**- células “natural killers”

**NI** – grupo não infectado

**PBMC** – células mononucleares do sangue periférico

**PBS** – Tampão Fosfato Salínico

**PBS-P** – PBS-W com 0,5% de saponina

**PBS-W** – PBS com 0,5% de albumina sérica bovina

**PCR**- reação em cadeia da polimerase

**PE** – ficoeritrina

**PE Cy5**- ficoeritrina associado ao cycromo 5

**RIFI**- reação de imunofluorescência indireta

**RPMI** – meio de cultura ( Rosweil Park Memorial Institute)

**RT-PCR**- transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase

**SBF** – soro bovino fetal

**SLO**- órgãos linfóides secundários

**SSC** – Side Scalter ou dispersão lateral relativa à complexidade celular/granulosidade

**T<sub>CM</sub>**- células T de memória central

**TCR-** receptor células T

**T<sub>EM</sub>** – células T de memória efetora

**TGF- $\beta$**  – Fator de Crescimento Tumoral beta

**Th0-** células T CD4<sup>+</sup> não se diferenciadas

**Th1-** Células T CD4<sup>+</sup> secretoras de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$

**Th2-** Células T CD4<sup>+</sup> secretoras de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10

**TRIPO-** Formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*



## RESUMO

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são ainda pouco compreendidos, sugerindo que múltiplos fatores possam estar envolvidos no seu estabelecimento. O papel da migração e ativação dessas células na doença de Chagas ainda é pouco estudado apesar de ser uma análise fundamental para o entendimento da imunopatogênese causado pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Neste estudo foi avaliado o perfil de migração e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> presentes em sangue periférico, antes e após estímulo antigênico *in vitro*. Foram avaliadas células de indivíduos não infectados (NI) e de pacientes assintomáticos portadores de infecção crônica pelo *T. cruzi* denominados de indeterminados (IND) e aqueles apresentando sinais ou sintomas cardíacos, denominados de cardíacos (CARD). Foi avaliada a expressão das moléculas de superfície: CD62L, CCR7, CD45RA e CD45RO em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e o padrão de citocinas intracelulares (IFN- $\gamma$ , IL-10) sintetizadas por células virgens e de memória. Os dados mostraram que pacientes do grupo IND apresentaram menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> não ativadas (CD62L<sup>high</sup>) com potencial de migração para órgãos linfóides, células CCR7<sup>+</sup>, enquanto os pacientes CARD apresentaram maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> ativadas (CD62L<sup>-</sup>) e menor percentual de células T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. Pôde-se observar que pacientes portadores da doença de Chagas, independente da sua forma clínica, apresentaram menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> virgens (CD45RA<sup>high</sup>) e maior percentual de células de memória (CD45RO<sup>high</sup>). Já a avaliação de células memória central (T<sub>CM</sub>) e memória efetora (T<sub>EM</sub>) demonstram que esses pacientes apresentaram um percentual elevado de células T CD4<sup>+</sup>, T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>. Pacientes IND apresentaram maior número de células T CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>, enquanto o grupo CARD um maior número de células T CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>. Pode-se observar que os pacientes portadores da forma clínica IND possuem mais células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> secretando IL-10, enquanto pacientes CARD essas células secretam níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ . Neste estudo observamos diferenças no padrão de migração e ativação entre os grupos IND e CARD quando comparados ao grupo NI, como uma menor expressão de CD62L por células T CD4<sup>+</sup>, maior número de células T CD8<sup>+</sup> de memória central, associada a maior secreção de IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> por pacientes IND, poderiam estar atuando como um dos mecanismos reguladores envolvidos, tendo um papel importante na proteção de hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada.

# ABSTRACT

The mechanisms involved on the development of different clinical forms of Chagas disease are still poorly understood, suggesting that multiple factors may be involved in its establishment. The role of cell migration and activation in human Chagas disease has received little attention despite its importance to the understanding of the immunopathogenesis caused by infection with *Trypanosoma cruzi*. This study evaluates the profile of migration and activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes present in peripheral blood before and after *in vitro* antigenic stimulation. We evaluated cells from non infected individuals (NI), patients with indeterminate (IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease. We evaluated the expression of the surface molecules: CD62L, CCR7, CD45RA and CD45RO in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the pattern of intracellular cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-10) synthesized by naive and memory cells. The data showed that IND patients had lower percentages of non activated CD4<sup>+</sup> T cells (CD62L<sup>high</sup>) with potential for migration to lymphoid organs, CCR7<sup>+</sup> cells, while CARD patients showed a higher percentage of activated CD4<sup>+</sup> T cells (CD62L<sup>-</sup>) and lowest percentage CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T cells. We observed that patients with Chagas disease, independent of their clinical form, showed a lower percentage of naive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (CD45RA<sup>high</sup>) and a higher percentage of memory cells (CD45RO<sup>high</sup>). The evaluation of central memory cells (T<sub>CM</sub>) and effector memory (T<sub>EM</sub>) showed that in the whole blood from these patients there is a high percentage of both T<sub>CM</sub> and T<sub>EM</sub> CD4<sup>+</sup> T cells. IND patients had higher frequency of T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> T cells, as the group CARD presented higher number of T<sub>EM</sub> CD8<sup>+</sup> T cells. It was observed that patients with the clinical form IND have higher percentage of CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> T cells secreting IL-10, while in CARD patients these cells secreted higher levels of IFN- $\gamma$ . In this study we observed differences in the pattern of cell surface migration and activation markers between the groups, as a reduced expression of CD62L by CD4<sup>+</sup> T cells, increased number of CD8<sup>+</sup> T cells of central memory, associated with increased secretion of IL-10 by CD8<sup>+</sup> T cells in patients IND, could be serving as one of the regulatory mechanisms involved, taking an important protect role in host against a inflammatory response exacerbated.

# **INTRODUÇÃO**

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, foram registradas na América Latina vinte e uma mil mortes decorrentes da doença de Chagas no período de 2005/2006 (WHO, 2007). Estima-se que ainda existam 15 milhões de infectados na América Latina, com mais de 28 milhões de pessoas sob risco de transmissão, em cerca de 21 países endêmicos, sendo aproximadamente 41.200 novos casos por ano e 12.500 mortes/ano (WHO, 2007, DIAS, 2007). A maioria desses casos atualmente está presente nos grandes centros urbanos, em subsequência ao afluxo de indivíduos de baixa condição sócio-econômica (ROCHA *et al.*, 1994). Apesar do progresso das últimas décadas quanto à erradicação de um dos vetores, como o *Triatoma infestans* no Brasil, em algumas áreas endêmicas a transmissão vetorial da doença de Chagas ainda permanece em outros países da América Latina, e através de outras espécies mesmo no Brasil (DIAS *et al.*, 1997).

A maior parte dos casos de infecção em seres humanos, ou em outros vertebrados, é produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos da ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e sub-família *Triatominae*, infectados pela forma tripomastigota do *T. cruzi* (CHAGAS, 1909). Os vetores se infectam quando formas tripomastigotas sangüíneas são ingeridas durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Uma vez no intestino posterior do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas, que se multiplicam por divisão binária e, posteriormente, passam por alterações morfológicas e fisiológicas, transformando-se em tripomastigotas metacíclicos no reto do inseto, tornando-se aptas a penetrar em células do hospedeiro mamífero. Após o repasto, estas formas são eliminadas juntamente com as fezes do vetor, penetrando na pele lesada pela picada ou em mucosas íntegras, infectando tanto células fagocitárias quanto não fagocitárias. No interior das células do hospedeiro, as formas tripomastigotas se transformam em formas amastigotas, que conseguem escapar do vacúolo parasitóforo para o citoplasma das células hospedeiras, onde se inicia um processo de divisão binária. Após a multiplicação, as formas amastigotas transformam-se em formas tripomastigotas que rompem as células, agora na circulação sangüínea, conseguindo infectar novas células ou sendo ingeridas por outro inseto vetor, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (BRENER, 1973; GARCIA *et al.*, 1991; DIAS, 2000).

Outros métodos de transmissão da infecção pelo parasito também são observados, como a via transfusional, congênita, por transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais. A via transfusional é considerada a segunda via mais freqüente de infecção, tendo especial importância epidemiológica, uma vez que pode levar a doença a áreas sem transmissão natural (WENDEL, 1997; SCHOFIELD & DIAS, 1999; VINHAES & DIAS, 2000).

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda e uma crônica. A fase aguda pode ser aparente (casos clássicos, principalmente detectados entre crianças de baixa idade) ou inaparente (casos que ocorrem em todas as idades) freqüentemente apresentando somente um quadro febril passageiro e inespecífico. Nesta fase, que dura cerca de um a dois meses, há uma parasitemia considerável, provavelmente devido à intensa multiplicação do parasito, facilmente detectável por exames de sangue a fresco (CERISOLA, 1977). A queda da parasitemia e da intensidade do processo inflamatório ocorrem em função da resposta imune efetora do hospedeiro, dando início à fase crônica. Nessa fase, os tripomastigotas sanguíneos são detectados apenas por métodos parasitológicos indiretos como xenodiagnóstico, hemocultura e/ou PCR (MINTER-GOLEDBLOE *et al.*, 1978; CEDILLOS *et al.*, 1982; BRONFEN *et al.*, 1989; CHIARI *et al.*, 1999; ÁVILA *et al.*, 1993; DEGRAVE *et al.*, 1994; JONES, 1993).

Do ponto de vista clínico, os pacientes na fase crônica da infecção podem ser classificados como pertencentes à forma: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardio-digestiva (CDG) (MENEGHELLI, 2004, DUTRA *et al.*, 2005). A forma clínica indeterminada é observada na maioria dos pacientes (50-60%) que podem permanecer assintomáticos por períodos longos e variáveis de tempo. Esses pacientes não apresentam nenhum sintoma ou sinal clínico da infecção, com todos os exames clínicos, radiográficos e eletrocardiográficos normais. Entretanto, a infecção pode ser evidenciada por testes sorológicos e parasitológicos positivos para *T. cruzi* (DIAS, 1989). Após 20 a 30 anos, aproximadamente, 30 a 40% dos indivíduos infectados podem apresentar alterações eletrocardiográficas decorrentes da infecção chagásica, levando ao surgimento de arritmias e insuficiência cardíaca (BRENER, 1987, MORRIS *et al.*, 1990, ROCHA *et al.*, 2003). Anualmente, cerca de 2% dos indivíduos infectados evoluem para as formas mais graves (MORRIS *et al.*, 1990, ROCHA *et al.*, 2003).

A miocardite chagásica crônica caracteriza-se por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras cardíacas no foco inflamatório e comprometimento dos plexos nervosos, levando ao aparecimento de fibrose no tecido cardíaco (ANDRADE, 1981; 2000). As manifestações digestivas são representadas pelos “megas”, onde aparecem alterações funcionais importantes. Os “megas” são dilatações permanentes e difusas de vísceras ocas ou de canais, acompanhados ou não de alongamentos da parede ocorrendo no esôfago e cólon. Os sintomas principais são disfagia, odinofagia, dor retroesternal, regurgitação, pirose, soluço, tosse, sialose (NEVES *et al.*, 1995). Inquéritos realizados em áreas endêmicas mostram que a prevalência da forma clínica digestiva varia em torno de 6-9% em indivíduos acometidos pela doença de Chagas (DIAS, 1989).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. A análise de particularidades na patologia das diferentes formas clínicas sugere que fatores múltiplos possam estar envolvidos no seu estabelecimento.

A escassez de parasitos contraposta à intensidade e extensão das lesões, assim como o prolongado período de latência que precede essas lesões têm levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores auto-imunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns autores apontam para a existência de reação cruzada nos tecidos do hospedeiro a antígenos do *T. cruzi* (COSSIO *et al.*, 1974; WOOD *et al.*, 1982; ACOSTA & SANTOS-BUCH, 1985; KIERSZENBAUM, 1986, 1999; VAN VOORHIS & EISEN, 1989; LEVITUS *et al.*, 1991; CUNHA-NETO *et al.*, 1995, 1996; 2000; AL-SABBAGH *et al.*, 1998; LEON & ENGMAN, 2001). Porém, estudos utilizando-se amplificação de DNA do *T. cruzi* em lesões inflamatórias do tecido cardíaco de pacientes chagásicos demonstraram a presença do parasito ou fragmentos de seu genoma nas lesões (JONES *et al.*, 1993, OLIVARES-VRAY *et al.*, 1995; PALOMINO *et al.*, 2000), sugerindo que a presença do parasito é importante para a patogênese da doença. ZHANG & TARLETON (1999) demonstraram haver uma correlação entre a persistência do parasito e a lesão tecidual no músculo. A eliminação do parasito dos tecidos, presumivelmente mediada pela atividade imunológica, correlaciona-se a uma baixa resposta inflamatória e resolução da doença. Estes autores sugerem que a persistência do parasito seja causa primária na patologia desenvolvida por alguns indivíduos portadores da doença de Chagas.

Entretanto, outros fatores induzidos pela resposta imune contra os parasitos, têm importância na patogênese da miocardite chagásica, como, por exemplo, alterações dos mecanismos de imunorregulação. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes (VAGO *et al.*, 1996; HIGUCHI *et al.*, 1997, AÑEZ *et al.*, 1999, PALOMINO *et al.*, 2000; TARLETON, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2007).

É importante salientar que nenhum dos mecanismos listados acima (auto-imunidade ou resposta imune contra o parasito) é mutuamente exclusivo. Dentre os fatores que têm importância na patogênese da miocardite chagásica, está a própria resposta imune, quer seja humoral ou celular, bem como alterações nos mecanismos de regulação desta resposta. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes. Acredita-se que as manifestações patológicas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas, sejam consequência de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado, como a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo bem como a faixa etária, o sexo e, especialmente, características imunológicas (DIAS, 2000).

Na doença de Chagas humana, a avaliação das populações celulares *in situ* envolvidas na infecção tem sido realizada através de estudos tanto *ex vivo*, quanto na lesão tecidual cardíaca ou digestiva. A análise *ex vivo* de células presentes no sangue periférico de pacientes na fase crônica demonstraram um grande número de células T e B ativadas circulantes (DUTRA *et al.*, 1994). Um alto percentual das células B CD5<sup>+</sup> está presente na circulação destes pacientes, sugerindo uma relação entre estes fenótipos celulares e a autoimunidade na doença de Chagas (DUTRA *et al.*, 1994). Vale salientar que esta população de linfócitos é capaz de produzir antianticorpos e tem sido relacionada a alguns processos autoimunes no homem (HARDY & HAYAKAWAM, 1986, HARDY *et al.*, 1994). Em modelo experimental, MINOPRIO *et al* (2001) já haviam sugerido a relação entre esta população celular e patologia da doença de Chagas. Após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi* ou anticorpos anti-epimastigotas (anticorpo anti-idiotípico - Id), observa-se uma proliferação diferenciada de populações celulares aos antígenos. Dessa

maneira, a estimulação com antígenos do *T. cruzi* leva a uma expansão preferencial de células T ativadas enquanto anticorpos idiotípicos estimulam preferencialmente células B CD5<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. O fato de antígenos do parasito e anticorpos anti-parasito estarem presentes no hospedeiro durante a fase crônica da infecção, sugere o envolvimento destas populações celulares em mecanismos distintos e provavelmente no desenvolvimento na patologia chagásica (DUTRA *et al.*, 2000). Em avaliação histopatológica de cortes de tecido de cólon de pacientes infectados pelo *T. cruzi*, portadores de megacólon, observa-se um alto percentual de células T (CD3<sup>+</sup>) e B (CD20<sup>+</sup>) (CORBETT *et al.*, 2001, DA SILVEIRA *et al.*, 2008). Além disso, as células NK e citotóxicas estão presentes em tecidos de pacientes com miocardiopatia chagásica, megaesôfago e megacólon, o que confirma a participação da resposta imune na perda neuronal que ocorre nesses pacientes, sendo um mecanismo comum do dano tecidual na patologia por *T. cruzi* (D'ÁVILA-REIS *et al.*, 1993; 2001, DA SILVEIRA *et al.*, 2008). Porém as células T é a principal população encontrada no foco inflamatório nesses tecidos, enquanto as células T CD8<sup>+</sup> são as mais encontradas em biópsias de tecido cardíaco de pacientes portadores da forma cardíaca da doença de Chagas (HIGUCHI *et al.*, 1993; 1997; 2003; 2007, D'ÁVILA-REIS *et al.*, 1993). As células T CD4<sup>+</sup> estão presentes em número bem menor quando comparadas às células T CD8<sup>+</sup>. O número de células T CD8<sup>+</sup> aumenta na presença rara ou abundante de antígenos do *T. cruzi*, enquanto o número de células T CD4<sup>+</sup> continua inalterado (HIGUCHI *et al.*, 1997; 2003). Esses achados reforçam a hipótese de que a presença de antígenos do parasito possui um importante papel no desenvolvimento da miocardite chagásica, e que há um certo grau de imunossupressão nesta fase da doença (HIGUCHI *et al.*, 2003).

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e, seguramente, estão envolvidas tanto na resistência a infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas. Vários estudos têm demonstrado a associação entre IFN- $\gamma$  e a resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *T. cruzi*, uma vez que esta citocina desempenha papel central em induzir a ativação dos macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO) e a inibição intracelular dos parasitos (REED, 1988; McCABE *et al.*, 1988, 1991; NABORS & TARLETON, 1991; TORRICO *et al.*, 1991; MUÑOZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1995;



CARDILLO *et al.*,1996; HOLSCHER *et al.*,1998; TALVANI *et al.*,2000; GARCIA *at al.*,2000; SOARES *et al.*,2001; MULLER *at al.*,2001). Por outro lado, a IL-10 é capaz de inibir a ativação de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células Th1 (REED *et al.*, 1994; ABRAHANSON & COFFMAN, 1996; SILVA *et al.*, 1992; ABBAS *et al.*, 2000). A miocardiopatia chagásica crônica tem sido descrita como uma reação inflamatória de hipersensibilidade tardia (DTH) (ANDRADE, 1983). Linhagens de células T CD4<sup>+</sup> obtidas do tecido cardíaco tanto de camundongos quanto de humanos apresentando miocardiopatia chagásica crônica mostram perfil de citocinas do tipo 1 (CUNHA *et al.*, 1996; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2001; ABEL *et al.*,2001). Este perfil é compatível com a doença de Chagas, uma vez que células do tipo 1 são fortes indutoras de resposta de hipersensibilidade retardada. Neste contexto, GOMES (2002) estudando o papel da resposta imune no desenvolvimento da patologia na doença de Chagas humana, observou que pacientes portadores da forma clínica cardíaca secretavam níveis elevados de IFN- $\gamma$  enquanto indivíduos indeterminados secretavam baixos níveis desta citocina, mas por outro lado, secretavam níveis significativamente mais elevados de IL-10. Neste trabalho mostrou-se ainda, que a maioria das células produtoras de IL-10 eram monócitos, enquanto a principal fonte de IFN- $\gamma$  eram linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, sugerindo uma relação entre a produção de IL-10 por monócitos e mecanismos protetores, além de uma associação entre a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e a morbidade da doença de Chagas.

A avaliação do papel imunorregulador das citocinas na doença de Chagas humana é ainda escassa. DUTRA *et al.* (1996a), utilizando RT-PCR, analisaram os níveis de expressão de mRNA para várias citocinas em PBMC de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados (NI). A análise de PBMC antes de estimulação antigênica mostrou que os níveis de expressão de mRNA para IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  encontravam-se aumentados nos pacientes quando comparados aos dos indivíduos NI. A estimulação de PBMCs de pacientes por antígenos parasitários (EPI e TRIPO) mostraram um aumento na expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e baixa para IL-10. O inverso foi observado após estimulação por anticorpos anti-epimastigota. Estes achados sugerem que a presença simultânea de resposta a estímulos antigênicos assim como aquelas mediadas por

anticorpos durante a fase crônica da doença de Chagas poderiam explicar a existência de reatividade inflamatória e anti-inflamatória detectada na maioria dos pacientes.

Em estudo realizado por SAMUDIO *et al.* (1998a) foram demonstrados padrões distintos de expressão de citocinas por PBMC de pacientes portadores da doença de Chagas, que variaram de acordo com a endemicidade da infecção por região estudada e com o acometimento cardíaco. Na maioria dos indivíduos com eletrocardiograma (ECG) alterado e proveniente de áreas de alta endemicidade, o padrão de citocinas do tipo Th2 foi dominante, enquanto em grupo semelhante vindo de zonas de baixa endemicidade observou-se como padrão dominante a resposta imune do tipo Th1. Em indivíduos com ECG normal, aqueles originários de zonas de alta endemicidade, observou-se um padrão do tipo Th0, em oposição ao grupo de áreas de baixa endemicidade, onde foi encontrada uma resposta do tipo 1. Independentemente do perfil eletrocardiográfico e da endemicidade, a maioria dos pacientes apresentava expressão de mRNA para IL-2 diminuída, enquanto a expressão de mRNA para IL-10 encontrava-se consistentemente elevada, levando os autores a acreditar que a forma crônica da doença humana estaria associada a uma produção aumentada de citocinas do tipo Th2 em resposta ao parasito, que poderia, inclusive, estar regulando negativamente a produção de IL-2. Estudando crianças infectadas na fase aguda ou em fase inicial da forma clínica IND da doença de Chagas, SAMUDIO *et al.* (1998b) observaram um padrão do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) predominante no primeiro grupo, enquanto o segundo apresentava um padrão de secreção de citocina do tipo Th0 ou Th1/Th2 (IL-4 e IFN- $\gamma$ ). Segundo os autores, esta indução seletiva de resposta do tipo Th0 com o decorrer da infecção seria importante para o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral que diminuiria a carga parasitária, contribuindo assim para uma menor morbidade na fase crônica tardia.

BAHIA-OLIVEIRA *et al.* (1998) levantaram a possibilidade de um papel duplo para o IFN- $\gamma$  no desenvolvimento da doença de Chagas humana. Trabalhando com PBMCs obtidas de grupos distintos de pacientes - tratados e não tratados durante a fase aguda - os autores relataram níveis significativamente elevados desta citocina em pacientes considerados curados quando comparados a pacientes tratados não curados. Paradoxalmente, no grupo não tratado, composto por pacientes portadores da forma crônica da doença, IFN- $\gamma$  esteve mais elevado em pacientes cardíacos do que pacientes

assintomáticos. Baseados nestes dados, os autores sugerem que esta citocina poderia, portanto, estar envolvida tanto na proteção quanto no desenvolvimento da patogênese chagásica. Estes autores sugeriram ainda que o papel do IFN- $\gamma$  na eliminação do parasito, em conjunto com a quimioterapia específica levaria a cura parasitológica dos pacientes (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000) enquanto nas formas mais graves esta citocina estaria envolvida na indução de resposta inflamatória (GOMES *et al.*, 2003). Interessantemente, camundongos com parasitismo reduzido e inflamação exacerbada demonstraram uma clara dissociação entre o parasitismo e inflamação, sugerindo a existência de um fino balanço entre o controle do parasitismo e a intensificação da inflamação cardíaca e a resposta do tipo Th1 durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (SOARES *et al.*, 2001). ABEL *et al.* (2001) mostraram que pacientes cardíacos e assintomáticos secretam níveis diferentes de IFN- $\gamma$  ao estímulo induzido pelo *T. cruzi*. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que pacientes apresentando a forma clínica CARD apresentam variações significativas nos níveis de secreção de IFN- $\gamma$  e IL-10 e que estes níveis estão diretamente correlacionados ao desenvolvimento das formas mais graves da doença de Chagas. Mostrou-se ainda, que pacientes CARD e IND secretam níveis distintos de IFN- $\gamma$  ao estímulo induzido pelo *T. cruzi*, sugerindo que um perfil do Tipo 1 possa ter papel no desenvolvimento da cardiopatia. Em 2003, observamos que a razão entre as citocinas IFN- $\gamma$ /IL-10 aumenta nos pacientes CARD quando comparados aos IND, entretanto a razão IFN- $\gamma$ /IL-10 nos pacientes IND era maior que nos CARD (GOMES *et al.*). Interessantemente, quando reavaliemos a produção destas mesmas citocinas após dois anos de estudo verificamos que os pacientes IND que evoluíram para a forma clínica CARD apresentavam uma diminuição ou inversão significativa da razão IL-10/IFN- $\gamma$  (GOMES *et al.*, 2005).

As reações inflamatórias, observadas tanto durante a fase aguda quanto crônica da infecção, parecem ter papel importante na patogênese da doença. Nos tecidos afetados, ocorre produção local de vários mediadores imunológicos, causando uma intensa migração dos leucócitos durante a interação entre o parasito e as células do hospedeiro (CHANDRASEKAR *et al.*, 1998). A migração linfocitária consiste no movimento de linfócitos da corrente sanguínea para os tecidos periféricos e a recirculação linfocitária é o movimento contínuo dos linfócitos na corrente sanguínea e nos vasos linfáticos, entre os

linfonodos ou o baço e, se ativados, para sítios inflamatórios periféricos. O tráfico linfocitário entre o sangue e os tecidos é fundamental para o processo de resposta imune (EBERT *et al.*, 2005). A recirculação linfocitária desempenha um papel crítico na resposta imunológica adaptativa. Em primeiro lugar, permite que um número limitado de linfócitos específicos para determinado antígeno tenha maior probabilidade de entrar em contato com mesmo antígeno em outras regiões do corpo. Em segundo lugar, permite que determinados tipos de linfócitos sejam levados à micro-ambientes teciduais onde sejam necessários para a resposta imunológica adaptativa (MACKAY *et al.*, 1991, BUTCHER & PICKER, 1996). Por exemplo, as vias de recirculação de linfócitos inativos diferem das vias dos linfócitos efetores e de memória e essas diferenças são fundamentais para a forma como a resposta imunológica se desenvolve. Em geral, os linfócitos inativos recirculam entre órgãos linfóides periféricos e os linfócitos efetores migram para os tecidos periféricos locais de infecção e inflamação (GOWANS & KNIGHT, 1964, STAMPER & WOODRUFF, 1976, DUTTON *et al.*, 1998).

A migração dos linfócitos para determinados tecidos são mediadas por moléculas de adesão nos linfócitos, células endoteliais e matriz extracelular. A adesão dos linfócitos às células endoteliais que recobrem as vênulas pós-capilares em certos tecidos determina os tecidos em que os linfócitos entrarão. As moléculas de adesão expressas nos linfócitos responsáveis por esse processo são as selectinas, as integrinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas (Ig) (KRAAL *et al.*, 1997, VON ADRIAN & MACKAY, 2000). O único papel do reconhecimento de antígenos na recirculação dos linfócitos deve ser o de aumentar a afinidade das integrinas linfocitárias por seus ligantes, levando à retenção das células que encontram seus antígenos no local anatômico onde ele está presente (SALMI & JALKANEN, 1997). Entretanto, um perfil de intensa migração linfocitária induzido por presença de antígenos de parasitos pode levar a um desenvolvimento da inflamação. HIGUCHI *et al.* (1997), avaliando biópsias e necropsias de tecido cardíaco, observaram que pacientes infectados pelo *T. cruzi*, portadores da forma cardíaca apresentavam maior percentual de células T CD8<sup>+</sup> e de antígenos do parasito, associando a presença de antígenos do parasito e o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica.

As células T inativas migram e recirculam preferencialmente em órgãos linfóides periféricos, onde reconhecem e respondem aos antígenos estranhos. A migração das células

T inativas da circulação para o estroma do linfonodo envolve uma seqüência de interações de várias etapas entre os linfócitos e as células endoteliais nas vênulas especializadas do endotélio (HEV). Essa seqüência, que é semelhante à migração dos leucócitos para os tecidos periféricos, inclui inicialmente interações de baixa afinidade mediadas pelas selectinas, seguidas pelas quimiocinas estimulando a afinidade das células T com as integrinas, que por sua vez medeiam a forte adesão da célula T ao HEV. Os linfócitos inativos expressam em sua superfície um receptor que pertence à família das selectinas, que é chamado de L-selectina (CD62L). As selectinas constituem uma família de moléculas de adesão de leucócitos e de células endoteliais, que reagem com moléculas de açúcar em glicoproteínas específicas com características mucina-semelhantes. Particularmente, a CD62L é uma molécula de adesão, encontrada em linfócitos. Esta molécula se une a CD34 e GlyCAM-1 nas vênulas endoteliais altas, iniciando a migração de linfócitos virgens para o tecido linfóide (SWAIN *et al.*, 1996, KUNKEL *et al.*, 1998, SALMI *et al.*, 1998). Portanto, células circulantes que expressam níveis elevados de CD62L e interagem com essas moléculas de adesão, favorecendo o seu recrutamento para órgãos linfóides secundários (SLO's) (BRADLEY *et al.*, 1994). Células T de murinos que passam pela ativação nos SLO's e deixam de expressar CD62L e expressam LFA-1 demonstram que células a maioria das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em infiltrados inflamatórios não expressam ou expressam pouco CD62L, indicando uma predominância de células ativadas no tecido cardíaco de animais infectados por *T. cruzi* (DOS SANTOS *et al.*, 2001).

Após a interação da molécula de adesão CD62L na célula com o endotélio, há a expressão dos receptores de quimiocinas, que tem sido descrita na modulação dos fenômenos que levam ao acúmulo de populações específicas de leucócitos em processos inflamatórios agudos e crônicos em uma série de doenças, principalmente na transdução de sinais estimulando a migração dos leucócitos. Receptores de quimiocinas compreendem uma vasta família de proteínas que possuem sete domínios transmembrânicos unidos a uma proteína G que apresentam atividade claramente definida em leucócitos, onde teriam importância no desenvolvimento, diferenciação, distribuição anatômica, tráfego e função efetora das células. Dessa forma, a imunidade adaptativa eficiente necessita de encontro de antígenos exógenos e raras células antígeno-específicas em microambientes específicos dentro de SLO's (ITANO & JENKINS, 2003). Os antígenos são, classicamente, levados da

periferia pelas APC's até os órgãos linfóides secundários. As células do ramo adaptativo do sistema imune, particularmente células T virgens, continuam a recircular via sangue total para os SLO's, a não ser que encontrem seus respectivos antígenos (VON ADRIAN & MEMPEL, 2003). O reconhecimento do antígeno por um receptor de células T no complexo MHC em células T, e com apropriada co-estimulação induz profundas mudanças no comportamento da célula T, com significativa iniciação da resposta imune adaptativa.

De acordo com o corrente paradigma, os dois cursos migratórios distintos das células apresentadoras de antígenos (APC's) e células T, com convergência em zonas de SLO's de células T, são determinadas pelo receptor de quimiocina CCR7 (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2006). CCR7 é altamente expresso por células dendríticas maduras, assim como por células T virgens e de memória central (SALLUSTO *et al.*, 1999), onde dois ligantes de quimiocina CCL19 e CCL21 são produzidos constitutivamente em órgãos linfóides e vasos linfáticos. O importante papel de CCR7 no rolamento e posicionamento de células T virgens, células dendríticas nos SLO's e o efeito resultante da resposta imune são ilustrados por uma profunda ruptura na arquitetura celular nos SLO's em camundongos deficientes para o gene de CCR7 KO (CCR7 Knock-out) (SCHNEIDER *et al.*, 2007). Conseqüentemente, esses animais demonstraram ter a sua capacidade reduzida de montar resposta imune primária (FORSTER *et al.*, 1999). No entanto, estudos recentes indicam que CCR7 é indispensável para um impertubado desenvolvimento das células T tímicas e seleção negativa das células T auto-reativas (YIN *et al.*, 2007, KUROBE *et al.*, 2006). Portanto, a avaliação da função de receptores de quimiocinas tem contribuído para um melhor entendimento dos aspectos imunológicos importantes nas doenças infecciosas, doenças inflamatórias e infecções virais (MURPHY *et al.*, 2000). ATO *et al.* (2003), avaliando camundongos infectados por *Leishmania donovani*, demonstraram que aqueles que apresentavam deficiência na expressão de CCR7 desenvolviam perfil de inflamação, contribuindo para o desenvolvimento da leishmaniose visceral.

A expressão dos receptores de quimiocinas em diferentes subpopulações de leucócitos é altamente relevante para avaliação de sua ação na diferenciação ou ativação celular. Células T auxiliares dos tipos Th1 e Th2 expressam receptores distintos de quimiocinas e migram, diferencialmente, em resposta as várias quimiocinas. Alguns estudos têm demonstrado ainda que citocinas como IL-10 e IFN- $\gamma$  podem regular a

expressão de alguns receptores de quimiocinas na superfície de células T e monócitos (BONECCHI *et al.*, 1998; SALLUSTO *et al.*, 1999; GALLI *et al.*, 2000). Alguns receptores de quimiocinas parecem ter um papel duplo na infecção pelo *T. cruzi*. Na doença de Chagas experimental, alguns trabalhos demonstram o importante papel da expressão de CCR5 em linfócitos, auxiliando na redução da replicação do parasito, que está associado a uma significativa redução da migração de células T, indicando que CCR5 é crucial para a migração de linfócitos para o tecido cardíaco de camundongos infectados (MACHADO *et al.*, 2005, HARDISON *et al.*, 2006). Porém GOMES *et al.* (2005) demonstraram que pacientes da forma CARD apresentam maior expressão de CCR5, associando com a morbidade da doença. Outros receptores são descritos na literatura, como CCR2 impedindo o parasitismo tecidual do coração na fase aguda (HARDISON *et al.*, 2006) enquanto a molécula CXCR3 está relacionada ao desenvolvimento da miocardiopatia chagásica e CCR3 relacionada à proteção (GOMES *et al.*, 2005).

O tráfico de linfócitos parece ocorrer em diferentes vias e os respectivos caminhos que uma única célula T utiliza para migração dependem do status de maturação e ativação. As células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> e CD45RA<sup>-</sup>, humanas apresentam diferentes vias recirculatórias dependendo do compartimento do organismo (MACKAY *et al.*, 1991; PICKER *et al.*, 1992). O antígeno comum de leucócito CD45, uma tirosina fosfatase transmembrana, está diretamente envolvido na ativação e adesão de linfócito expresso em diferentes isoformas, através do splicing do mRNA entre os éxons 4, 5 e 6 em humanos, sendo diretamente envolvida na ativação e adesão de linfócitos (PITZALIS *et al.*, 1988; KORETZKY, 1993); WAGNER *et al.*, 1993, Thomas, 1989). CD45 é conhecido por possuir múltiplas isoformas de domínio extracelular Alta expressão (“*high*”) de CD45 inclui os éxons A, B e C, sendo que A se refere a CD45RA; a isoforma de reduzida expressão (“*low*”) que perdem os éxons A, B e C se referem a CD45RO (JANEWAY, 1992, STAHL *et al.*, 1998). Linfócitos expressando a isoforma CD45RA em altos níveis são consideradas principalmente como células não primadas e aquelas que expressão elevada da isoforma CD45RO são consideradas células primadas. Análise de células T CD8<sup>+</sup> em sangue periférico humano por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem tanto a isoforma *high* quanto a *low* demonstra populações de células que são CD45RA<sup>high</sup>, outras que são CD45RO<sup>high</sup>, e células intermediárias que co-

expressam CD45RA e CD45RO (PRINCE *et al.*, 1992, ZOLA *et al.*, 1992). Pela regulação da extensão da fosforilação das moléculas de sinalização na superfície celular, as diferentes isoformas de CD45 parecem regular a resposta das células T a diversos estímulos. As células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> apresentaram melhor resposta proliferativa à estimulação por anti-CD3 comparado a células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> (DE JONG *et al.*, 1991). Linfócitos CD4<sup>+</sup> expressando a isoforma CD45RA em altos níveis são considerados principalmente como células não-primadas (BELL & SPARSHOTT, 1990). Estudos *in vivo* sugerem que o fenótipo CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>high</sup> migram predominantemente para tecidos não-linfóides, como pele ou na superfície epitelial do pulmão (MACKAY *et al.*, 1990, SALTINI *et al.*, 1990). Em contraste, linfócitos não-primados CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> preferencialmente recirculam do sangue para órgãos linfóides secundários, como linfonodos periféricos (MACKAY *et al.*, 1990; 1992). Na doença de Chagas, estudos avaliando essas populações mostram que pacientes portadores da fase crônica apresentam menor percentual de células T virgens quando comparados a indivíduos não infectados (DUTRA *et al.*, 1994, GRISOTTO *et al.*, 2001).

Em humanos, células T CD8<sup>+</sup> têm sido descritas por ter grande capacidade de responder a antígenos já conhecidos, principalmente aqueles que residem junto à população de células T CD45RO<sup>+</sup> (MERKENSCHLAGER & BEVERLY, 1989). Por esse motivo tem sido proposto que células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> constituem o conjunto de células T virgens e que as células T de memória expressam CD45RO, assim como foi proposto para as células T CD4<sup>+</sup> (DUTTON *et al.*, 1998). Entretanto, há evidências que sugerem que para células T CD8<sup>+</sup>, há diferentes características de ativação e secreção de citocinas dentro das populações CD45RA e CD45RO (DE JONG *et al.*, 1991; INOUE *et al.*, 1993). Em PBMC de adultos, há uma subpopulação de células T CD45RA<sup>high</sup> que expressam altos níveis de CD11a (molécula envolvida na adesão célula-célula); o número de células nessa subpopulação cresce com a idade, aumentando a possibilidade dessas células CD45RA<sup>high</sup> serem primadas (OKUMURA *et al.*, 1993). Evidências indiretas de estudos em humanos da alteração de populações de células T *in vivo* sugerem que células T CD45RO<sup>high</sup> podem reverter para CD45RA<sup>high</sup> (MICHIE *et al.*, 1992, FUJII *et al.*, 1992), porém estes estudos não avaliaram células T antígeno-específicas. Na doença de Chagas experimental, MARTIN & TARLETON (2005) avaliando população de células T CD8<sup>+</sup> no baço em



resposta à infecção, demonstraram que camundongos infectados apresentavam maior percentual dessas células de memória. Contudo, essas células não mostravam sinais de ativação recente, somente uma minoria dessa população expressa as moléculas CD25 e CD69. Portanto, camundongos cronicamente infectados apresentavam maior número de células T CD8<sup>+</sup> de memória, porém não ativadas.

Em contraste a células T virgens, a maioria das células efectoras/memória migra para tecidos periféricos (MACKAY *et al.*, 1990). Esta migração medeia uma rápida resposta protetora e é controlada pela expressão de diferentes conjuntos de integrinas e receptores de quimiocinas (BUTCHER & PICKER, 1998, BAGGIOLINI, 1998). Contudo, algumas células T de memória migram para linfonodos para montar uma resposta secundária proliferativa. Nos últimos oito anos tem aumentado o reconhecimento que as células T de memória são heterogêneas, tanto na capacidade de migração quanto em função efetora. Essa heterogeneidade é refletida na corrente definição de células T de memória central (T<sub>CM</sub>) e memória efetora (T<sub>EM</sub>) (SALLUSTO *et al.*, 2004). Como as células T virgens e de memória são identificadas pela expressão das isoformas CD45RA e CD45RO, respectivamente, e sendo a molécula CCR7 essencial para a migração de linfócito para linfonodos, a co-expressão dessas moléculas pode identificar subpopulações de memória das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. As células T<sub>CM</sub> são caracterizadas pelo fenótipo CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> ou CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, e as células T<sub>EM</sub> são CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> ou CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (SALLUSTO *et al.*, 1999). Em modelo experimental, MARTIN & TARLETON (2005) observaram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentaram tanto o perfil T<sub>CM</sub> quanto T<sub>EM</sub>, porém não há distinção de forma clínica dos animais avaliados. Ainda em camundongos infectados por *T. cruzi*, BUSTAMANTE et al. (2008) mostraram que após tratamento, esses animais apresentavam conversão das células T CD8<sup>+</sup> de T<sub>EM</sub> para T<sub>CM</sub>, gerando uma resposta protetora.

Acreditamos, portanto, que no contexto da linha de estudo que desenvolvemos em nosso laboratório, da análise dos mecanismos de morbidade e controle da resposta imune na doença de Chagas, as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> podem exercer papel importante para o desenvolvimento da patologia ou regulação da evolução.

Apesar do grande número de trabalhos sobre a doença de Chagas, ainda existem controvérsias sobre a participação de fenômenos auto-imunes em sua patogênese, tornando

a infecção pelo *T. cruzi* um interessante modelo de estudo sobre a recirculação das células T. O presente estudo permitiu contribuir com a produção de conhecimentos relevantes sobre o mecanismo de ativação, adesão, migração e regulação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na doença de Chagas.

---

## **OBJETIVOS**

## **1- Objetivo Geral:**

Avaliar o perfil de migração e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produção de citocinas em sangue periférico, após estímulo por antígenos do *T. cruzi* e estabelecer possível relação com o desenvolvimento das formas clínicas da doença.

## **2- Objetivos Específicos:**

- a) Avaliar a expressão da L-selectina CD62L em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas, antes e após estímulo antigênico;
- b) Avaliar a expressão do receptor de quimiocina CCR7 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas, antes e após estímulo antigênico;
- c) Avaliar a expressão das moléculas co-estimulatórias CD45RA e CD45RO em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas antes e após estímulo antigênico;
- d) Avaliar a co-expressão das moléculas co-estimulatórias e de migração CD45RA/CCR7 e CD45RO/CCR7 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas antes e após estímulo antigênico;
- e) Avaliar a expressão de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-10) por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando as moléculas CD45RA e CD45RO, do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas após cultura na ausência e presença de estímulo antigênico.

**POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E  
MÉTODOS**

## 1- População Estudada

A população estudada neste trabalho constou de 23 pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas e 11 indivíduos não-infectados, com a idade variando entre 29-73 anos (TABELA 1). Estes pacientes foram provenientes do Ambulatório de referência em doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

**TABELA 1: Características da população estudada**

<b>Forma Clínica</b>	<b>Sigla</b>	<b>Total de indivíduos</b>	<b>Sexo M/F</b>	<b>Idade</b>
<b>Não Infectados</b>	NI	11	5/6	<b>29-61</b>
<b>Indeterminada</b>	IND	9	6/3	<b>30-68</b>
<b>Cardíaca</b>	CARD	14	10/4	<b>29-73</b>
		<b>34</b>	<b>21/13</b>	

Após a avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, foram selecionados pacientes de acordo com os seguintes critérios: diagnóstico sorológico de doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (RIFI, ELISA e HAI); idade compreendida entre 15 e 75 anos; assentimento voluntário de participação na pesquisa.

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1: Constituído por pacientes portadores da forma clínica indeterminada. Os critérios utilizados para definição destes pacientes foram: positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ ou sinais da moléstia; eletrocardiograma convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Grupo 2: Constituído por pacientes portadores da forma clínica cardíaca grau V, caracterizada por cardiomegalia com ou sem sinais de insuficiência cardíaca; presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo

direito e hemibloqueio anterior esquerdo; níveis de tensão arterial dentro de faixa (sistólica < 160 mmHg e diastólica < 90mmHg);

Grupo 3: Constituído por indivíduos não-infectados, definidos por apresentarem no mínimo dois resultados negativos, além de ausência de indícios clínicos e epidemiológicos do diagnóstico de doença de Chagas, ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas, e ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória; conclusão dos exames propostos.

Critérios de exclusão:

Foram excluídos deste estudo os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão definidos, acima, e os que apresentaram:

- \* Hipertensão arterial sistêmica (HAS). Definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade ou; pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a: 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou; 2) quarta bulha ao exame físico, ou; 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao eletrocardiograma (ECG) pelo critério de Romhilt-Estes, ou; 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax;
- \* Evidências clínicas ou laboratoriais de hipo ou hipertireoidismo;
- \* Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e se necessário, prova de tolerância oral à glicose, (NATIONAL DIABETES DATA GROUP, 1979);
- \* Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
- \* Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
- \* Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol (média diária acima de 60 g de etanol);
- \* Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- \* Outras cardiopatias;
- \* Gravidez, definida por critérios laboratoriais;

- \* Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos;
- \* Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menos que 10 g/dL;
- \* Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;
- \* Uso de corticóides e/ou imunossupressores;
- \* Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

Os pacientes avaliados neste estudo foram voluntários e assinaram o Termo de Consentimento. Todas as dúvidas referentes à pesquisa foram esclarecidas, inclusive quanto à doação de sangue. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética:

- COEP do CPqRR- 14/2006
- CEP da Santa Casa de Misericórdia de BH/MG- 068/2007

## **2- Obtenção do antígeno solúvel da forma epimastigota de *T. cruzi* (EPI)**

As formas epimastigotas do parasito foram cultivadas e mantidas em meio LIT. As formas epimastigotas da cepa CL foram lavados três vezes em solução salina (PBS 0,15 M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completou-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos (Potter Elvehjem) a 40.000g 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subseqüentemente, as suspensões foram centrifugadas a 40.000g durante 60 minutos a 4°C contra PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado em PBS por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Após a dosagem de proteínas utilizando o método de Lowry, o material foi mantido em pequenas alíquotas (1 mL) a -70°C até o uso.

## **3- Análise do fenótipo celular dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico**

Os ensaios *ex vivo* de imunofenotipagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico foram realizados seguindo o protocolo descrito a seguir:

Alíquotas de 50 µL das amostras de células sanguíneas coletadas a vácuo em tubos de 5 mL contendo anticoagulante EDTA (Vacutainer- BD, E.U.A) foram transferidos para



tubos de poliestireno 5 mL (Falcon, Becton Dickinson- BD, E.U.A) e incubadas com anticorpos monoclonais de superfície marcados com ficoeritrina (PE), com isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofocianina (APC) e ficoeritrina associado ao cycromo 5 (PE-Cy5). Os anticorpos utilizados neste trabalho estão descritos na TABELA 2 (BD Biosciences, USA). As células e anticorpos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras de células foram lisadas e fixadas em 2 mL de solução de lise comercial (FLS- BD, E.U.A), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada às amostras 1 mL de PBS-W (PBS pH 7.4 contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica) e estas foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C (Centrífuga Beckman Modelo j-6b, E.U.A). O sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram fixadas com 300 µL de solução fixadora- MFF (10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7.2- reagentes SIGMA, E.U.A). Após um período adicional de 15 minutos a 4°C, a análise dos parâmetros fenotípicos foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD, E.U.A).

#### **4- Análise de marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

As células sanguíneas dos pacientes que participaram deste estudo foram coletadas em tubo Vacutainer estéril contendo heparina. Aliquotas de 1 mL de sangue foram adicionadas em tubos de polipropileno de 12 mL (Falcon, E.U.A). É importante salientar que esse procedimento foi realizado em duplicata. As células do sangue periférico foram incubadas na presença de meio de cultura CMBlast (RPMI-1640 suplementado com 1,6% de L-glutamina, 3% de Antibiótico/Antimicótico e 5% de NHS GIBCO, E.U.A) apenas recebendo a denominação de cultura controle, ou na presença de antígenos solúveis da forma epimastigota (EPI) do *T. cruzi*, apresentando concentração final de 25 µg/mL, recebendo a denominação de cultura com estímulo específico (EPI). Os tubos foram previamente incubados durante 18 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C (Forma Scientific, E.U.A). Em seguida, foram adicionados a todos os tubos 20 µL de Brefeldina A (SIGMA, E.U.A), na concentração estoque de 1 mg/mL (concentração final de 10 µg/mL). As amostras foram incubadas por mais quatro horas em estufa nas mesmas condições acima. A

utilização da Brefeldina assegura a retenção da citocina no interior da células, uma vez que essa substância mantém a citocina no complexo de Golgi. Após a incubação, 220 µL de EDTA (SIGMA, E.U.A) a 20 mM, diluída 1/10 (concentração final de 2 mM) foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foram adicionados as amostras de sangue 3 mL de PBS-W e estas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 3 mL. Foram transferidos 200 µL deste sangue para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes, como mostrado na TABELA 2 e em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2 mL de solução de lise comercial (FLS- BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1 mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos a 18°C. O conteúdo foi vertido e 300 µL de solução fixadora- MFF adicionados aos tubos.

Para a detecção de citocinas intracitoplasmáticas, foram acrescentados aos tubos 2,5 mL de PBS-P (PBS, pH 7.4, contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidos da adição de 20 µL de anticorpos anti-citocina marcados com PE, diluídos 1:50 em PBS-P aos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1 mL de PBS-P e em seguida, com 1 mL de PBS-W. No final, foram adicionado 300 µL de solução fixadora- MFF. As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD, E.U.A). Foram analisados 100.000 eventos totais.

**Quadro 1- Relação dos anticorpos usados para caracterização das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>**

Nome	Clone	Concentração	Função
CD4 - FITC	RPA-T4	0,5 µg	Identificação de linfócitos T auxiliares; liga-se a MHC-II.
CD8 - FITC	RPA-T8	0,5 µg	Identificação de linfócitos T citotóxicos; liga-se a MHC-I.
CCR7 - PE	3D12	0,5 µg	Controla a migração de linfócitos para foco inflamatório.
CD45RA - APC	HI100	0,5 µg	Medeia a ativação do TCR e BCR, expresso em células T virgens.
CD45RO -APC	UCHL1	0,5 µg	Medeia a ativação do TCR e BCR, expresso em células T de memória.
CD62L - PE-Cy5	Dreg 56	0,5 µg	Medeia tráfego de linfócitos e rolamento de leucócitos para sítios inflamatórios.
IFN-γ - PE	B-27	0,5 µg	Ativa macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e adquirida.
IL-10 - PE	JES3-9D7	0,5 µg	Inibidor de macrófagos ativados.

## 5- Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo (FACSCalibur- BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com laser de argônio e laser diodo, que permite a avaliação básica de 6 parâmetros: dispersão frontal, referente ao tamanho celular (FSC) e dispersão lateral referente à granulosidade celular (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). FL1, FL2, FL3 e FL4 correspondem respectivamente a sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PE-Cy5 e APC. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram feitas através de um sistema de computador e o software “Cell Quest” (BS, USA), acoplado ao citômetro.

A análise das células T foi feita obedecendo cada um dos objetivos específicos, da seguinte forma:

### a. CD62L

Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 1A). Em seguida, gráficos de FL1 (CD4 ou CD8 FITC) versus FL3 (CD62 PE-Cy5) foram construídos para identificar a segregação da populações CD4 e CD8 em 3 subpopulações cada:  $CD4^+CD62L^-$  (R2),  $CD4^+CD62L^{low}$  (R3)  $CD4^+CD62L^{high}$  (R4), e  $CD8^+CD62L^-$  (R2);  $CD8^+CD62L^{low}$  (R3) e  $CD8^+CD62L^{high}$  (R4) (Figuras 1B e 1C).

A combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 foi feita através da fórmula  $G2=R1 \text{ and } R2$ ,  $G3=R1 \text{ and } R3$  e  $G4=R1 \text{ and } R4$ , onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2.

### b. CCR7

Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 1A). Em seguida, gráficos de FL1 (CD4 ou CD8 FITC) versus FL2 (CCR7 PE) foram construídos para identificar a segregação da populações CD4 e CD8 em 3 subpopulações cada:,  $CD4^+CCR7^-(R2)$ ,

CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>(R3+R4); CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (R2), CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> (R3+R4) (Figuras 1D e 1E).

A combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 foi feita através da fórmula G2=R1 and R2, G3=R1 and R3 e G4=R1 and R4, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2.

### c. CD45RA e CD45RO

Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 1A). Em seguida, gráficos de FL1 (CD4 ou CD8 FITC) versus FL2 (CD45RA e CD45RO APC) foram construídos para identificar a segregação da populações CD4 e CD8 em 3 subpopulações cada: CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (R2), CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>low</sup> (R3) e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> (R4); CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (R2), CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>low</sup> (R3) e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> (R4) (Figuras 1F e 1G); CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> (R2), CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>low</sup> (R3) e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> (R4); CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> (R2), CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>low</sup> (R3) e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> (R4) (Figuras 1H e 1I).

A combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 foi feita através da fórmula G2=R1 and R2, G3=R1 and R3 e G4=R1 and R4, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2.

### d. CD45RA/CCR7 e CD45RO/CCR7

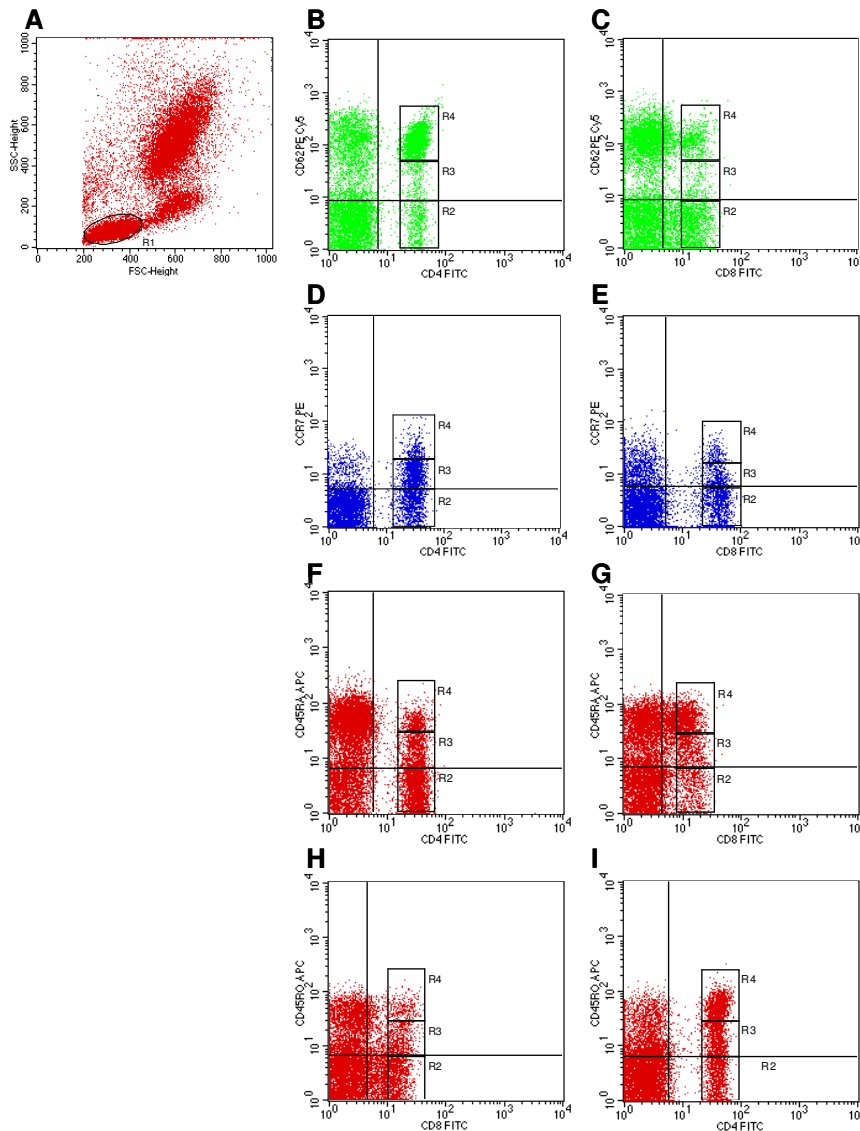
Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 2A). Em seguida, foi construído um gráfico de FL1 (CD4 ou CD8 FITC) versus granulosidade (SSC), onde as populações de CD4 e CD8 foram selecionadas, denominadas de R2 (Figura 2B e C). O próximo passo consistiu na construção de gráficos de FL4 (CD45RA e CD45RO APC) versus FL2 (CCR7 PE), onde foram selecionadas as subpopulações CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> (R3), CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> (R4), CD45RO<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup> (R3) e CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> (R4) (Figura 2D e E).

A combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 foi feita através da fórmula  $G2=R1 \text{ and } R2$ ,  $G3=R1 \text{ and } R2 \text{ and } R3$  e  $G4=R1 \text{ and } R2 \text{ and } R4$ , onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2.

**e. CD45RA/IFN- $\gamma$  e IL-10 e CD45RO/IFN- $\gamma$  e IL-10**

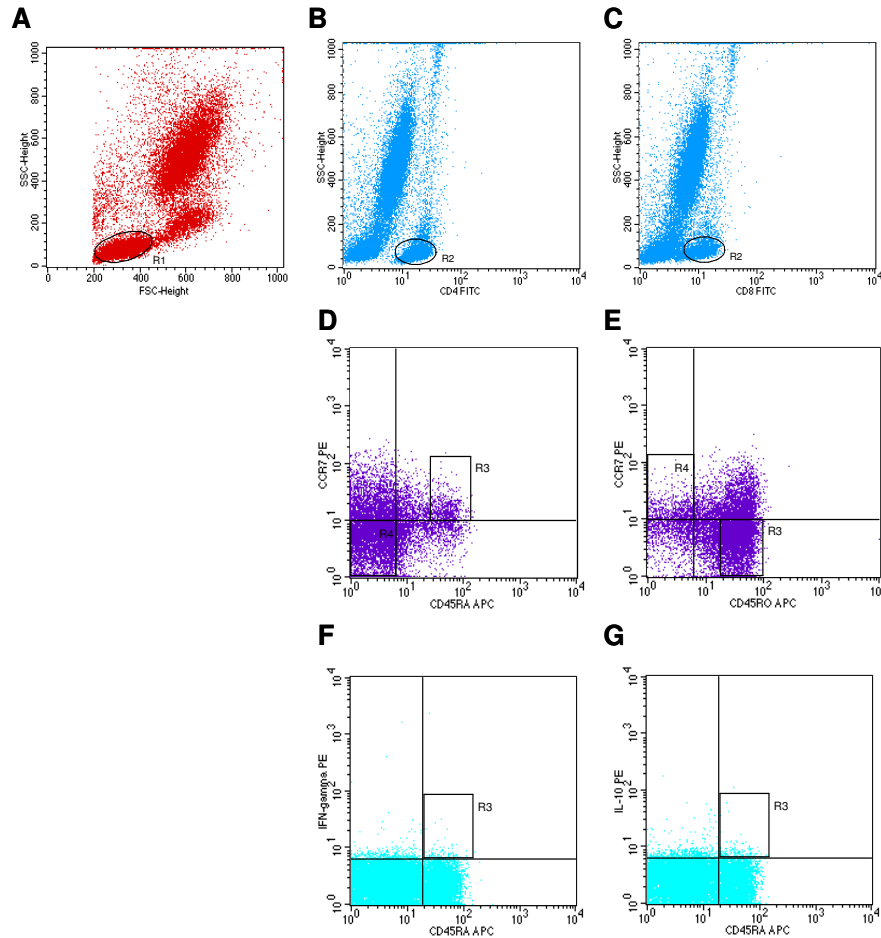
Primeiramente foi selecionada a população de linfócitos totais, denominada R1, baseada em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 2A). Em seguida, foi construído um gráfico de FL1 (CD4 ou CD8 FITC) versus granulosidade (SSC), onde as populações de CD4 e CD8 foram selecionadas, denominadas de R2 (Figura 2B e C). O próximo passo consistiu na construção de gráficos de FL2 (IFN- $\gamma$  e IL-10 PE) versus FL4 (CD45RA e CD45RO APC), onde foram selecionadas as subpopulações CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R3), CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> (R4), CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> (R3) e CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>-</sup> (R4); CD45RO<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R3), CD45RO<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> (R4), CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> (R3) e CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>-</sup> (R4) (Figura 2F e G).

A combinação das regiões R1 e R2, R3, R4 foi feita através da fórmula  $G2=R1 \text{ and } R2$ ,  $G3=R1 \text{ and } R3$  e  $G4=R1 \text{ and } R4$ , onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2.



**Figura 1-** Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo

A **figura 1A** representa o perfil celular obtido no contexto *ex vivo*, característico de gráficos de tamanho versus granulidade. As **figuras 1B e C** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 1 (CD4 e CD8 FITC) versus fluorescência 3 (CD62L PE Cy5). As **figuras 1D e E** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 1 (CD4 e CD8 FITC) versus fluorescência 2 (CCR7 PE). As **figuras 1F e G** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 1 (CD4 e CD8 FITC) versus fluorescência 4 (CD45RA APC). As **figuras 1H e I** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 1 (CD4 e CD8 FITC) versus fluorescência 4 (CD45RO APC).



**Figura 2-** Análise de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico por citometria de fluxo

A **figura 2A** representa o perfil celular obtido no contexto *ex vivo*, característico de gráficos de tamanho versus granulosidade. As **figuras 2B e C** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 1 (CD4 e CD8 FITC) versus granulosidade. As **figuras 2D e E** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 4 (CD45RA e CD45RO APC) versus fluorescência 2 (CCR7 PE). As **figuras 2F e G** representam um perfil celular obtido em gráfico de fluorescência 4 (CD45RA e CD45RO APC) versus fluorescência 2 (IFN- $\gamma$  e IL-10).



## **6- Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Dunns, com o objetivo de detectar diferenças entre as medianas dos grupos estudados. O nível de significância definido foi de  $p < 0,05$  e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA).

## **RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados em cinco partes a partir dos dados obtidos na avaliação do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas assim como de indivíduos não-infectados (NI). Os estudos foram feitos tanto no contexto *ex vivo* como após cultura de células *in vitro* com ou sem estimulação por antígenos derivados do *T. cruzi* (EPI). A primeira parte se refere à avaliação da ativação celular analisando-se a expressão da molécula de superfície CD62L por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, tanto *ex vivo*, quanto após estimulação *in vitro*. Na segunda parte dos resultados foram avaliados o percentual de expressão do receptor de quimiocina CCR7, responsável pela migração dos linfócitos para a zona dos linfonodos, nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8. A terceira parte dos resultados compreende a análise do percentual de expressão das moléculas CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, com o objetivo de caracterizarmos o perfil de células virgens e de memória nos grupos NI, IND e CARD. Na seção de resultados mostramos os dados referentes ao percentual de células duplo marcadas para CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CCR7<sup>-</sup> por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Esta análise permite distinguir as células que estão migrando para os linfonodos e aquelas que estão migrando para o foco inflamatório. Na quinta e última parte, mostramos a análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam concomitantemente CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> com o objetivo de avaliarmos o padrão de citocinas produzidas por essas células.

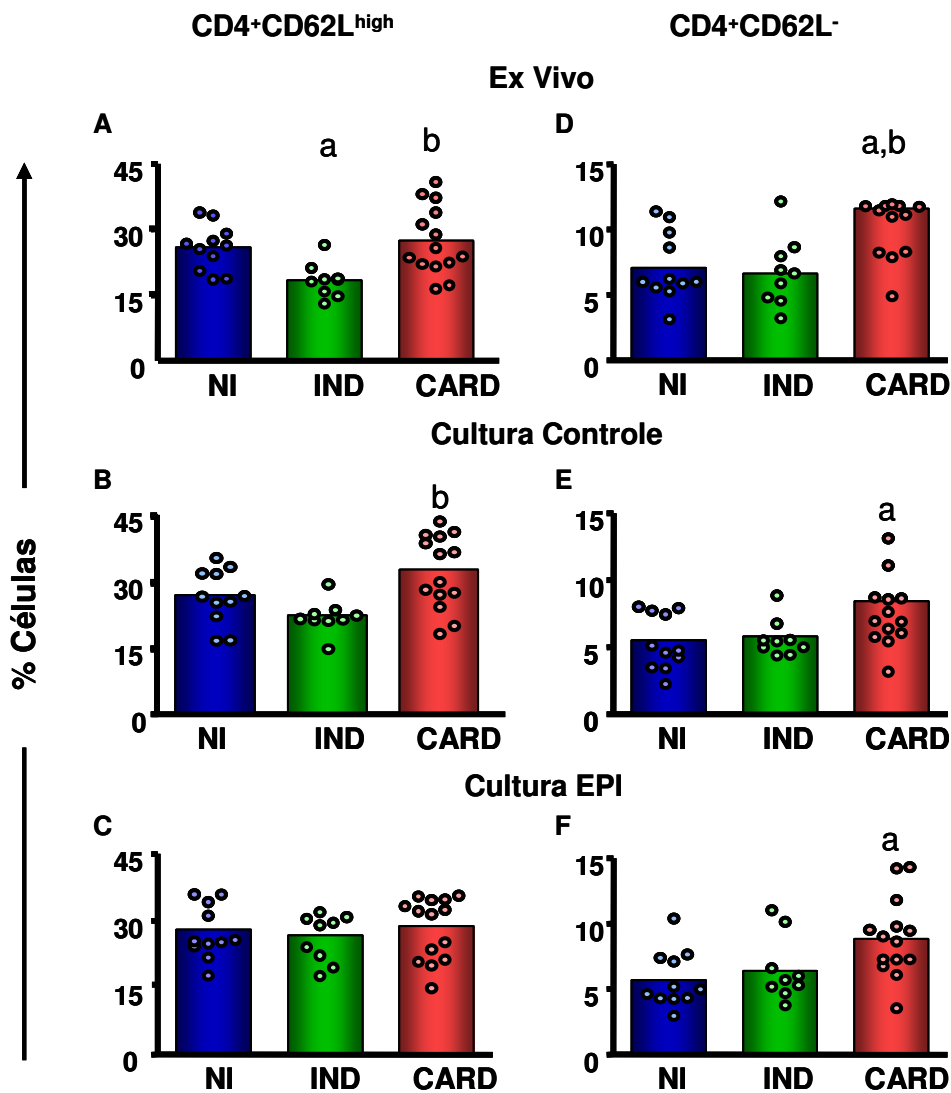
### **1- Expressão da molécula de adesão CD62L por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico**

O receptor de rolamento CD62L é responsável pela adesão do leucócito ao endotélio e está associada ao deslocamento dos linfócitos T virgens para os linfonodos periféricos. A molécula de superfície CD62L foi avaliada em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos grupos NI, IND e CARD. Os resultados apresentados no Gráfico 1 mostram a avaliação da expressão da molécula CD62L em linfócitos T em sangue total, antes e após cultura com antígenos de epimastigota (EPI). A análise dos dados no contexto *ex vivo* revelou uma expressão significativamente menor ( $p < 0,01$ ) do percentual de células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> em pacientes portadores da forma clínica IND em relação aos pacientes CARD e indivíduos

não-infectados ( $p < 0,05$ ) (GRAF-1A). O percentual de células T  $CD4^+CD62L^-$  (GRAF-1D) é bastante semelhante nos indivíduos não infectados e nos pacientes IND, apresentando valores bem mais baixos do que os obtidos pelas células T  $CD4^+CD62L^{high}$ . Também foi observado um aumento significativo de células T  $CD4^+CD62L^-$  ( $p < 0,05$ ) no grupo CARD em relação aos indivíduos não infectados e ( $p < 0,01$ ) e ao grupo IND (GRAF-1D).

Quando avaliamos a expressão de CD62L em cultura células de pacientes IND e CARD e indivíduos não infectados sem estímulo antigênico, observa-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) nos pacientes CARD em relação aos pacientes IND (GRAF-1B). O grupo de pacientes CARD apresentou percentual significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que indivíduos NI (GRAF-1E).

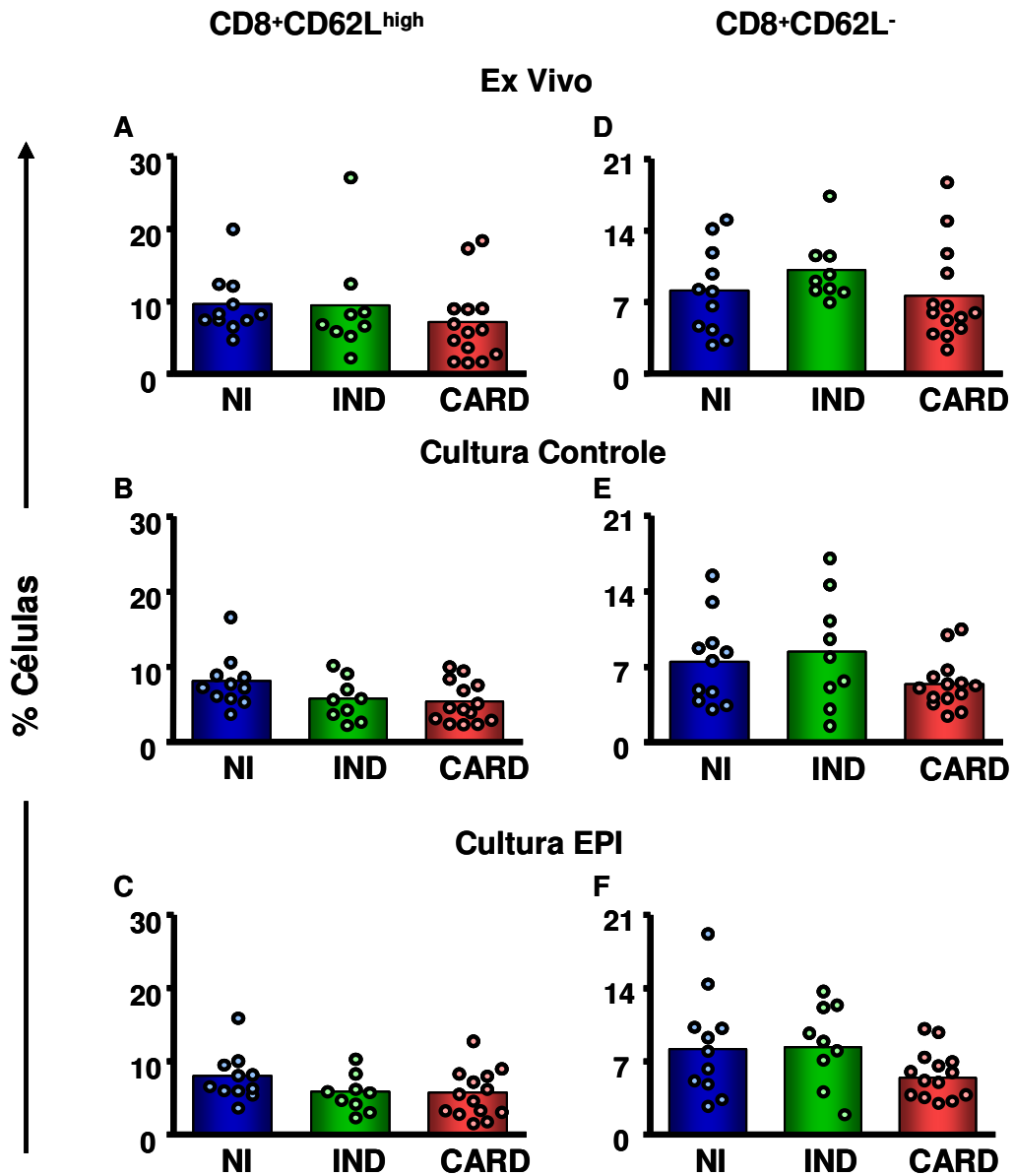
A avaliação na presença de antígenos de EPI não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa no percentual da expressão de células T  $CD4^+CD62L^{high}$  (GRAF-1C). Entretanto observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no percentual de células T  $CD4^+CD62L^-$  no grupo CARD quando comparado ao grupo de indivíduos não infectados (GRAF-1F).



**GRÁFICO 1-** Avaliação do percentual de células T  $CD4^+CD62L^{high}$  e  $CD4^+CD62L^-$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Quando avaliado o percentual de células T  $CD8^+CD62L^{high}$  e  $CD8^+CD62L^-$  nos contextos *ex vivo*, em cultura na presença ou ausência de antígenos de EPI, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes IND e CARD ou indivíduos não infectados. Porém observa-se que pacientes CARD apresentaram uma tendência a ter um menor percentual de células T, tanto  $CD8^+CD62L^{high}$  quanto  $CD8^+CD62L^-$ , em relação aos outros grupos.



**GRÁFICO 2-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados

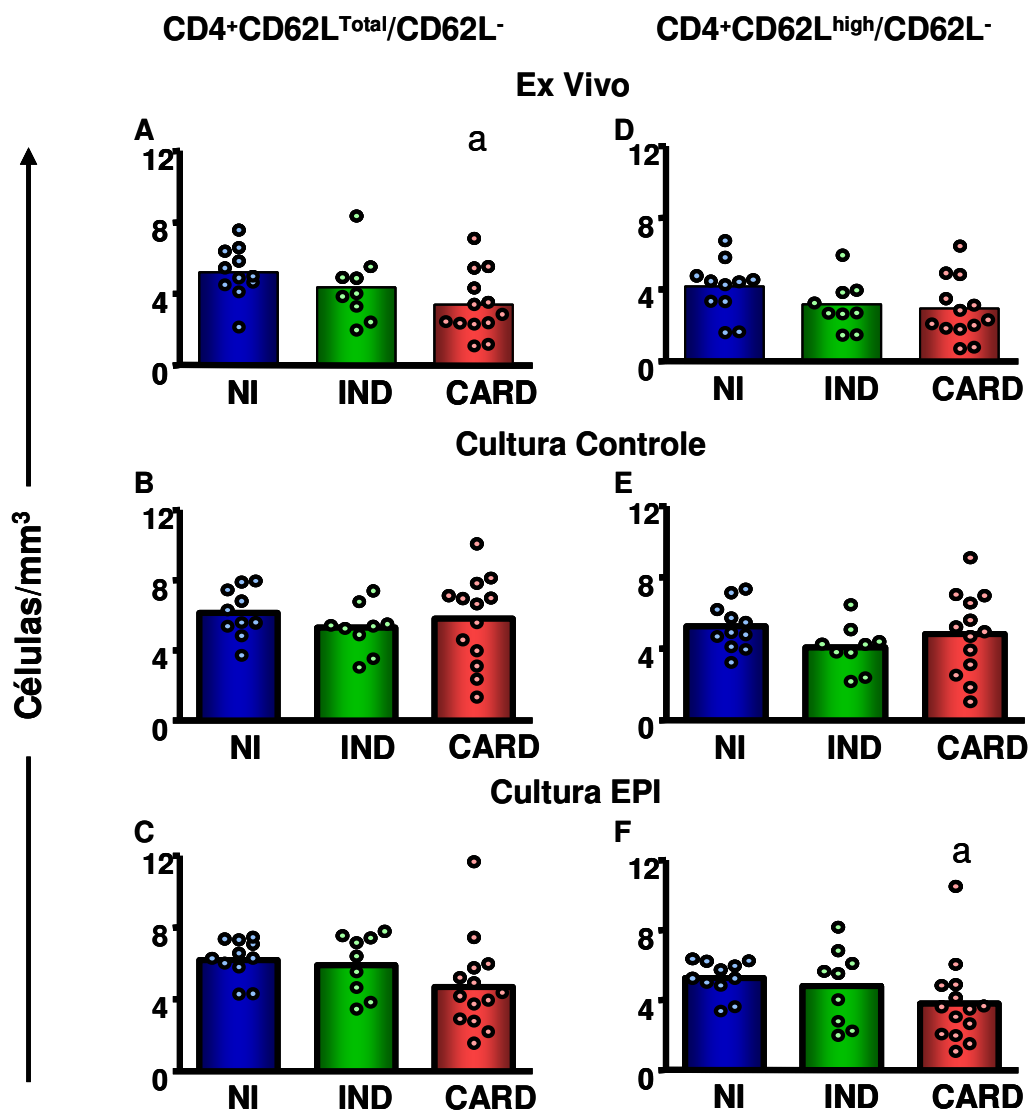
Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Após a avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> focando no perfil de expressão CD62L<sup>high</sup> e CD62L<sup>-</sup> analisamos a razão do valor absoluto de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>. Esta análise é importante para avaliar a proporção de células T virgens/ativadas no sangue periférico desses indivíduos. Pode-se observar uma diminuição significativa *ex vivo* (p<0,05) da razão do número de células T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> no grupo dos pacientes CARD quando comparado ao grupo de indivíduos NI (GRAF-3A). No mesmo contexto, não houve diferença estatisticamente significativa na razão de células CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup> entre os grupos estudados (GRAF-3D).

Quando avaliados os dados de cultura na ausência de estímulo antigênico, não foi observada nenhuma diferença significativa para os dois fenótipos avaliados de células T CD4<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>, quando comparados os grupos CARD, IND e NI (GRAF-3B,E). Porém observa-se uma diminuição significativa (p<0,05) da razão de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup> no grupo CARD quando comparamos ao grupo NI, após cultura na presença de EPI (GRAF-3F). Não foi observada diferença significativa da razão de células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> entre os grupos avaliados (GRAF-3C).

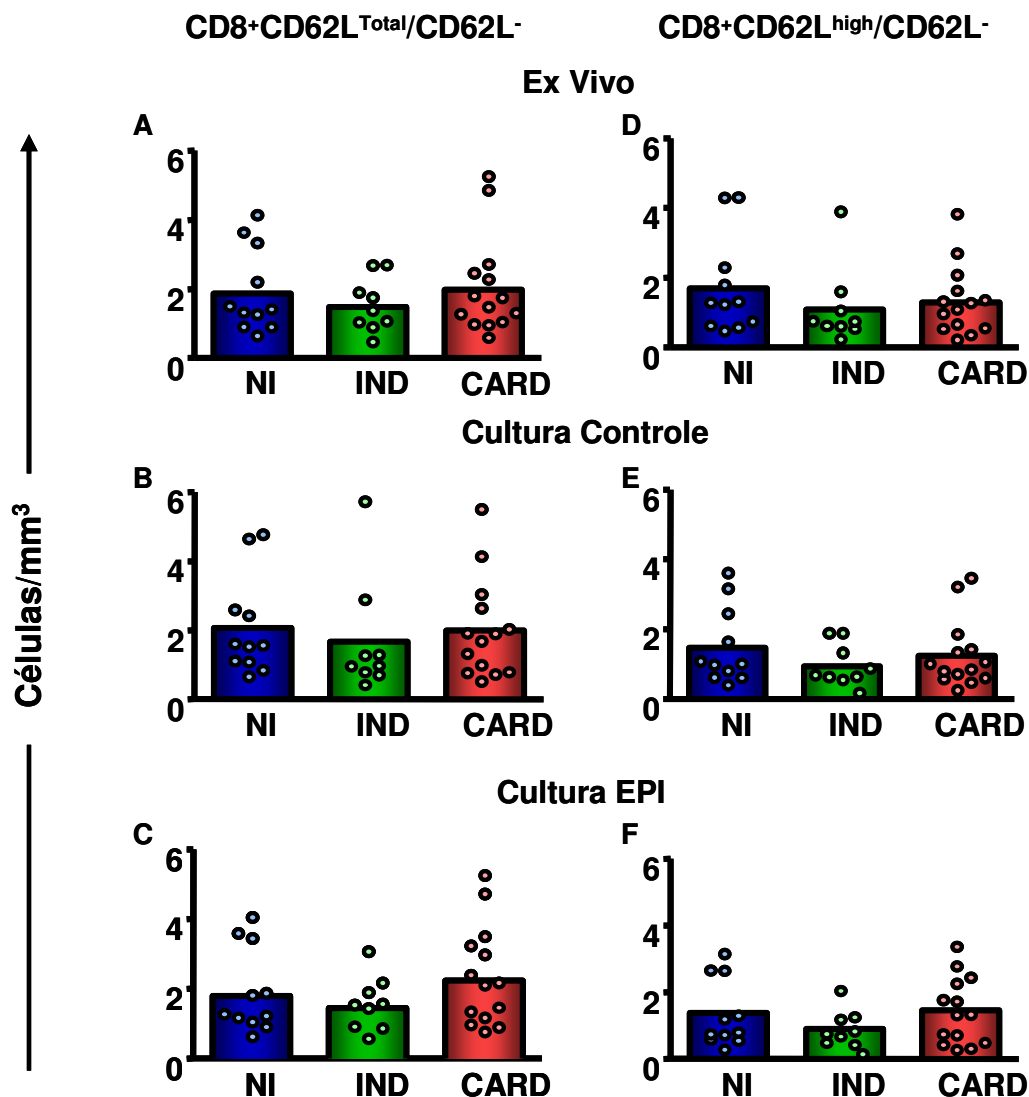
Quando avaliamos a razão das células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos chagásicos IND e CARD e indivíduos não infectados, em nenhum dos contextos *ex vivo* e culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-4). Apesar disso, os grupos de pacientes IND e CARD apresentaram tendência a uma menor razão de células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> quando comparado ao grupo NI, nos contextos *ex vivo* e culturas na presença ou ausência de antígenos de EPI (GRAF-4D,E,F).





**GRÁFICO 3-** Avaliação da razão de células T  $CD4^+CD62L^{Total}/CD62L^-$  e  $CD4^+CD62L^{high}/CD62L^-$  do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 4-** Avaliação da razão de células T  $CD8^+CD62L^{Total}/CD62L^-$  e  $CD8^+CD62L^{high}/CD62L^-$  do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

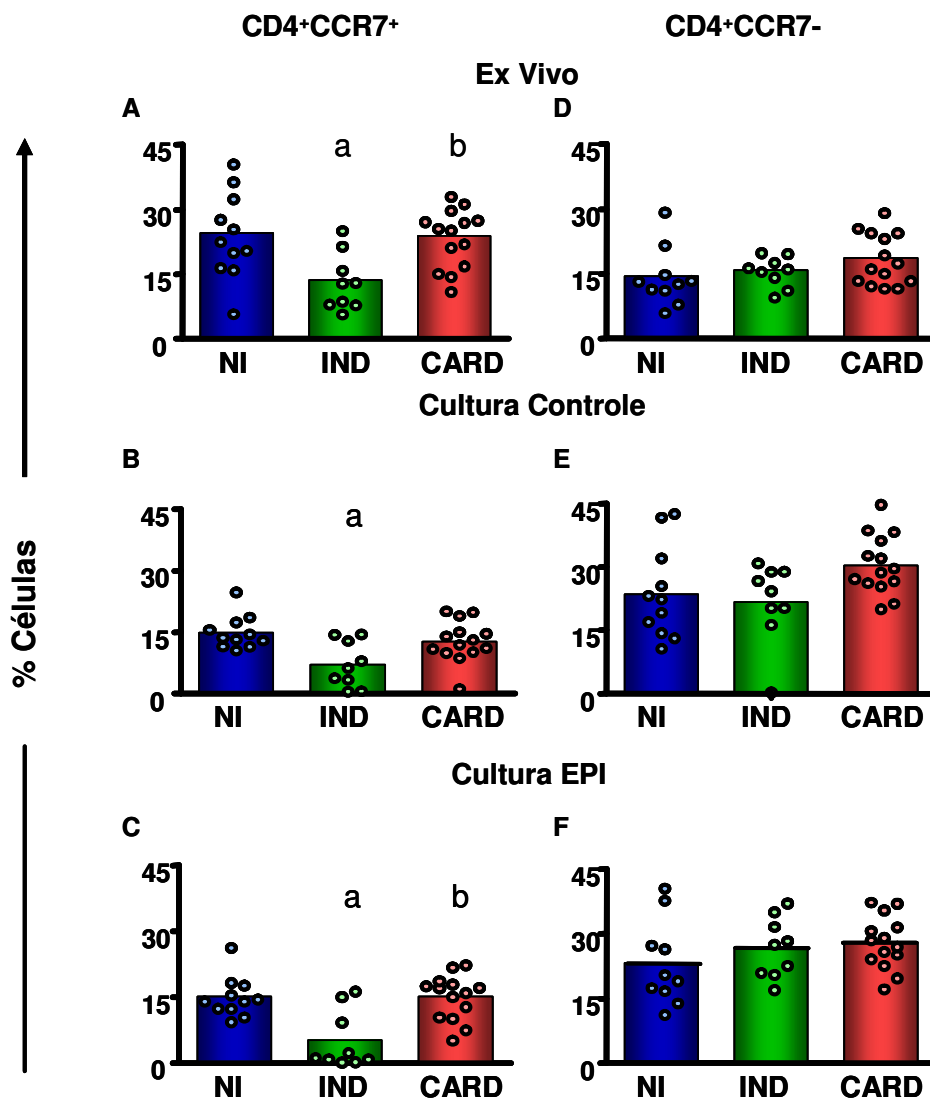
## **2- Expressão do receptor de quimiocina CCR7 por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico**

A molécula de superfície CCR7 é um receptor celular de quimiocina que transduz sinais que estimulam a migração e retenção dos leucócitos para as zonas dos linfonodos. Quando a molécula deixa de expressa (CCR7<sup>-</sup>) ou não é expressa, elas migram para o foco inflamatório, ou recirculam para órgãos linfóides secundários.

A expressão do receptor de quimiocina CCR7 por células T foi avaliada em sangue total de pacientes IND, CARD e indivíduos NI, tanto no contexto *ex vivo* e culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI. A avaliação dos dados demonstra que o grupo IND apresenta diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de células T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> em relação aos grupos CARD e NI nos contextos *ex vivo* e em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-5A,C). A avaliação das células CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> nas culturas controle mostrou que o grupo IND apresenta diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual dessas células em relação ao grupo NI (GRAF-5B).

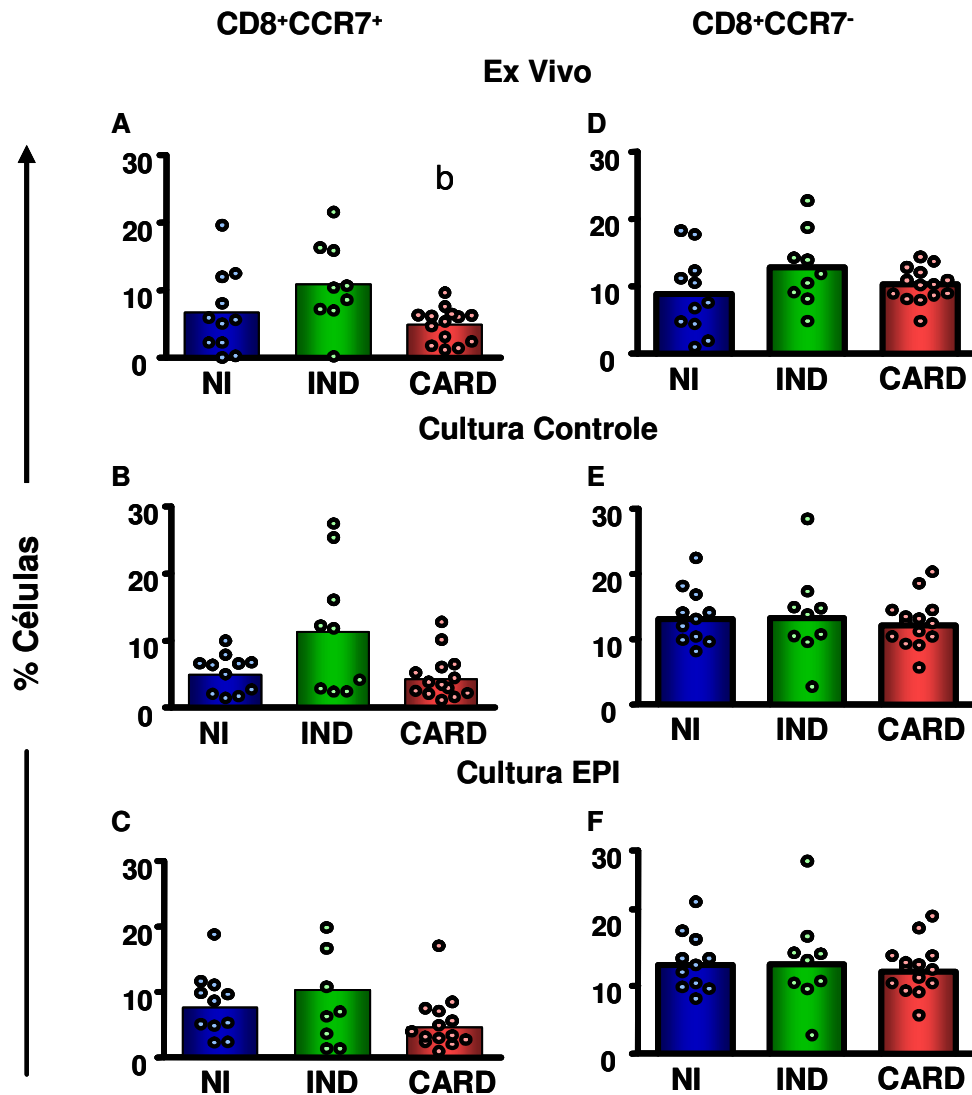
Quando as células CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> foram avaliadas observa-se uma tendência ao aumento do percentual dessas células em sangue total de pacientes CARD tanto *ex vivo* como em cultura (GRAF-5D, E,F) quando comparado aos grupos de pacientes IND e indivíduos NI.

A análise do fenótipo celular CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, mostrou que o grupo CARD apresentou um percentual significativamente menor dessas células ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo IND, no contexto *ex vivo* (GRAF-6A), porém a análise dos dados após cultura não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (GRAF-6B, C) A análise do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, em nenhum dos contextos estudados (GRAF-6D, E, F).



**GRÁFICO 5-** Avaliação do percentual de células T  $CD4^+CCR7^{high}$  e  $CD4^+CCR7^-$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

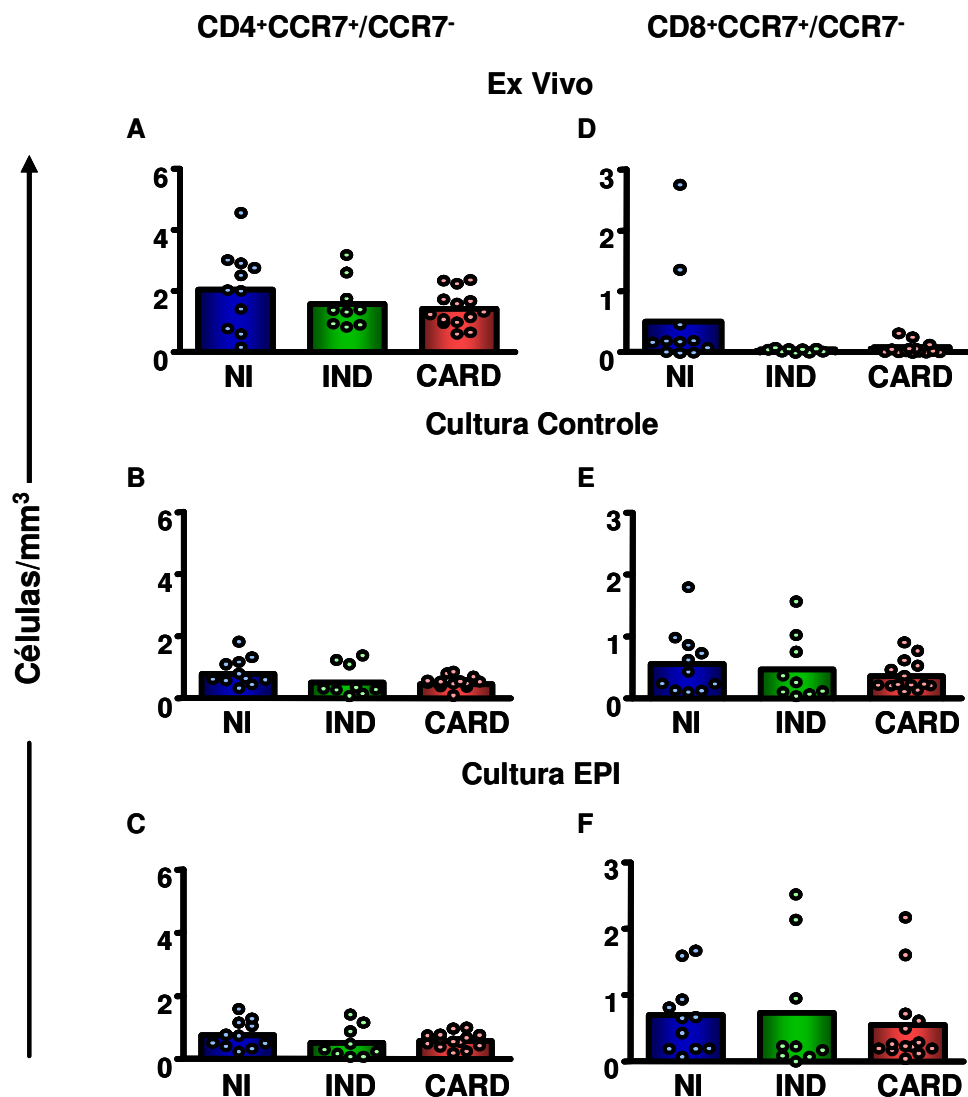


**GRÁFICO 6-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Após a avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o perfil CCR7<sup>+</sup> e CCR7<sup>-</sup>, analisamos a razão do valor absoluto de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o fenótipo celular CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>. Os grupos de pacientes CARD e IND apresentam tendência a uma menor razão do número de células/mm<sup>3</sup> do fenótipo celular CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> quando comparado ao grupo de indivíduos NI, antes e após culturas, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa (GRAF-7A,B, C). Houve uma notável redução das razões dos valores absolutos de células T CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> em todos os grupos estudados após culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-7B, C), sem diferenças significativas.

Quanto às células T CD8<sup>+</sup>, observa-se inclinação a uma menor proporção CCR7<sup>+</sup> por CCR7<sup>-</sup> nos grupos IND e CARD confrontados com o grupo de indivíduos NI, nos parâmetros *ex vivo* e cultura na ausência de antígenos de EPI (GRAF-7D,E), mas diferenças estatisticamente diferentes não foram observadas. Após a cultura na presença de antígenos de EPI, observamos tendência do grupo CARD a uma menor razão das células CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> comparado aos outros dois grupos avaliados, sem diferença significativa (GRAF-7F).



**GRÁFICO 7-** Avaliação da razão de células T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

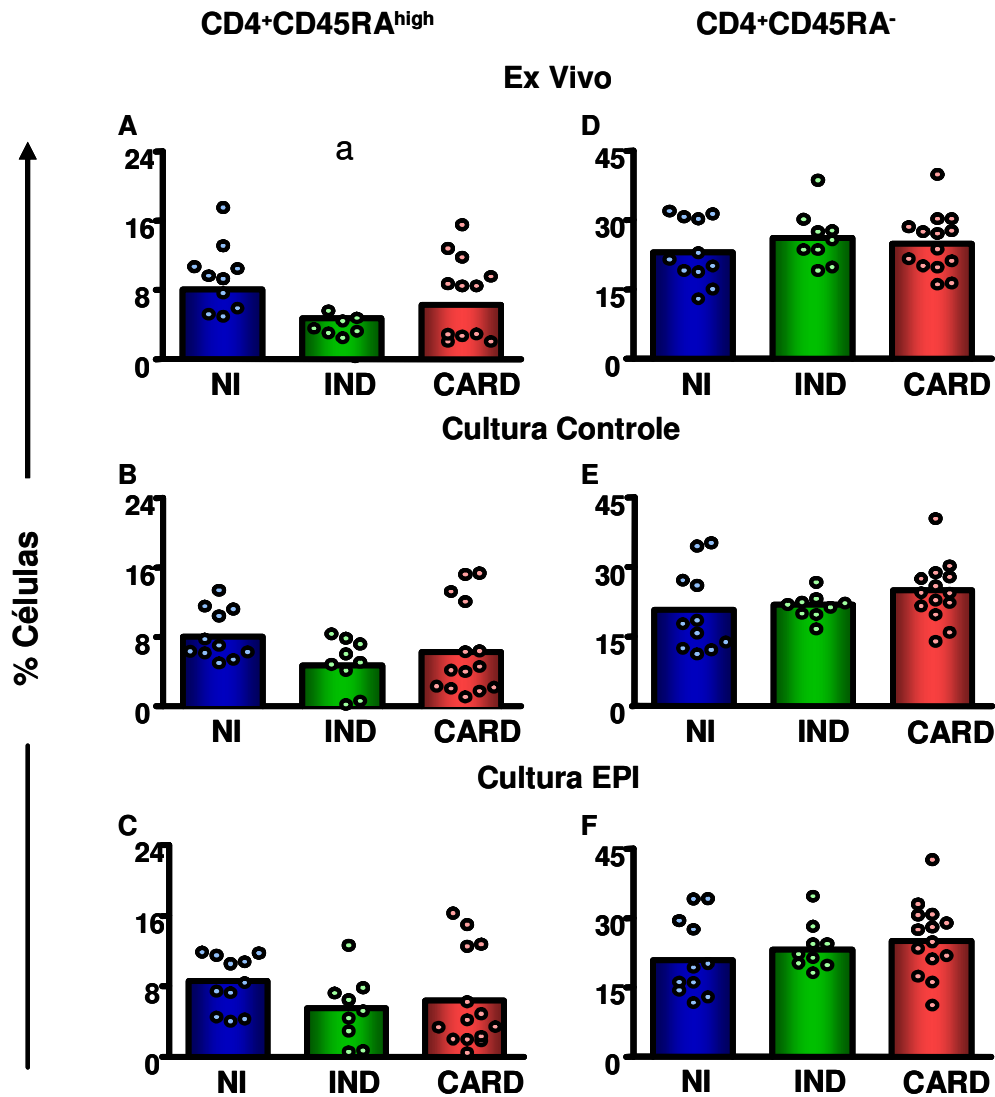
Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

### 3- Expressão das moléculas co-estimulatórias CD45RA e CD45RO por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico

A exposição do sistema imune a um antígeno estranho acentua sua capacidade de responder novamente ao antígeno, a esse fenômeno denominamos de memória imunológica. As células de memória apresentam características que as tornam mais eficientes na eliminação dos antígenos do que os linfócitos virgens, que não foram anteriormente expostos a antígenos. Os resultados mostraram que a expressão de CD45RA<sup>high</sup>, molécula expressa por células T virgens, foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o percentual de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> de pacientes IND quando comparado aos indivíduos NI no contexto *ex vivo* (GRAF-8A). Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados após cultura (GRAF-8B, C). Quando avaliado o fenótipo celular CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, células de memória, os dados não revelaram nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados tanto *ex vivo* quanto em culturas (GRAF-8D, E, F).

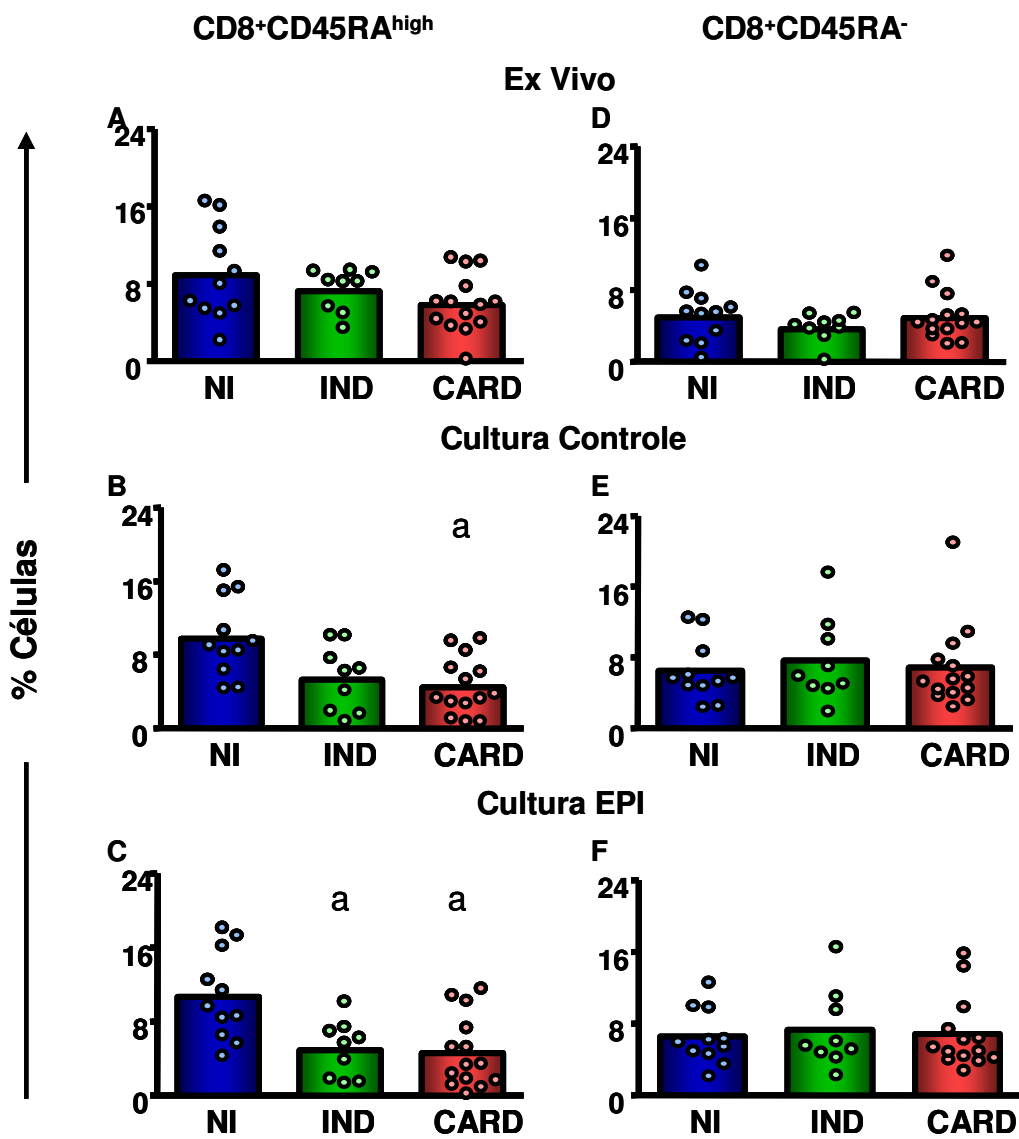
Os fenótipos CD45RA<sup>high</sup> e CD45RA<sup>-</sup> para as células T CD8<sup>+</sup> também foram avaliados. No contexto *ex vivo* não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados. Porém, a avaliação dos resultados obtidos após cultura na presença e na ausência de antígenos de EPI demonstra uma significativa diminuição ( $p < 0,05$ ) do percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> em pacientes CARD confrontado com indivíduos NI (GRAF- 9B). No entanto, pacientes IND ( $p < 0,05$ ) e CARD ( $p < 0,01$ ) apresentaram percentual significativamente menor quando comparados a indivíduos NI, em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-9C). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> entre os grupos avaliados, nos contextos *ex vivo*, cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF- 9E,F,G).





**GRÁFICO 8-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



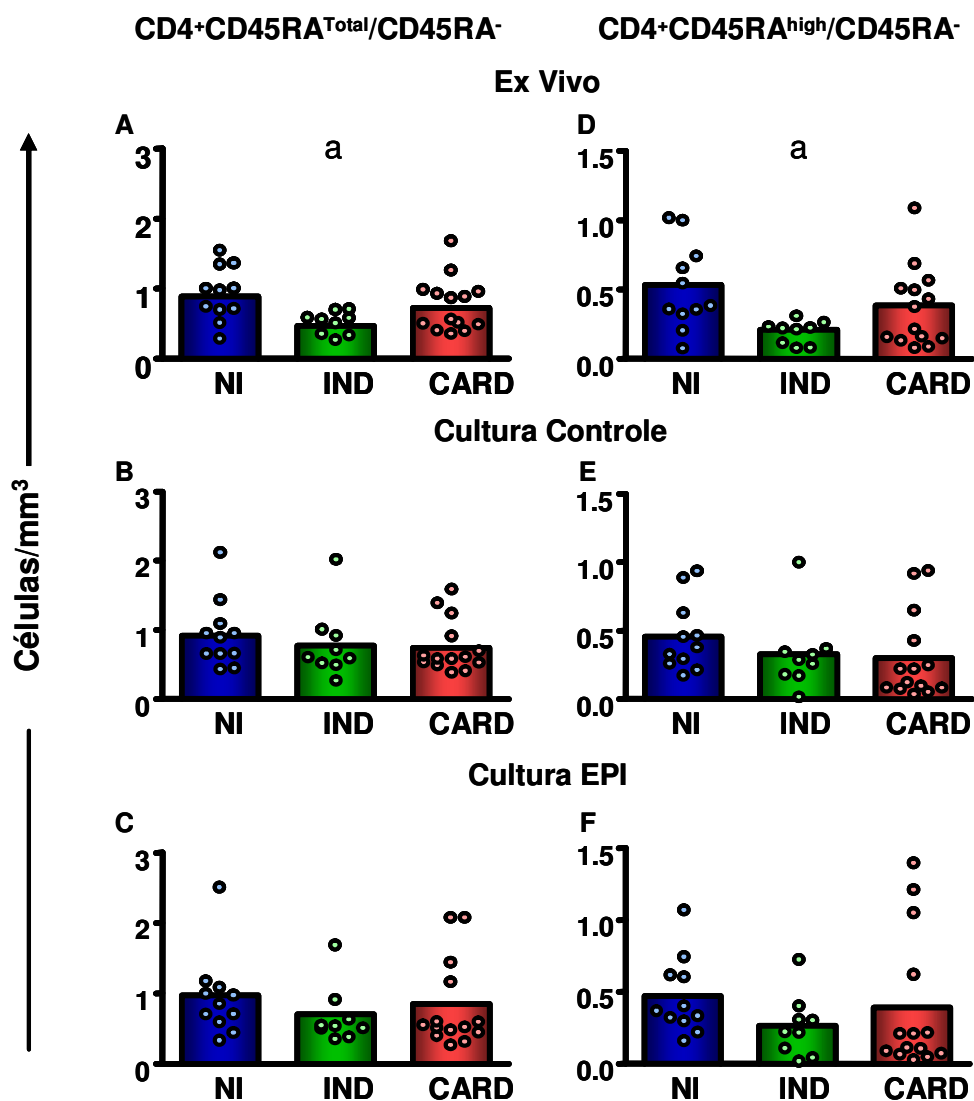
**GRÁFICO 9-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Os Gráficos 10 e 11 mostram os resultados de razão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos celulares CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup>, sendo que a população CD45RA<sup>Total</sup> representa a soma das subpopulações CD45RA<sup>high</sup> e CD45RA<sup>low</sup>, e CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup>. A análise dos dados no contexto *ex vivo* demonstra uma diminuição significativa (p<0,05) do número de células/mm<sup>3</sup> da proporção de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup> dos pacientes IND em relação ao grupo NI (GRAF-10A). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados, nos contextos *ex vivo* e após cultura (GRAF-10B, C).

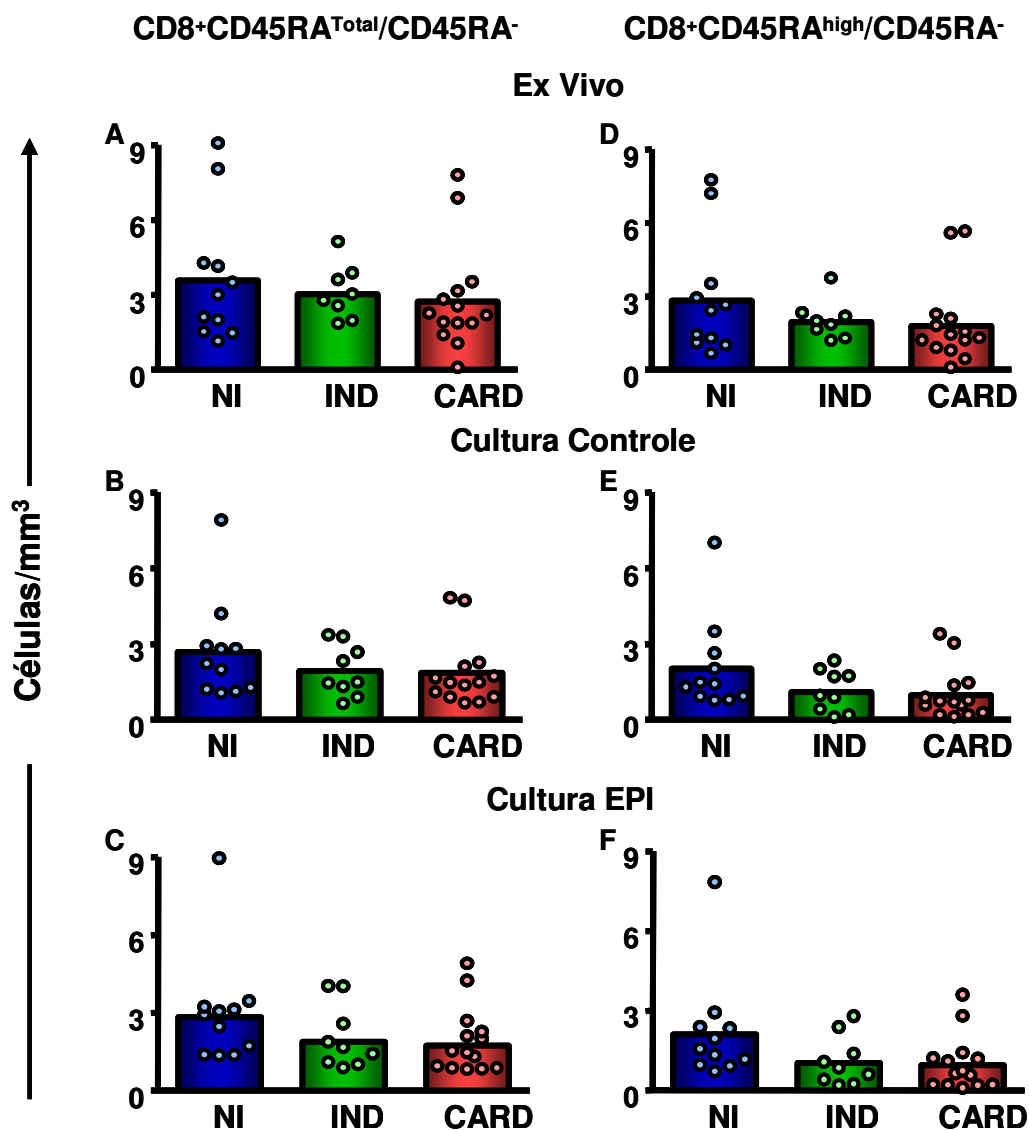
A avaliação dos dados da razão de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup> no contexto *ex vivo* mostra uma significativa diminuição (p<0,05) nos pacientes IND quando comparados aos indivíduos NI (GRAF- 10D). Os dados de razão após não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (GRAF-10E, F).

A análise dos resultados obtidos pela razão das células T CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup> não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de pacientes chagásicos e o grupo de indivíduos NI, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-11).



**GRÁFICO 10-** Avaliação da razão de células T  $CD4^+CD45RA^{Total}/CD45RA^-$  e  $CD4^+CD45RA^{high}/CD45RA^-$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

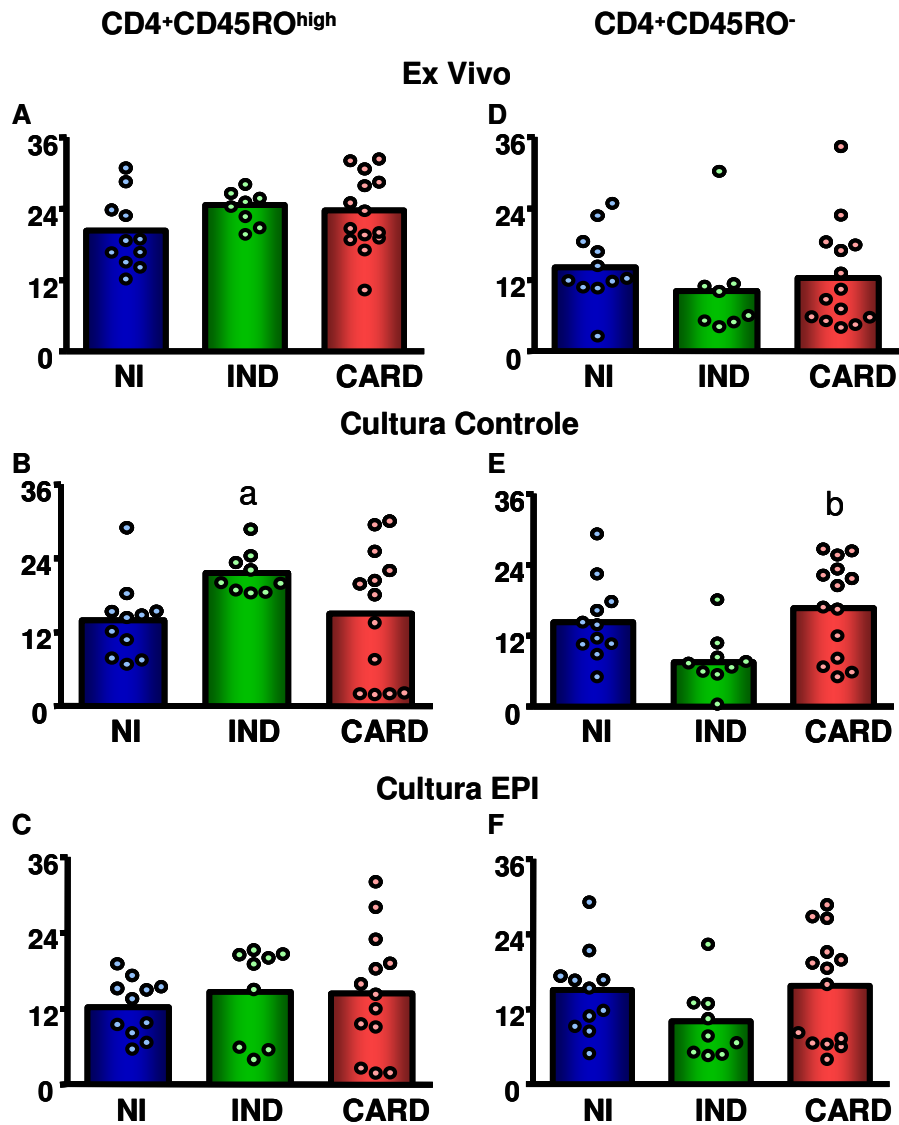


**GRÁFICO 11-** Avaliação da razão de células T  $CD8^+CD45RA^{Total}/CD45RA^-$  e  $CD8^+CD45RA^{high}/CD45RA^-$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

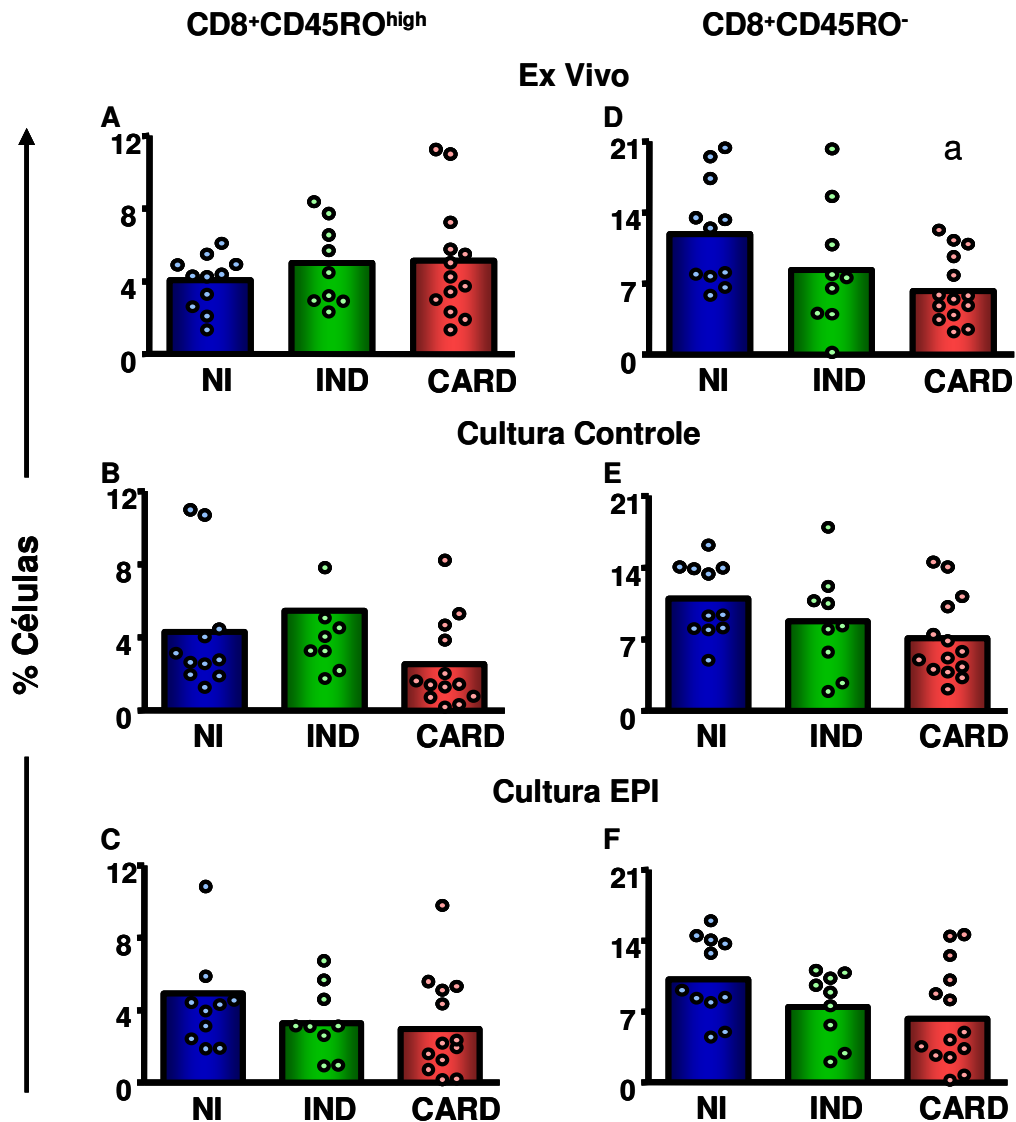
Os resultados apresentados na Figura 12 mostraram que a expressão de CD45RO<sup>high</sup>, molécula expressa por linfócitos de memória, por células T CD4<sup>+</sup> não apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, nos contextos *ex vivo* e em cultura de sangue total (GRAF-12A,B, C). Apesar de o grupo CARD apresentar uma tendência a um maior percentual dessas células no contexto *ex vivo*, quando comparado aos outros grupos (GRAF-12A) esta diferença não se mostrou significativa. Os dados do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>, após cultura sem estímulo mostraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo IND quando comparado ao grupo NI (GRAF-12C). Não foi observada diferença significativa no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, células virgens, nos contextos *ex vivo* e após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-12D, F). Porém, o grupo CARD apresentou percentual significativamente maior ( $p < 0,05$ ) dessas células em relação ao grupo IND (GRAF 12-E).

Quando avaliados os dados da expressão de CD45RO<sup>high</sup> por células T CD8<sup>+</sup>, não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, tanto *ex vivo* como em cultura *in vitro* (GRAF-13A,B, C), apesar do grupo CARD apresentar tendência a um maior percentual dessas células *ex vivo*, quando comparado aos outros grupos (GRAF-13A). Após cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI, os pacientes CARD apresentam diminuição do percentual dessas células (GRAF-13B, C). Os dados mostraram uma significativa diminuição ( $p < 0,05$ ) das células CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> nos pacientes CARD quando comparados aos indivíduos NI no contexto *ex vivo* (GRAF-13D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados quanto ao percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> foram avaliados após cultura *in vitro* (GRAF-13E, F).



**GRÁFICO 12-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



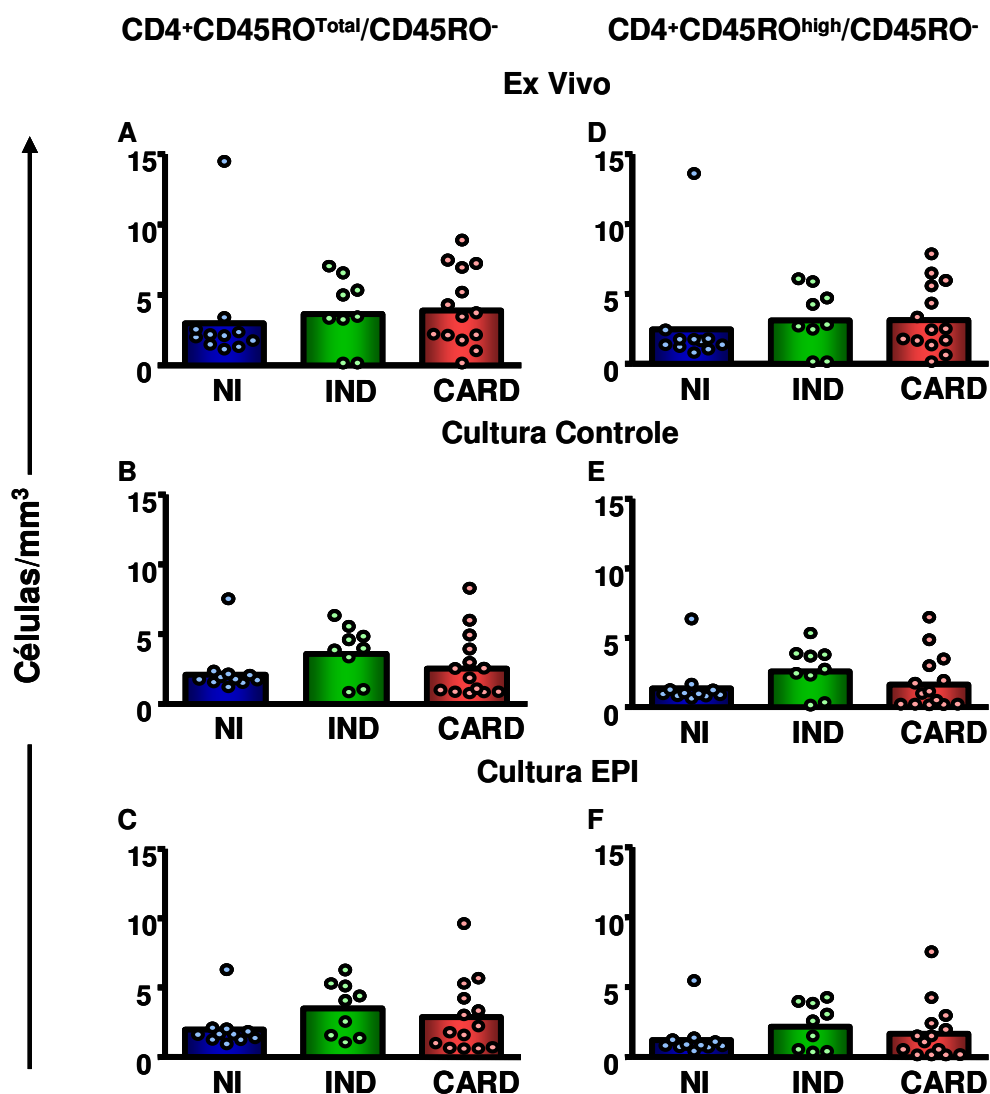
**GRÁFICO 13-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



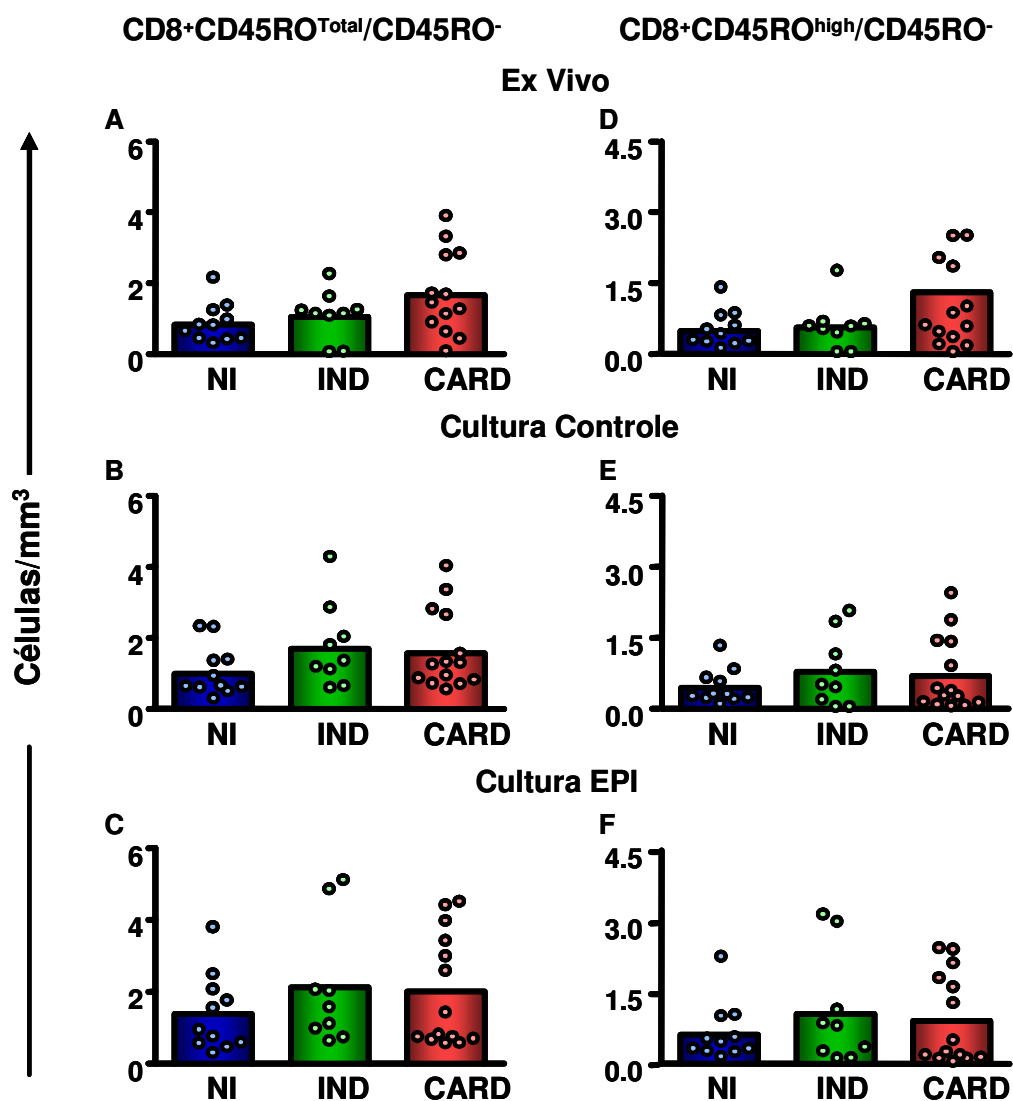
Os Gráficos 14 e 15 mostram os resultados da análise da razão entre células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos celulares CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup>, sendo que a população CD45RO<sup>Total</sup> representa a soma das subpopulações CD45RO<sup>high</sup> e CD45RO<sup>low</sup>, CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup>. A análise dos dados não mostra nenhuma diferença significativa na proporção do valor absoluto CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> entre os grupos estudados, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-14).

A avaliação dos dados da razão de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> não apresentou diferença significativa entre os grupos CARD, IND e NI nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-15).



**GRÁFICO 14-** Avaliação da razão de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>Total</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 15-** Avaliação da razão de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>Total</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

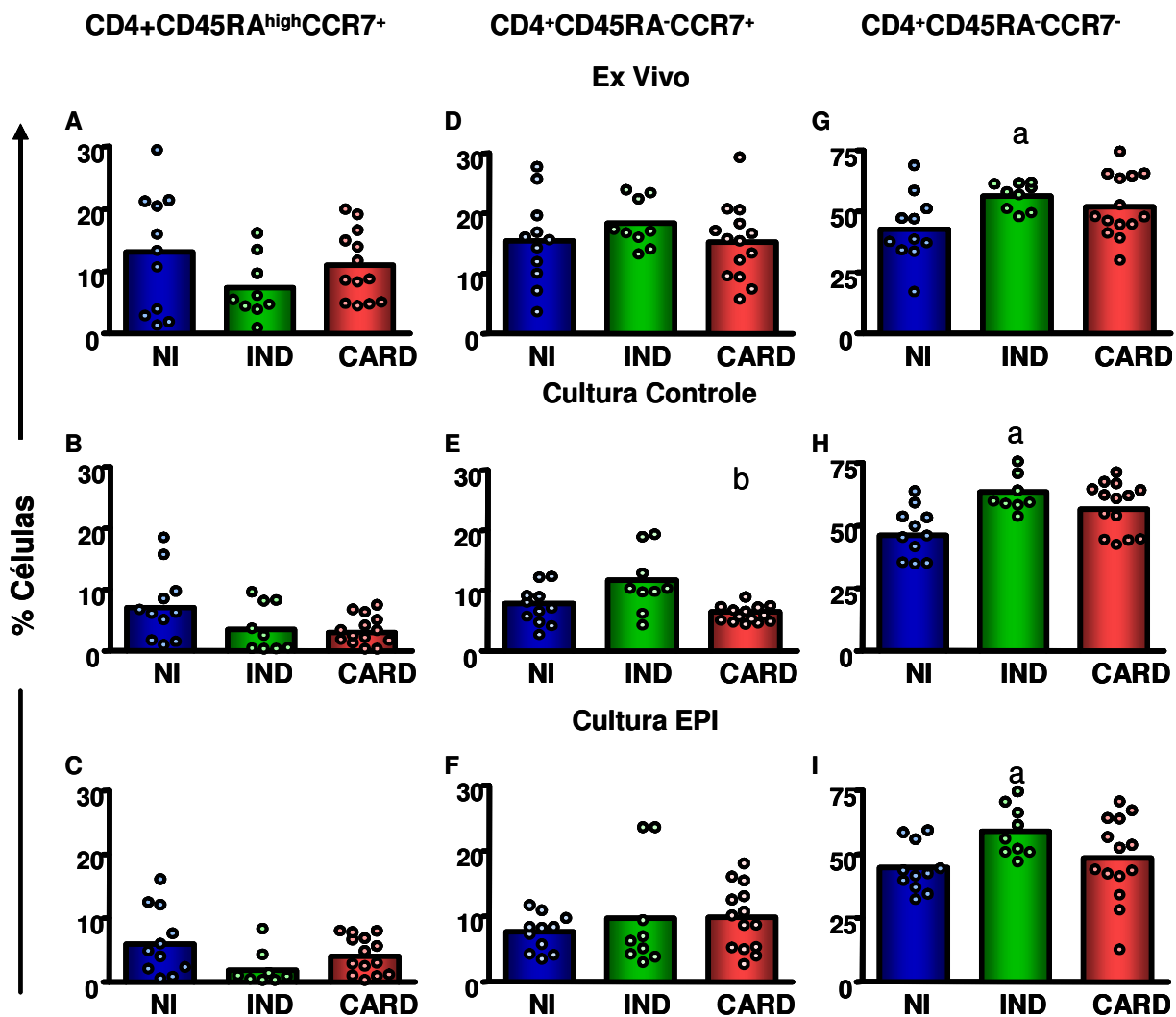
#### **4- Expressão das moléculas co-estimulatórias/adesão CD45RA/CCR7 e CD45RO/CCR7 por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de doença de Chagas e indivíduos não infectados.**

A tripla marcação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico com as moléculas CD45RA, CD45RO e CCR7 nos permitem avaliar as vias de recirculação dos linfócitos: o percentual de células que estão em migração tanto para órgãos linfóides secundários quanto para foco inflamatório. Mas, principalmente, podem ajudar a distinguir as células de memória em duas sub-populações, resultado da seleção de sobrevivência das células efetoras e intermediárias geradas na resposta primária que se encontram em diferentes estágios de diferenciação (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000), sendo: 1- células de memória central (T<sub>CM</sub>), capazes de migrarem para linfonodos, possuem limitada função efetora, e se transformam em células de memória efetora após a resposta secundária, e 2- células de memória efetora (T<sub>EM</sub>), capazes de migrarem para foco inflamatório, produzem citocinas rapidamente, porém, possuem pouca capacidade proliferativa.

A análise dos dados mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na expressão de CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, nos contextos *ex vivo* e cultura celular *in vitro* (GRAF-16A,B, C). Quanto à avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos nos contextos *ex vivo* e *in vitro* na presença de EPI (GRAF-16D, F). Contudo, após cultura na ausência de antígenos de EPI, foi observada uma diminuição significativa (p<0,05) no percentual dessas células no grupo CARD quando comparado ao grupo IND (GRAF-16E). Os dados mostraram um aumento significativo no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> em sangue total de pacientes IND quando comparado a indivíduos NI, (p<0,05) tanto *ex vivo* como *in vitro* na presença de EPI ou sem estimulação ) (p<0,01) (GRAF-16H).

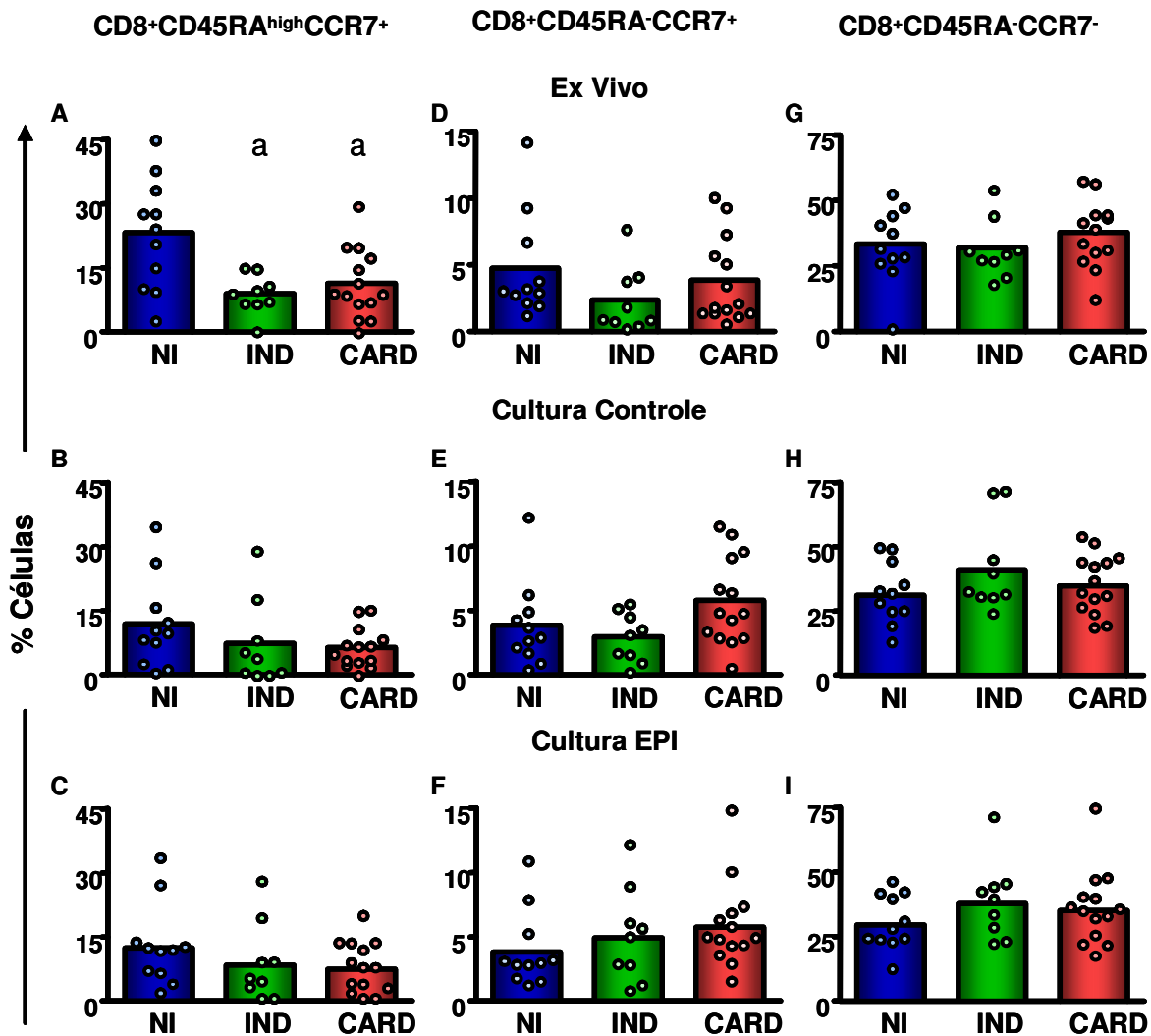
Em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os dados mostraram uma diminuição significativa (p<0,05) na expressão do fenótipo CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> por sangue total de pacientes portadores das forma clínicas IND e CARD em relação aos indivíduos NI quando avaliados no contexto *ex vivo* (GRAF-17A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados quando os dados foram avaliados após cultura na ausência e na presença

de antígenos de EPI (GRAF-17B, C). A análise dos dados relativos ao percentual de células  $CD8^+CD45RA^-CCR7^+$ , não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados nos tanto *ex vivo*, como na presença de antígenos de EPI ou em culturas controle (GRAF-17D, E, F). Também não foram observadas diferenças significativas quanto à análise dos dados do percentual de células  $CD8^+CD45RA^-CCR7^-$  entre os grupos, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-17G,H, I).



**GRÁFICO 16-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 17-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

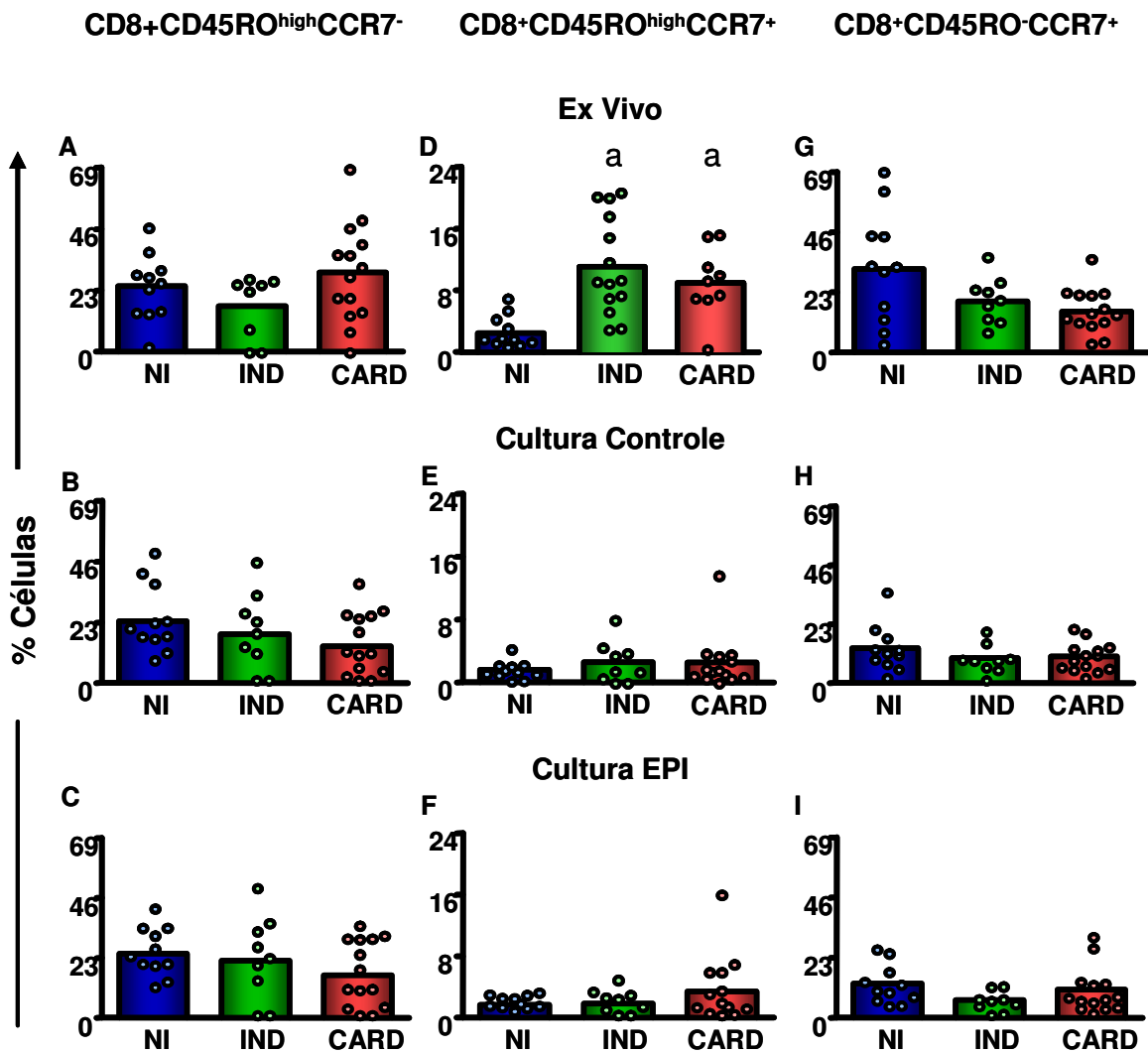
A análise dos dados de células  $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^-$  não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados (GRAF-18A,B, C), porém o grupo de pacientes CARD apresenta uma tendência a diminuir o percentual dessas células após cultura *in vitro*, quando comparado aos grupos IND e NI (GRAF-18B, C). A avaliação do percentual de células T  $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^+$  mostrou que pacientes CARD apresentam percentual significativamente menor desta sub-população *ex vivo* ( $p<0,05$ ) quando comparado aos indivíduos NI (GRAF-18D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantivas quanto as análises dessas células após cultura (GRAF-18E,F).

Quando avaliamos o percentual de células T  $CD8^+CD45RO^{high}CCR7^-$ , observamos uma tendência de aumento do percentual no grupo CARD no contexto *ex vivo* (GRAF-19A) e uma diminuição do percentual celular após cultura *in vitro* (GRAF-19B, C) quando comparado aos grupos IND e NI, porém não foi observada nenhuma diferença significativa. A análise dos dados da expressão do fenótipo  $CD45RO^{high}CCR7^+$  por células  $CD8^+$ , os grupos IND e CARD apresentaram percentual significativamente maior ( $p<0,05$ ) e ( $p<0,001$ ) quando comparado ao grupo NI (GRAF-19D). A avaliação dessas células após cultura não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, (GRAF-19E, F).

A análise das células T  $CD8^+$  apresentando os fenótipos  $CD45RO^-CCR7^+$  nos contextos *ex vivo* e após cultura *in vitro* não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (GRAF-19G,H, I). Entretanto, os grupos IND e CARD apresentaram um diminuição do percentual dessas células no contexto *ex vivo* (GRAF-19G).







**GRÁFICO 19-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>/CCR7<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

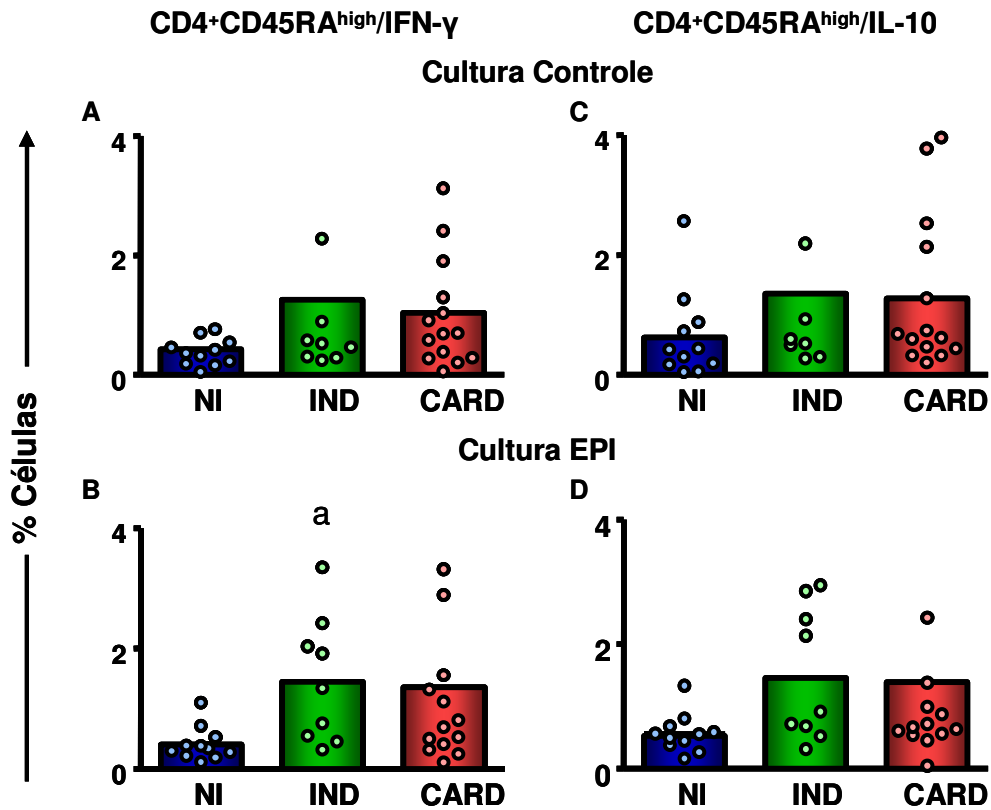
Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

**5- Expressão de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-10) por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o fenótipo celular CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> no sangue periférico de indivíduos portadores de doença de Chagas e não infectados**

A presença das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> foi avaliada nos grupos IND, CARD e NI na ausência ou presença de estimulação *in vitro* por antígenos de EPI.

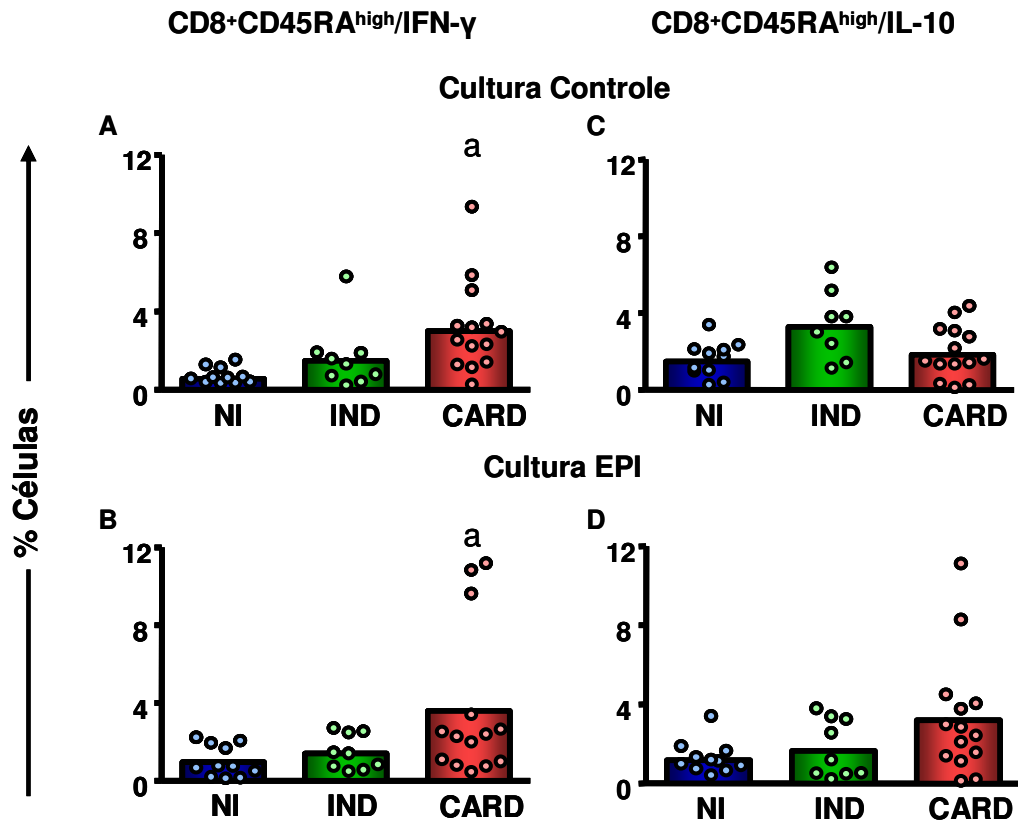
A análise dos dados mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> em sangue total de pacientes IND em relação aos indivíduos NI, quando avaliamos em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-20B). Não foi observada diferença estatística quando analisamos essas células em cultura na ausência de antígenos de EPI (GRAF-20A). Quanto à expressão da citocina IL-10 por células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em cultura de sangue total (GRAF-20C, D).

Além disso, os dados mostram que pacientes CARD apresentaram percentual significativamente maior ( $p < 0,001$ ) de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> expressando IFN- $\gamma$  em culturas controle (GRAF-21A), que é significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-21B), quando comparado com indivíduos NI. Não foram observadas diferenças significativas quando avaliamos o percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> IL-10<sup>+</sup>, em cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-21C, D).



**GRÁFICO 20-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



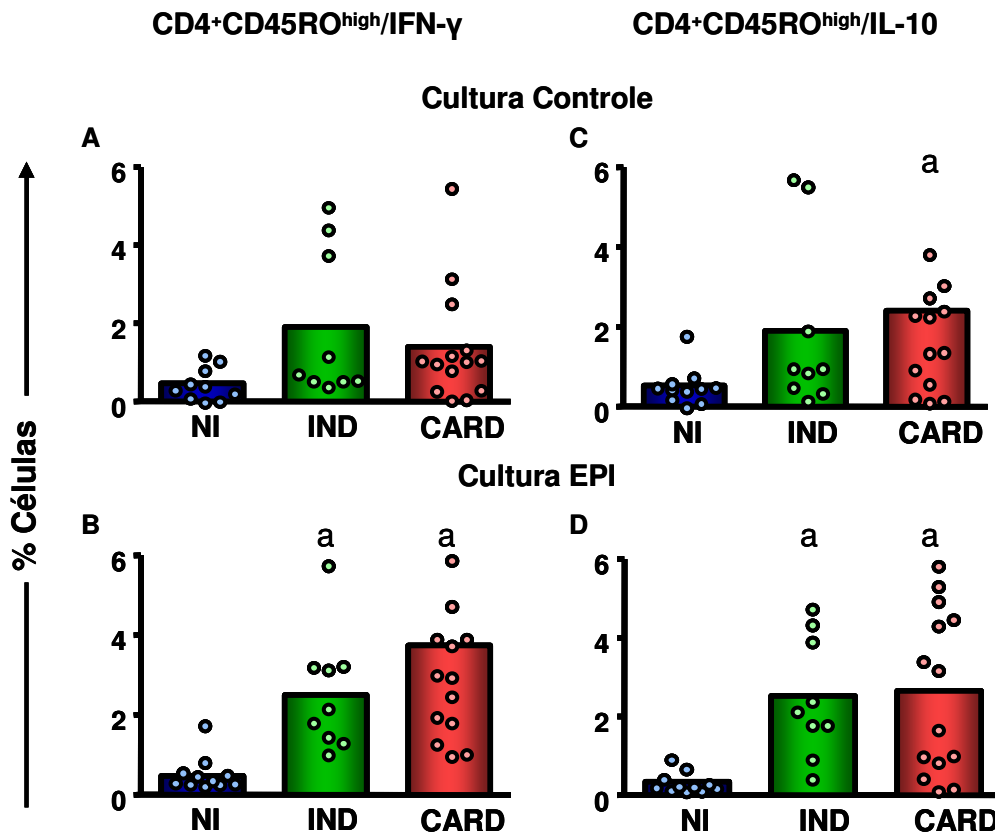
**GRÁFICO 21-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

A análise dos dados mostrou um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de células  $CD4^+CD45RO^{high}$  expressando  $IFN-\gamma$  por sangue total de pacientes IND em relação aos indivíduos NI, após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22B). O mesmo sendo observado para os pacientes CARD em relação aos indivíduos NI, após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22B). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados após cultura na ausência de estímulo antigênico (GRAF-22A).

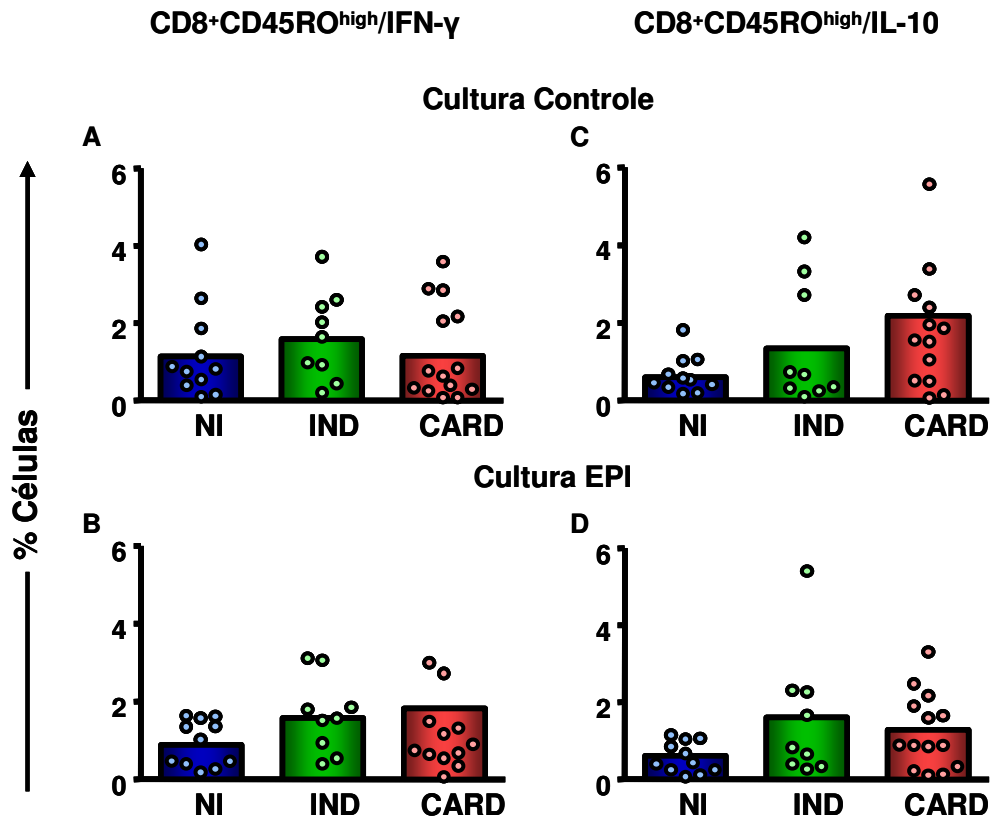
Quanto à análise das células T  $CD4^+CD45RO^{high}IL-10^+$ , observa-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do percentual dessas células em pacientes CARD quando comparado aos indivíduos NI em cultura na ausência de estímulo antigênico (GRAF-22C). Os dados mostraram que há um percentual significativamente maior ( $p < 0,01$ ) de linfócitos T  $CD4^+CD45RO^{high}$  em pacientes IND e CARD positivos para  $IL-10^+$  em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22D).

A análise dos dados de expressão das citocinas  $IFN-\gamma$  e  $IL-10$  por células T  $CD8^+CD45RO^{high}$  não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados, após cultura *in vitro* (GRAF-23).



**GRÁFICO 22-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN-γ<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 23-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



## **RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados em cinco partes a partir dos dados obtidos na avaliação do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (IND) e cardíaca (CARD) da doença de Chagas assim como de indivíduos não-infectados (NI). Os estudos foram feitos tanto no contexto *ex vivo* como após cultura de células *in vitro* com ou sem estimulação por antígenos derivados do *T. cruzi* (EPI). A primeira parte se refere à avaliação da ativação celular analisando-se a expressão da molécula de superfície CD62L por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, tanto *ex vivo*, quanto após estimulação *in vitro*. Na segunda parte dos resultados foram avaliados o percentual de expressão do receptor de quimiocina CCR7, responsável pela migração dos linfócitos para a zona dos linfonodos, nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8. A terceira parte dos resultados compreende a análise do percentual de expressão das moléculas CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, com o objetivo de caracterizarmos o perfil de células virgens e de memória nos grupos NI, IND e CARD. Na seção de resultados mostramos os dados referentes ao percentual de células duplo marcadas para CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CCR7<sup>-</sup> por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Esta análise permite distinguir as células que estão migrando para os linfonodos e aquelas que estão migrando para o foco inflamatório. Na quinta e última parte, mostramos a análise de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam concomitantemente CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> com o objetivo de avaliarmos o padrão de citocinas produzidas por essas células.

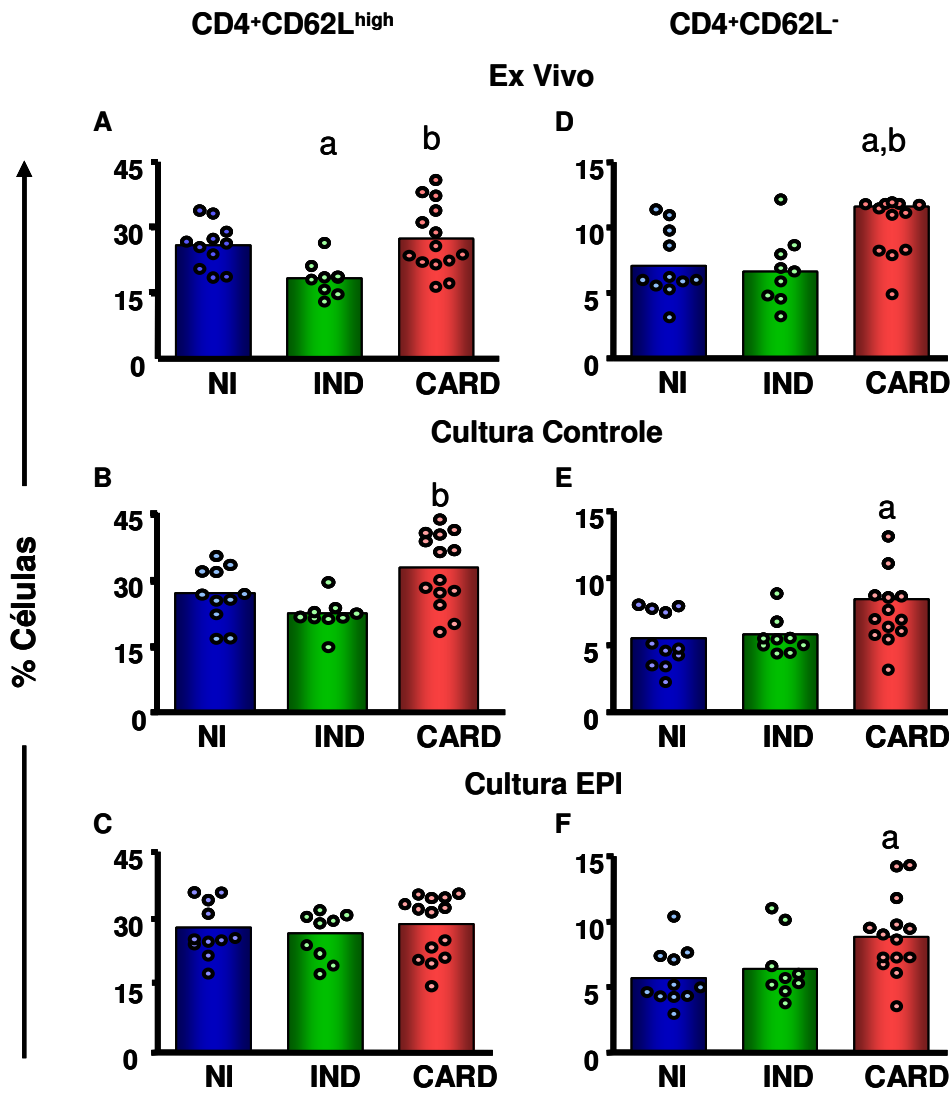
### **1- Expressão da molécula de adesão CD62L por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico**

O receptor de rolamento CD62L é responsável pela adesão do leucócito ao endotélio e está associada ao deslocamento dos linfócitos T virgens para os linfonodos periféricos. A molécula de superfície CD62L foi avaliada em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos grupos NI, IND e CARD. Os resultados apresentados no Gráfico 1 mostram a avaliação da expressão da molécula CD62L em linfócitos T em sangue total, antes e após cultura com antígenos de epimastigota (EPI). A análise dos dados no contexto *ex vivo* revelou uma expressão significativamente menor ( $p < 0,01$ ) do percentual de células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> em pacientes portadores da forma clínica IND em relação aos pacientes CARD e indivíduos

não-infectados ( $p < 0,05$ ) (GRAF-1A). O percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (GRAF-1D) é bastante semelhante nos indivíduos não infectados e nos pacientes IND, apresentando valores bem mais baixos do que os obtidos pelas células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>. Também foi observado um aumento significativo de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ) no grupo CARD em relação aos indivíduos não infectados e ( $p < 0,01$ ) e ao grupo IND (GRAF-1D).

Quando avaliamos a expressão de CD62L em cultura células de pacientes IND e CARD e indivíduos não infectados sem estímulo antigênico, observa-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) nos pacientes CARD em relação aos pacientes IND (GRAF-1B). O grupo de pacientes CARD apresentou percentual significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que indivíduos NI (GRAF-1E).

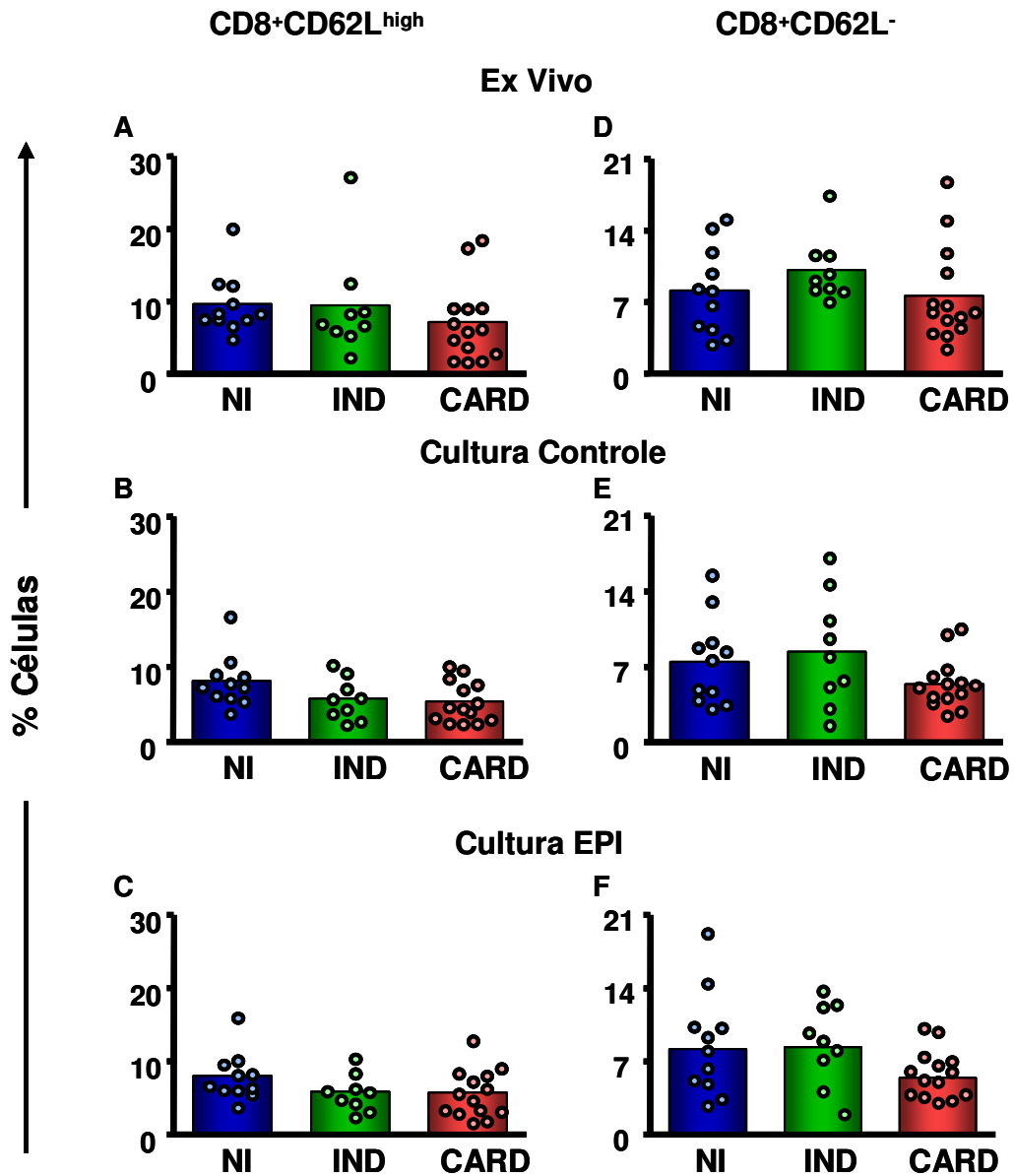
A avaliação na presença de antígenos de EPI não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa no percentual da expressão de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> (GRAF-1C). Entretanto observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> no grupo CARD quando comparado ao grupo de indivíduos não infectados (GRAF-1F).



**GRÁFICO 1-** Avaliação do percentual de células T  $CD4^+CD62L^{high}$  e  $CD4^+CD62L^-$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Quando avaliado o percentual de células T  $CD8^+CD62L^{high}$  e  $CD8^+CD62L^-$  nos contextos *ex vivo*, em cultura na presença ou ausência de antígenos de EPI, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes IND e CARD ou indivíduos não infectados. Porém observa-se que pacientes CARD apresentaram uma tendência a ter um menor percentual de células T, tanto  $CD8^+CD62L^{high}$  quanto  $CD8^+CD62L^-$ , em relação aos outros grupos.



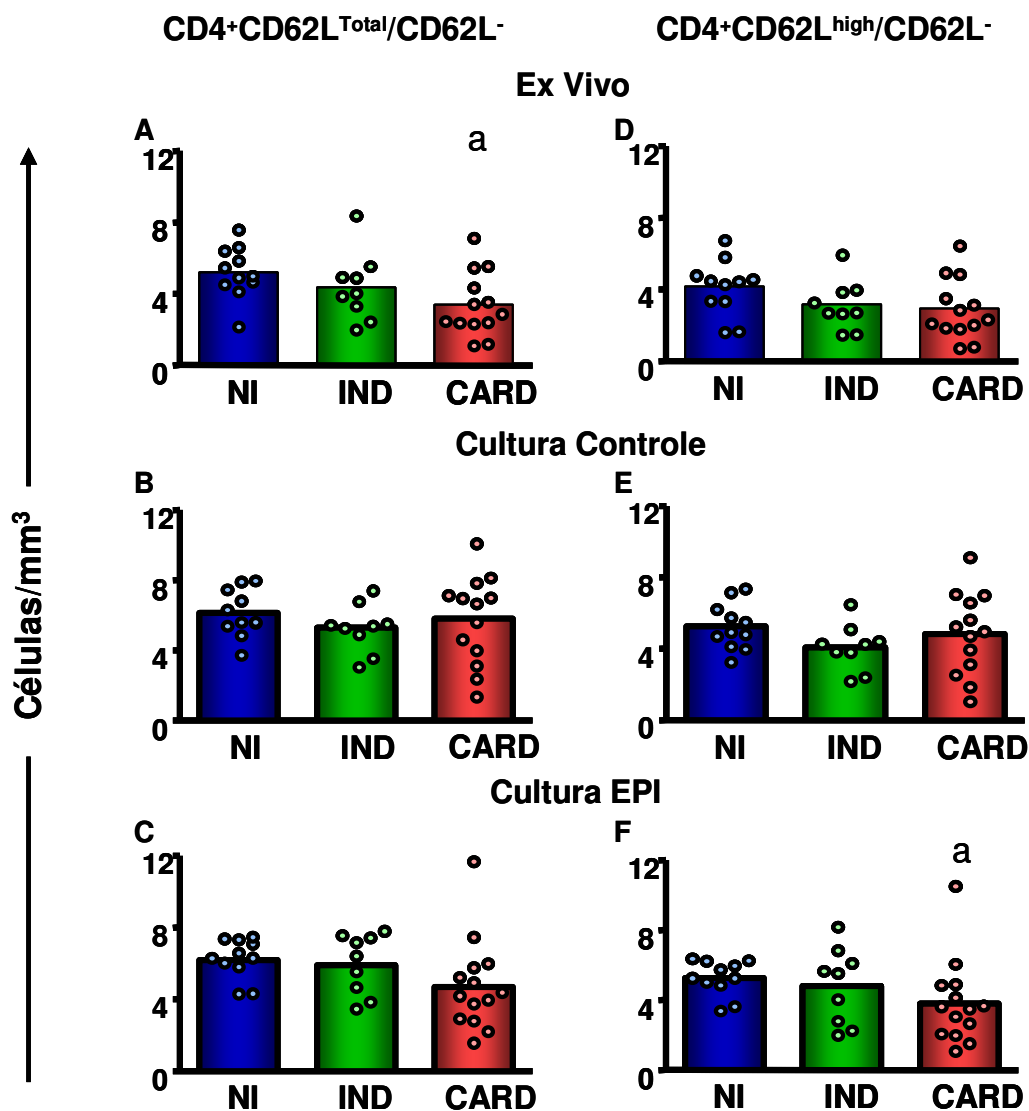
**GRÁFICO 2-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Após a avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> focando no perfil de expressão CD62L<sup>high</sup> e CD62L<sup>-</sup> analisamos a razão do valor absoluto de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>. Esta análise é importante para avaliar a proporção de células T virgens/ativadas no sangue periférico desses indivíduos. Pode-se observar uma diminuição significativa *ex vivo* (p<0,05) da razão do número de células T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> no grupo dos pacientes CARD quando comparado ao grupo de indivíduos NI (GRAF-3A). No mesmo contexto, não houve diferença estatisticamente significativa na razão de células CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup> entre os grupos estudados (GRAF-3D).

Quando avaliados os dados de cultura na ausência de estímulo antigênico, não foi observada nenhuma diferença significativa para os dois fenótipos avaliados de células T CD4<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>, quando comparados os grupos CARD, IND e NI (GRAF-3B,E). Porém observa-se uma diminuição significativa (p<0,05) da razão de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup> no grupo CARD quando comparamos ao grupo NI, após cultura na presença de EPI (GRAF-3F). Não foi observada diferença significativa da razão de células CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> entre os grupos avaliados (GRAF-3C).

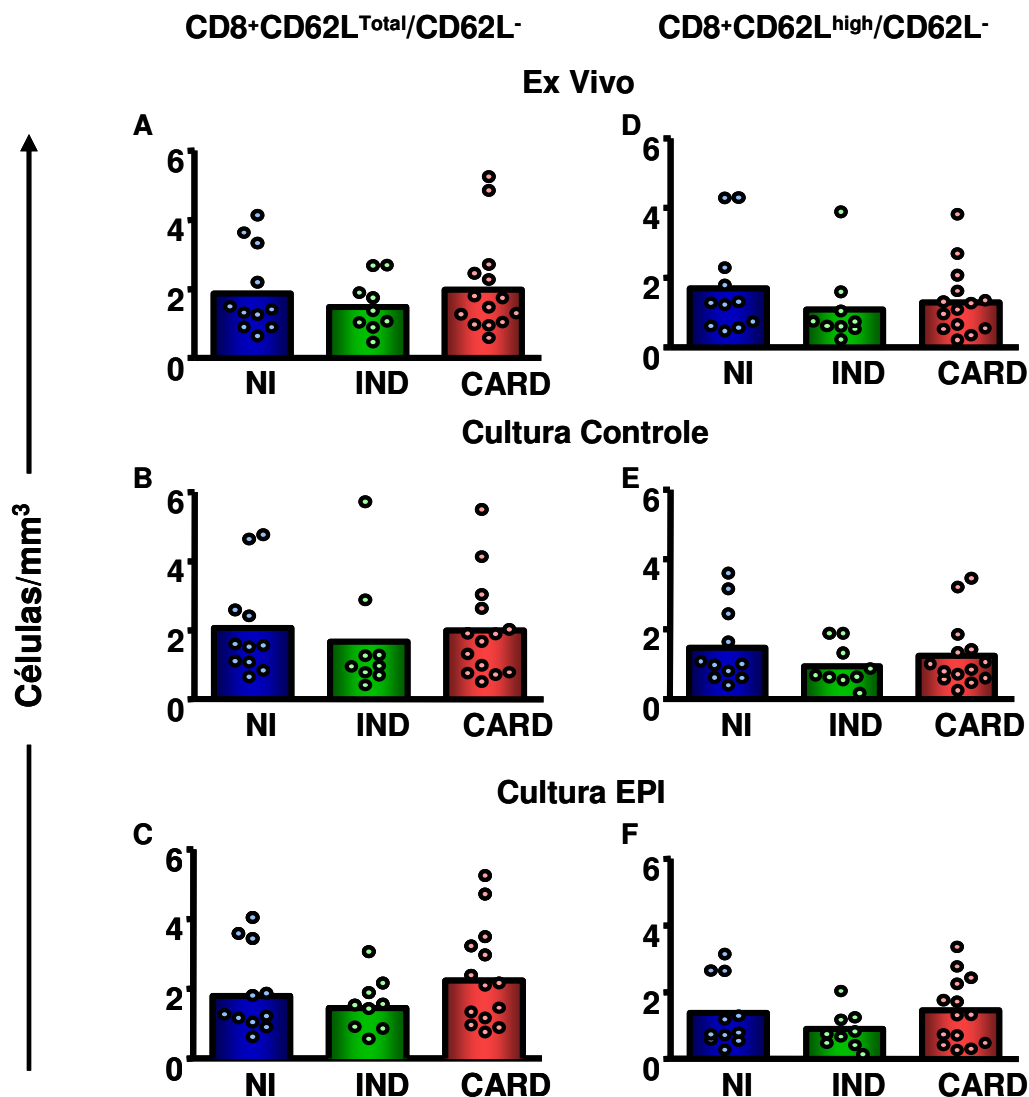
Quando avaliamos a razão das células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> e CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup>, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos chagásicos IND e CARD e indivíduos não infectados, em nenhum dos contextos *ex vivo* e culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-4). Apesar disso, os grupos de pacientes IND e CARD apresentaram tendência a uma menor razão de células T CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> quando comparado ao grupo NI, nos contextos *ex vivo* e culturas na presença ou ausência de antígenos de EPI (GRAF-4D,E,F).



**GRÁFICO 3-** Avaliação da razão de células T  $CD4^+CD62L^{Total}/CD62L^-$  e  $CD4^+CD62L^{high}/CD62L^-$  do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).





**GRÁFICO 4-** Avaliação da razão de células T  $CD8^+CD62L^{Total}/CD62L^-$  e  $CD8^+CD62L^{high}/CD62L^-$  do sangue periférico.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

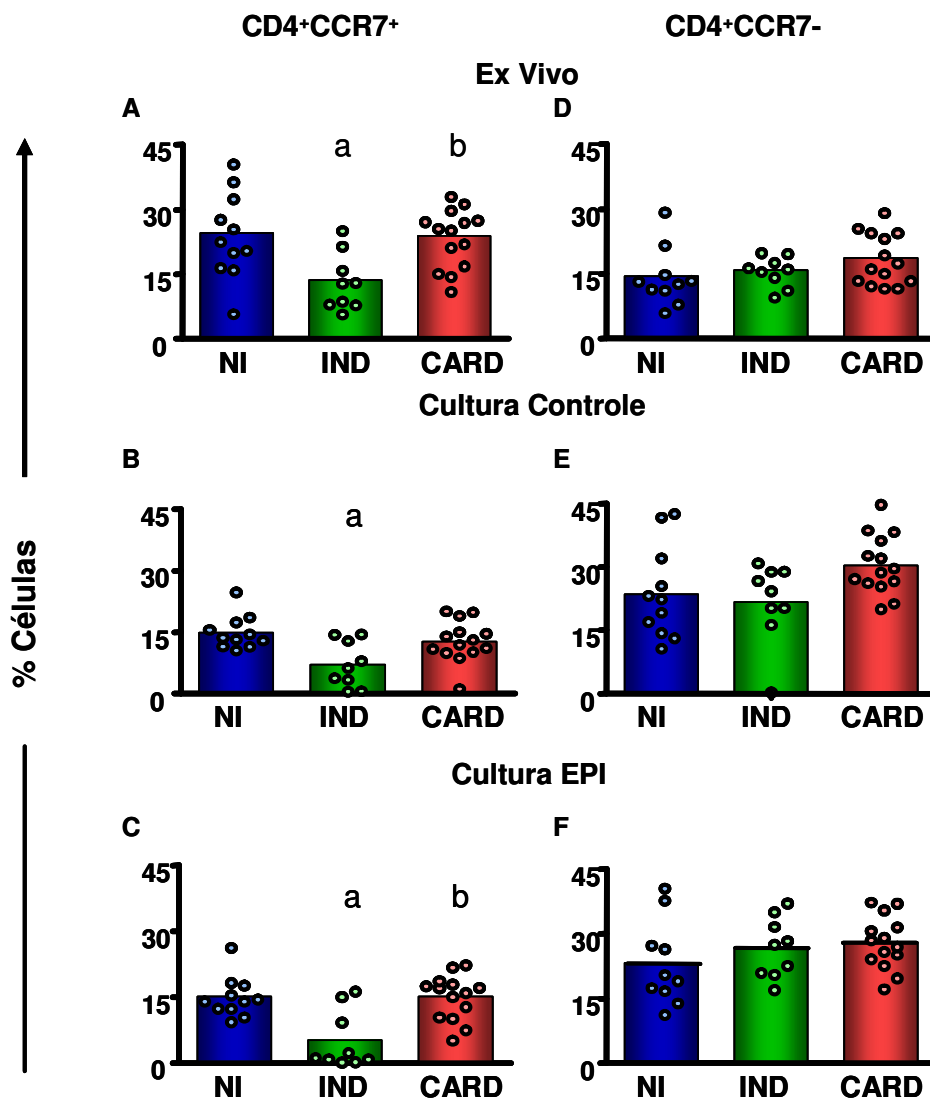
## **2- Expressão do receptor de quimiocina CCR7 por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico**

A molécula de superfície CCR7 é um receptor celular de quimiocina que transduz sinais que estimulam a migração e retenção dos leucócitos para as zonas dos linfonodos. Quando a molécula deixa de expressa (CCR7<sup>-</sup>) ou não é expressa, elas migram para o foco inflamatório, ou recirculam para órgãos linfóides secundários.

A expressão do receptor de quimiocina CCR7 por células T foi avaliada em sangue total de pacientes IND, CARD e indivíduos NI, tanto no contexto *ex vivo* e culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI. A avaliação dos dados demonstra que o grupo IND apresenta diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de células T CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> em relação aos grupos CARD e NI nos contextos *ex vivo* e em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-5A,C). A avaliação das células CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> nas culturas controle mostrou que o grupo IND apresenta diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do percentual dessas células em relação ao grupo NI (GRAF-5B).

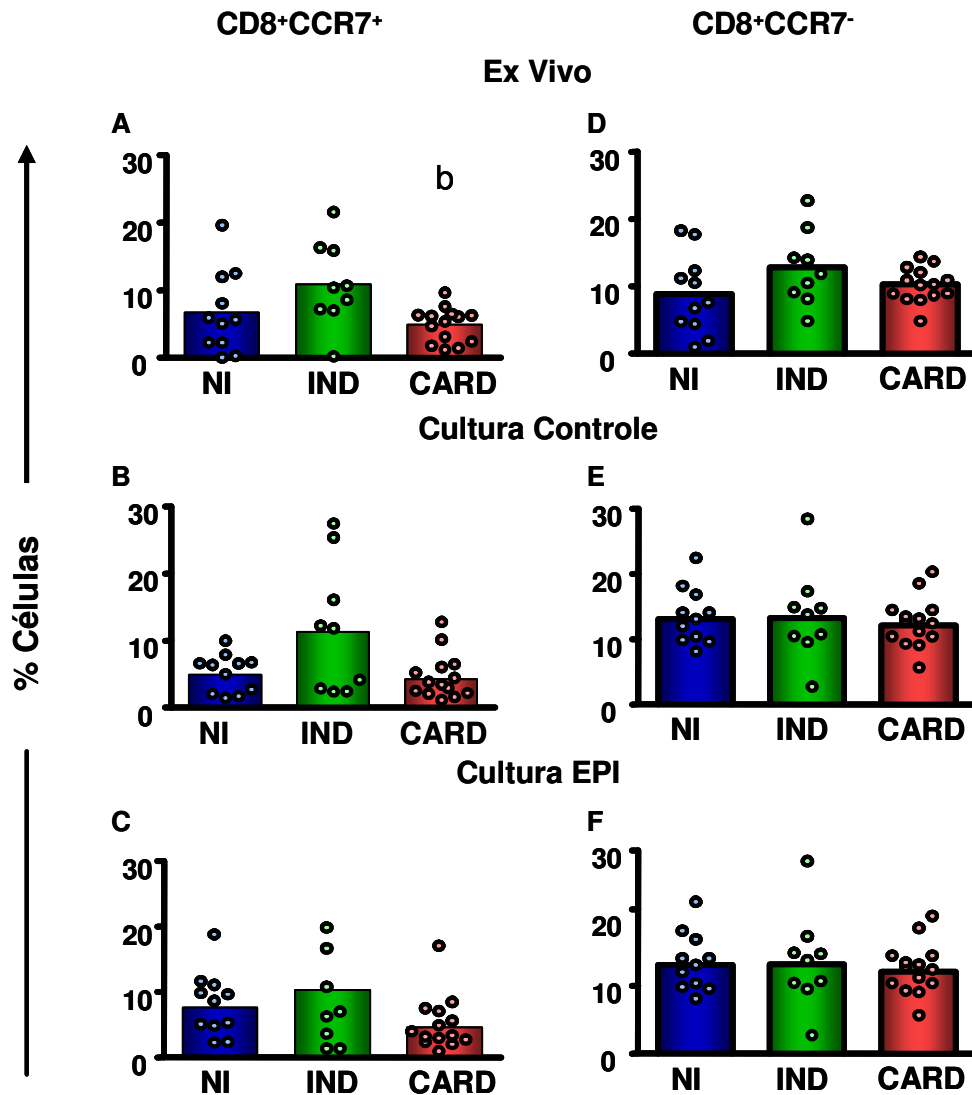
Quando as células CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> foram avaliadas observa-se uma tendência ao aumento do percentual dessas células em sangue total de pacientes CARD tanto *ex vivo* como em cultura (GRAF-5D, E,F) quando comparado aos grupos de pacientes IND e indivíduos NI.

A análise do fenótipo celular CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, mostrou que o grupo CARD apresentou um percentual significativamente menor dessas células ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo IND, no contexto *ex vivo* (GRAF-6A), porém a análise dos dados após cultura não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (GRAF-6B, C) A análise do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, em nenhum dos contextos estudados (GRAF-6D, E, F).



**GRÁFICO 5-** Avaliação do percentual de células T  $CD4^+CCR7^{high}$  e  $CD4^+CCR7^-$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

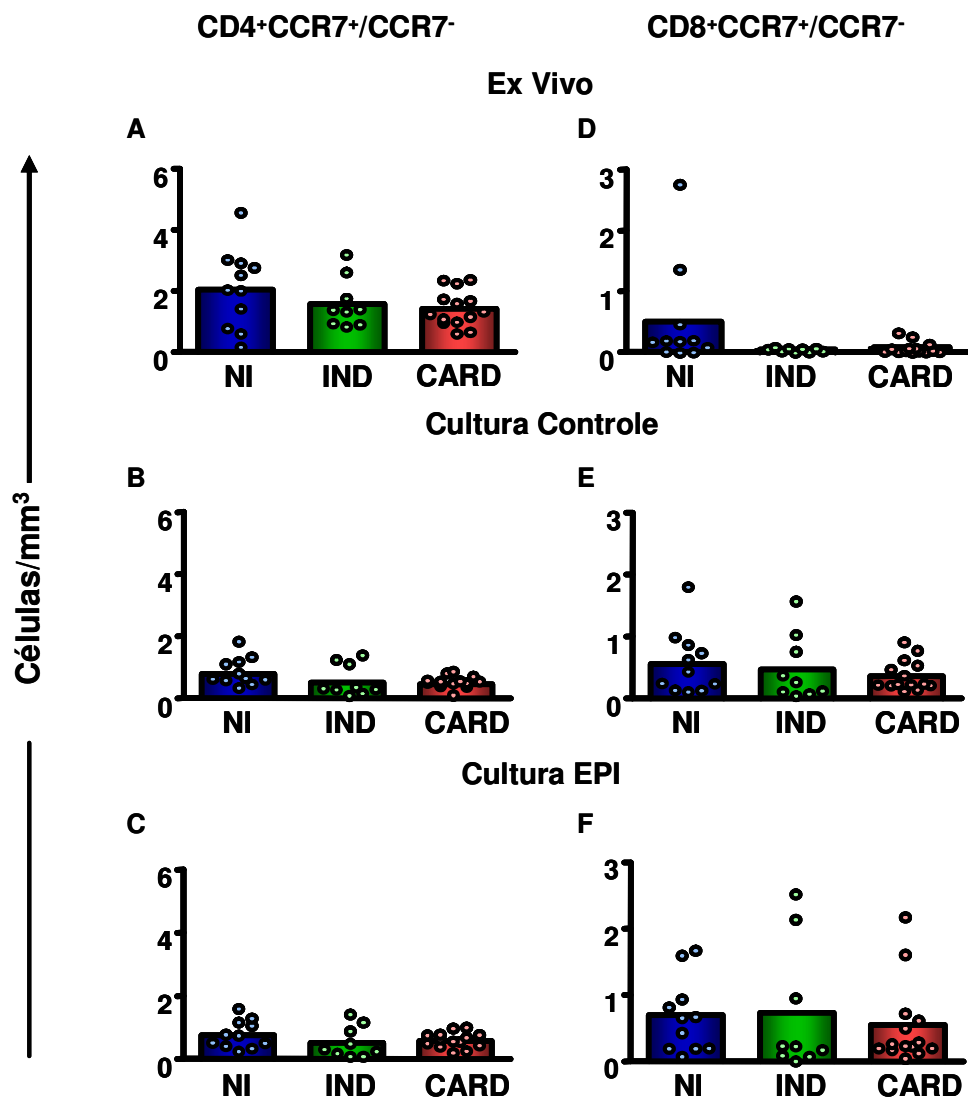


**GRÁFICO 6-** Avaliação do percentual de células T  $CD8^+CCR7^{high}$  e  $CD8^+CCR7^-$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Após a avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o perfil CCR7<sup>+</sup> e CCR7<sup>-</sup>, analisamos a razão do valor absoluto de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o fenótipo celular CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>. Os grupos de pacientes CARD e IND apresentam tendência a uma menor razão do número de células/mm<sup>3</sup> do fenótipo celular CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> quando comparado ao grupo de indivíduos NI, antes e após culturas, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa (GRAF-7A,B, C). Houve uma notável redução das razões dos valores absolutos de células T CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> em todos os grupos estudados após culturas na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-7B, C), sem diferenças significativas.

Quanto às células T CD8<sup>+</sup>, observa-se inclinação a uma menor proporção CCR7<sup>+</sup> por CCR7<sup>-</sup> nos grupos IND e CARD confrontados com o grupo de indivíduos NI, nos parâmetros *ex vivo* e cultura na ausência de antígenos de EPI (GRAF-7D,E), mas diferenças estatisticamente diferentes não foram observadas. Após a cultura na presença de antígenos de EPI, observamos tendência do grupo CARD a uma menor razão das células CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> comparado aos outros dois grupos avaliados, sem diferença significativa (GRAF-7F).



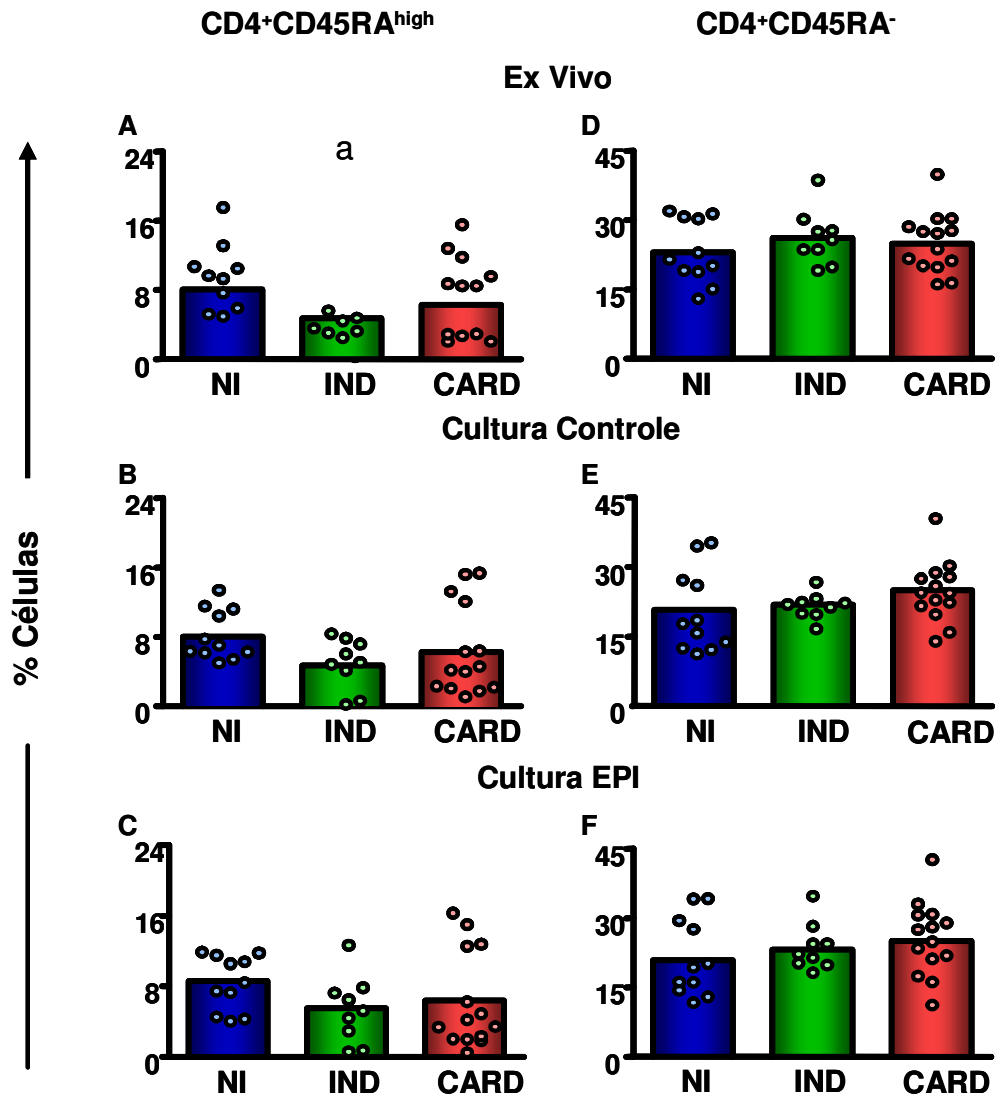
**GRÁFICO 7-** Avaliação da razão de células T  $CD4^{+}CCR7^{+}/CCR7^{-}$  e  $CD8^{+}CCR7^{+}/CCR7^{-}$  presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

### 3- Expressão das moléculas co-estimulatórias CD45RA e CD45RO por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico

A exposição do sistema imune a um antígeno estranho acentua sua capacidade de responder novamente ao antígeno, a esse fenômeno denominamos de memória imunológica. As células de memória apresentam características que as tornam mais eficientes na eliminação dos antígenos do que os linfócitos virgens, que não foram anteriormente expostos a antígenos. Os resultados mostraram que a expressão de CD45RA<sup>high</sup>, molécula expressa por células T virgens, foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o percentual de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> de pacientes IND quando comparado aos indivíduos NI no contexto *ex vivo* (GRAF-8A). Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados após cultura (GRAF-8B, C). Quando avaliado o fenótipo celular CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, células de memória, os dados não revelaram nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados tanto *ex vivo* quanto em culturas (GRAF-8D, E, F).

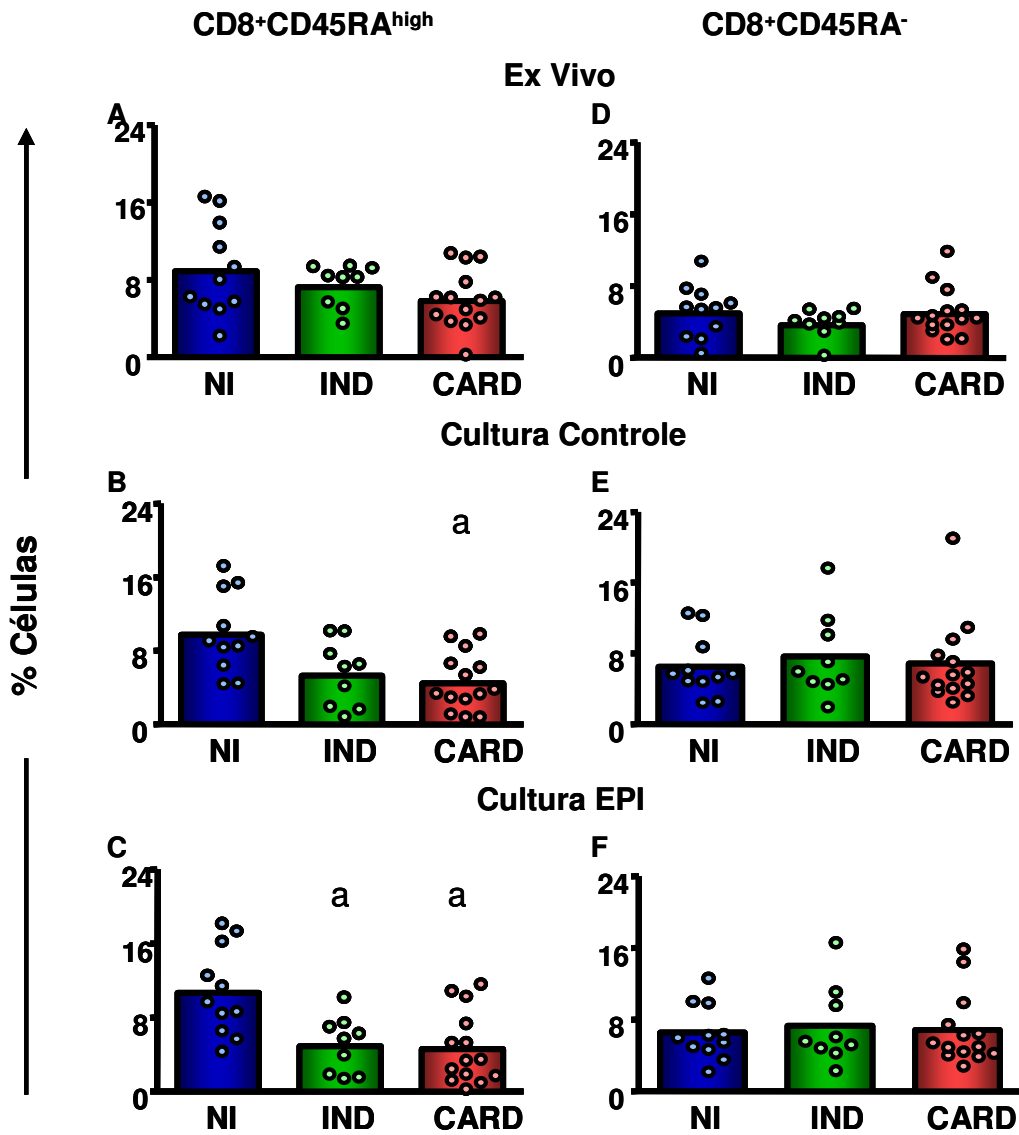
Os fenótipos CD45RA<sup>high</sup> e CD45RA<sup>-</sup> para as células T CD8<sup>+</sup> também foram avaliados. No contexto *ex vivo* não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados. Porém, a avaliação dos resultados obtidos após cultura na presença e na ausência de antígenos de EPI demonstra uma significativa diminuição ( $p < 0,05$ ) do percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> em pacientes CARD confrontado com indivíduos NI (GRAF- 9B). No entanto, pacientes IND ( $p < 0,05$ ) e CARD ( $p < 0,01$ ) apresentaram percentual significativamente menor quando comparados a indivíduos NI, em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-9C). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> entre os grupos avaliados, nos contextos *ex vivo*, cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF- 9E,F,G).



**GRÁFICO 8-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas e não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).





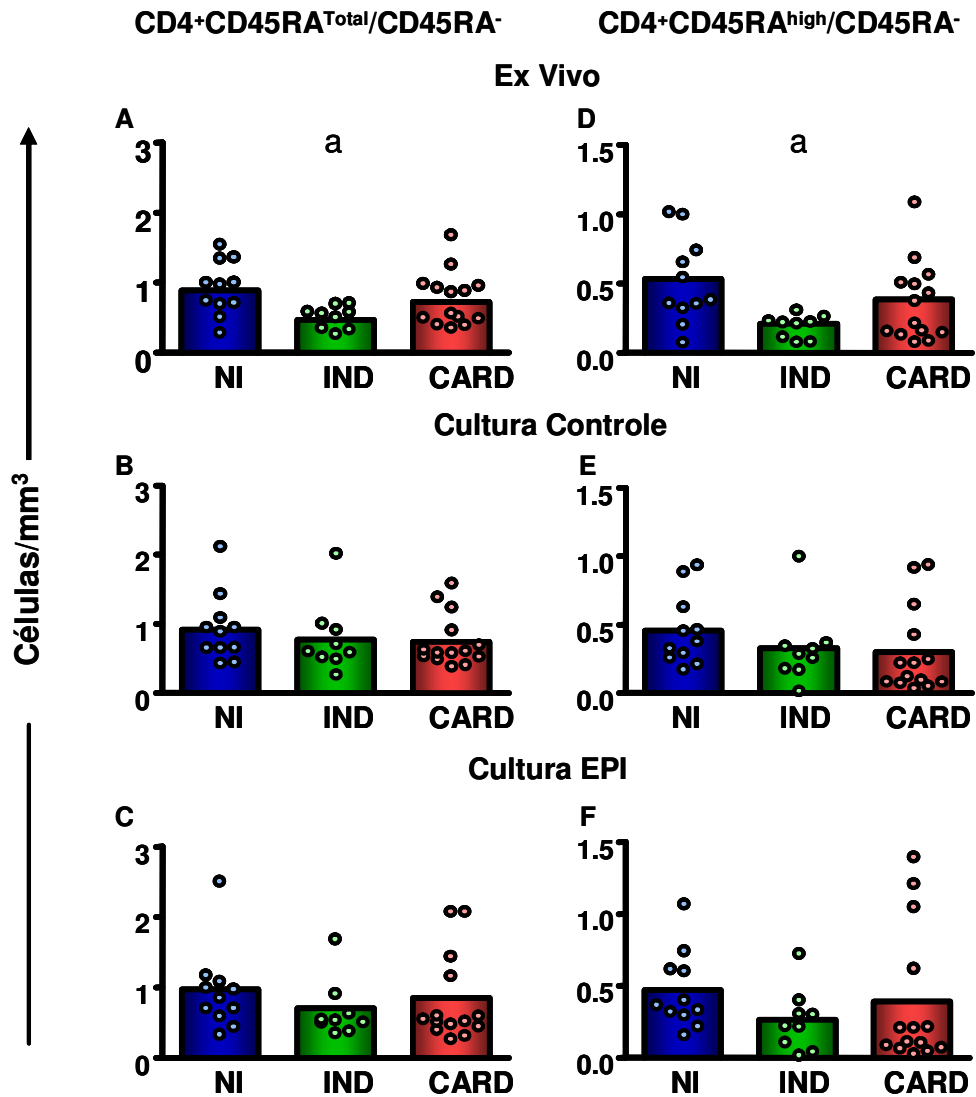
**GRÁFICO 9-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Os Gráficos 10 e 11 mostram os resultados de razão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos celulares CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup>, sendo que a população CD45RA<sup>Total</sup> representa a soma das subpopulações CD45RA<sup>high</sup> e CD45RA<sup>low</sup>, e CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup>. A análise dos dados no contexto *ex vivo* demonstra uma diminuição significativa (p<0,05) do número de células/mm<sup>3</sup> da proporção de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup> dos pacientes IND em relação ao grupo NI (GRAF-10A). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados, nos contextos *ex vivo* e após cultura (GRAF-10B, C).

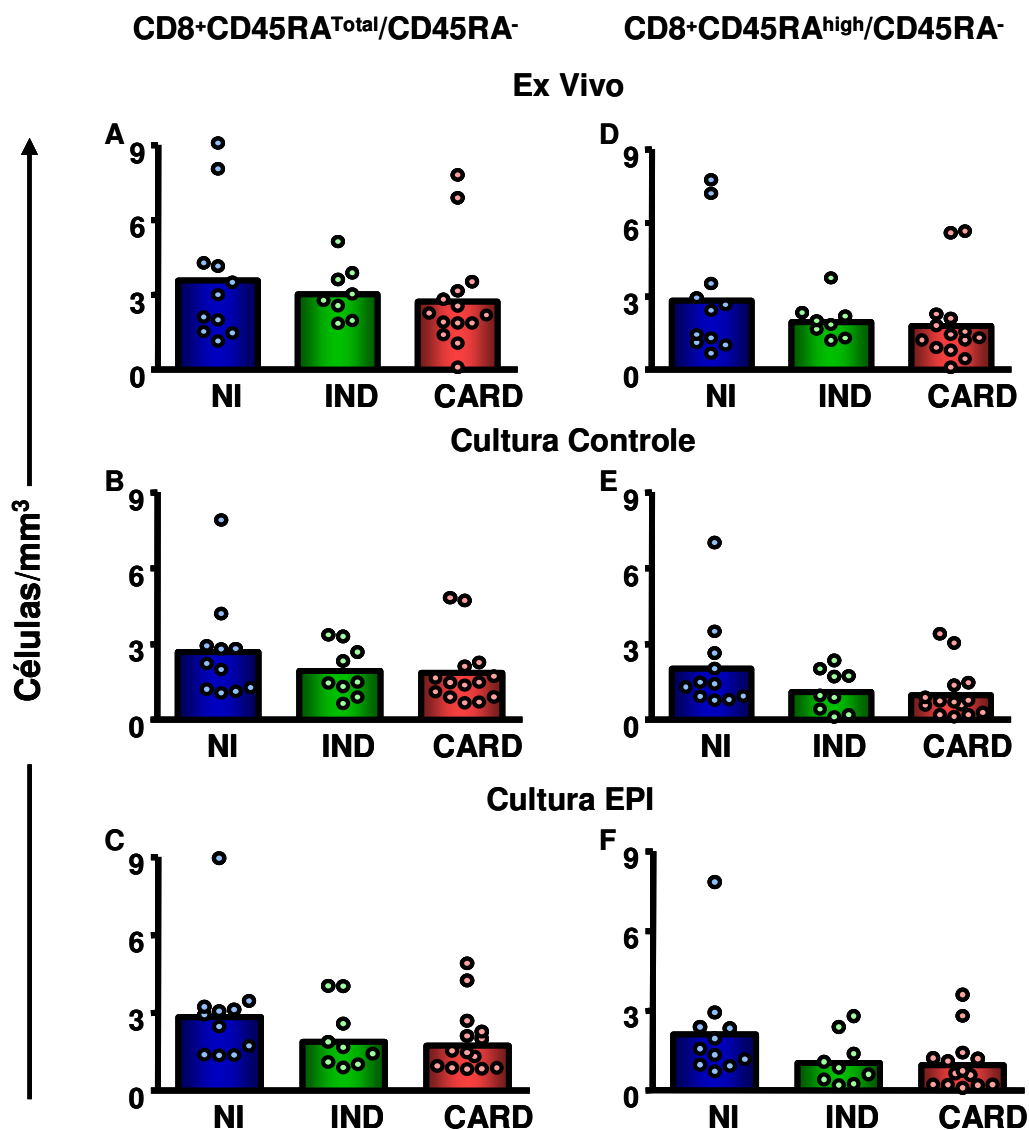
A avaliação dos dados da razão de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup> no contexto *ex vivo* mostra uma significativa diminuição (p<0,05) nos pacientes IND quando comparados aos indivíduos NI (GRAF- 10D). Os dados de razão após não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (GRAF-10E, F).

A análise dos resultados obtidos pela razão das células T CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>Total</sup>/CD45RA<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CD45RA<sup>-</sup> não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de pacientes chagásicos e o grupo de indivíduos NI, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-11).



**GRÁFICO 10-** Avaliação da razão de células T  $CD4^+CD45RA^{Total}/CD45RA^-$  e  $CD4^+CD45RA^{high}/CD45RA^-$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

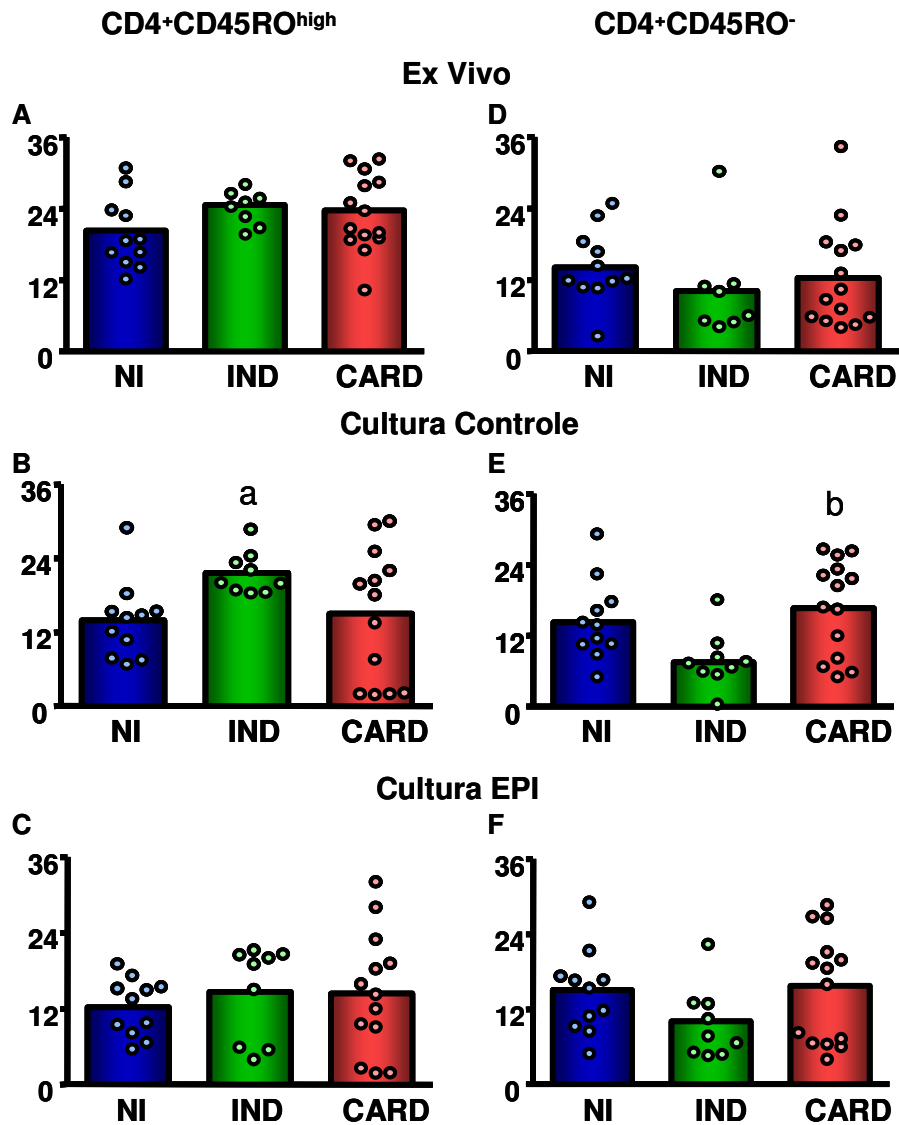


**GRÁFICO 11-** Avaliação da razão de células T  $CD8^+CD45RA^{Total}/CD45RA^-$  e  $CD8^+CD45RA^{high}/CD45RA^-$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

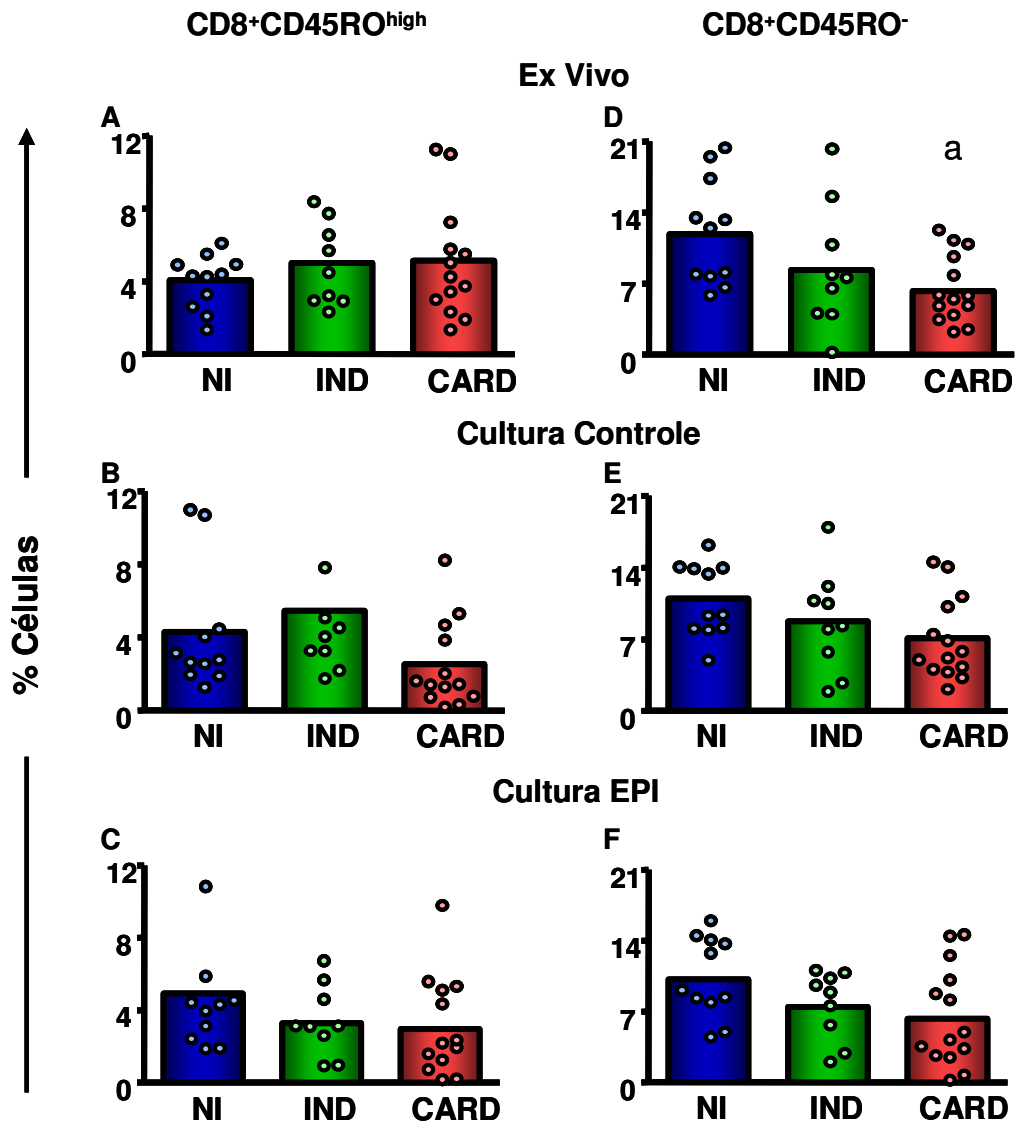
Os resultados apresentados na Figura 12 mostraram que a expressão de CD45RO<sup>high</sup>, molécula expressa por linfócitos de memória, por células T CD4<sup>+</sup> não apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, nos contextos *ex vivo* e em cultura de sangue total (GRAF-12A,B, C). Apesar de o grupo CARD apresentar uma tendência a um maior percentual dessas células no contexto *ex vivo*, quando comparado aos outros grupos (GRAF-12A) esta diferença não se mostrou significativa. Os dados do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>, após cultura sem estímulo mostraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo IND quando comparado ao grupo NI (GRAF-12C). Não foi observada diferença significativa no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, células virgens, nos contextos *ex vivo* e após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-12D, F). Porém, o grupo CARD apresentou percentual significativamente maior ( $p < 0,05$ ) dessas células em relação ao grupo IND (GRAF 12-E).

Quando avaliados os dados da expressão de CD45RO<sup>high</sup> por células T CD8<sup>+</sup>, não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes IND e CARD e indivíduos NI, tanto *ex vivo* como em cultura *in vitro* (GRAF-13A,B, C), apesar do grupo CARD apresentar tendência a um maior percentual dessas células *ex vivo*, quando comparado aos outros grupos (GRAF-13A). Após cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI, os pacientes CARD apresentam diminuição do percentual dessas células (GRAF-13B, C). Os dados mostraram uma significativa diminuição ( $p < 0,05$ ) das células CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> nos pacientes CARD quando comparados aos indivíduos NI no contexto *ex vivo* (GRAF-13D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados quanto ao percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> foram avaliados após cultura *in vitro* (GRAF-13E, F).



**GRÁFICO 12-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



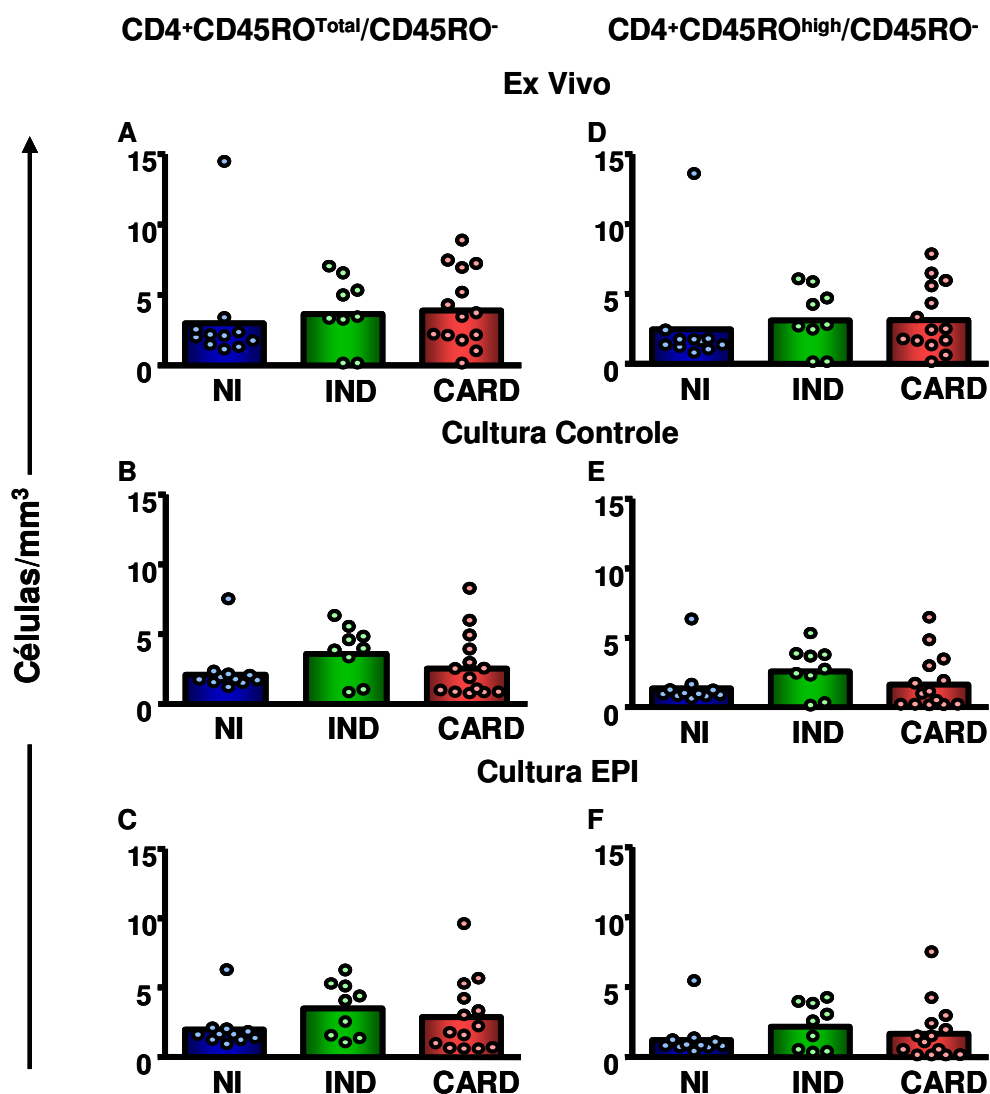
**GRÁFICO 13-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

Os Gráficos 14 e 15 mostram os resultados da análise da razão entre células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos celulares CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup>, sendo que a população CD45RO<sup>Total</sup> representa a soma das subpopulações CD45RO<sup>high</sup> e CD45RO<sup>low</sup>, CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup>. A análise dos dados não mostra nenhuma diferença significativa na proporção do valor absoluto CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> entre os grupos estudados, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-14).

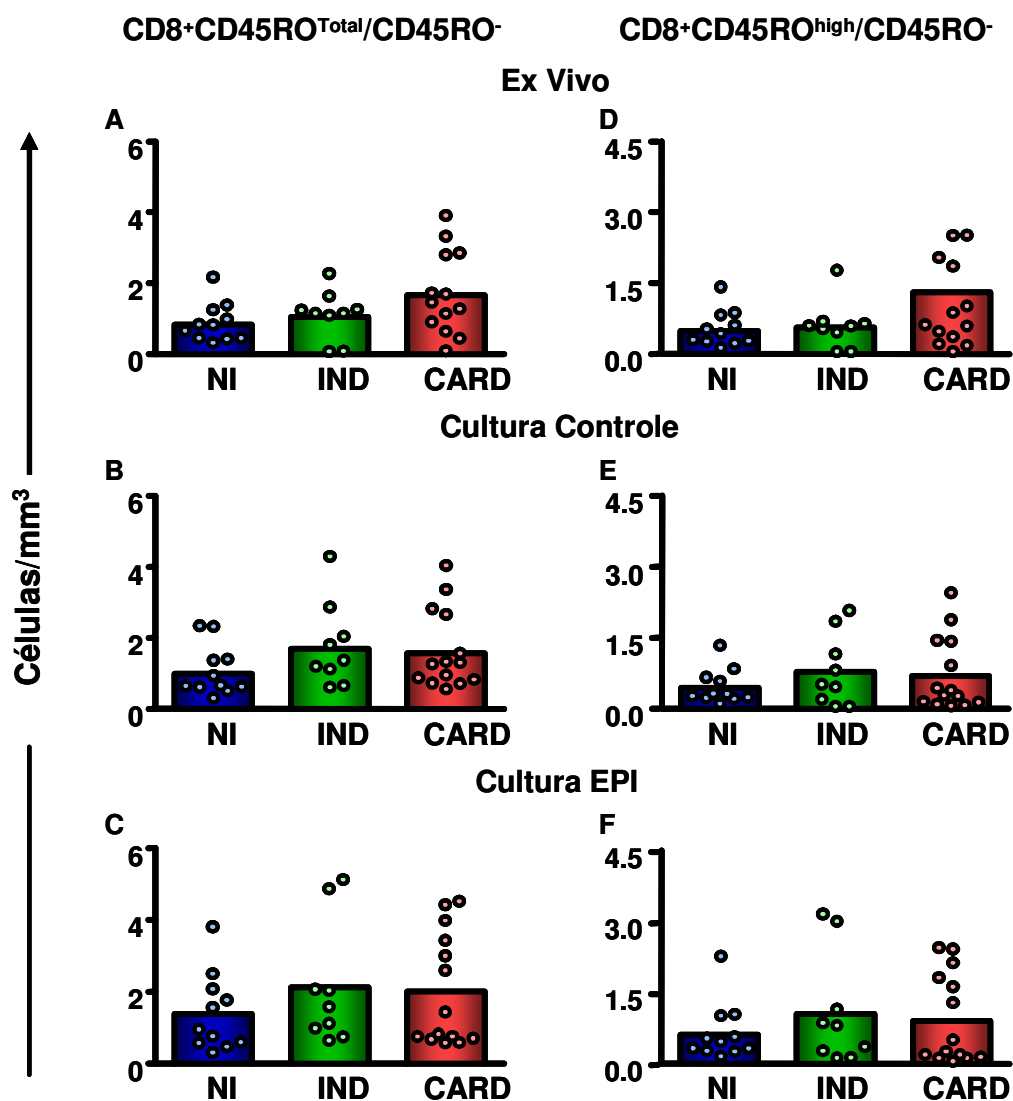
A avaliação dos dados da razão de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>(total)</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> não apresentou diferença significativa entre os grupos CARD, IND e NI nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-15).





**GRÁFICO 14-** Avaliação da razão de células T  $CD4^+CD45RO^{Total}/CD45RO^-$  e  $CD4^+CD45RO^{high}/CD45RO^-$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 15-** Avaliação da razão de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>Total</sup>/CD45RO<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>/CD45RO<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

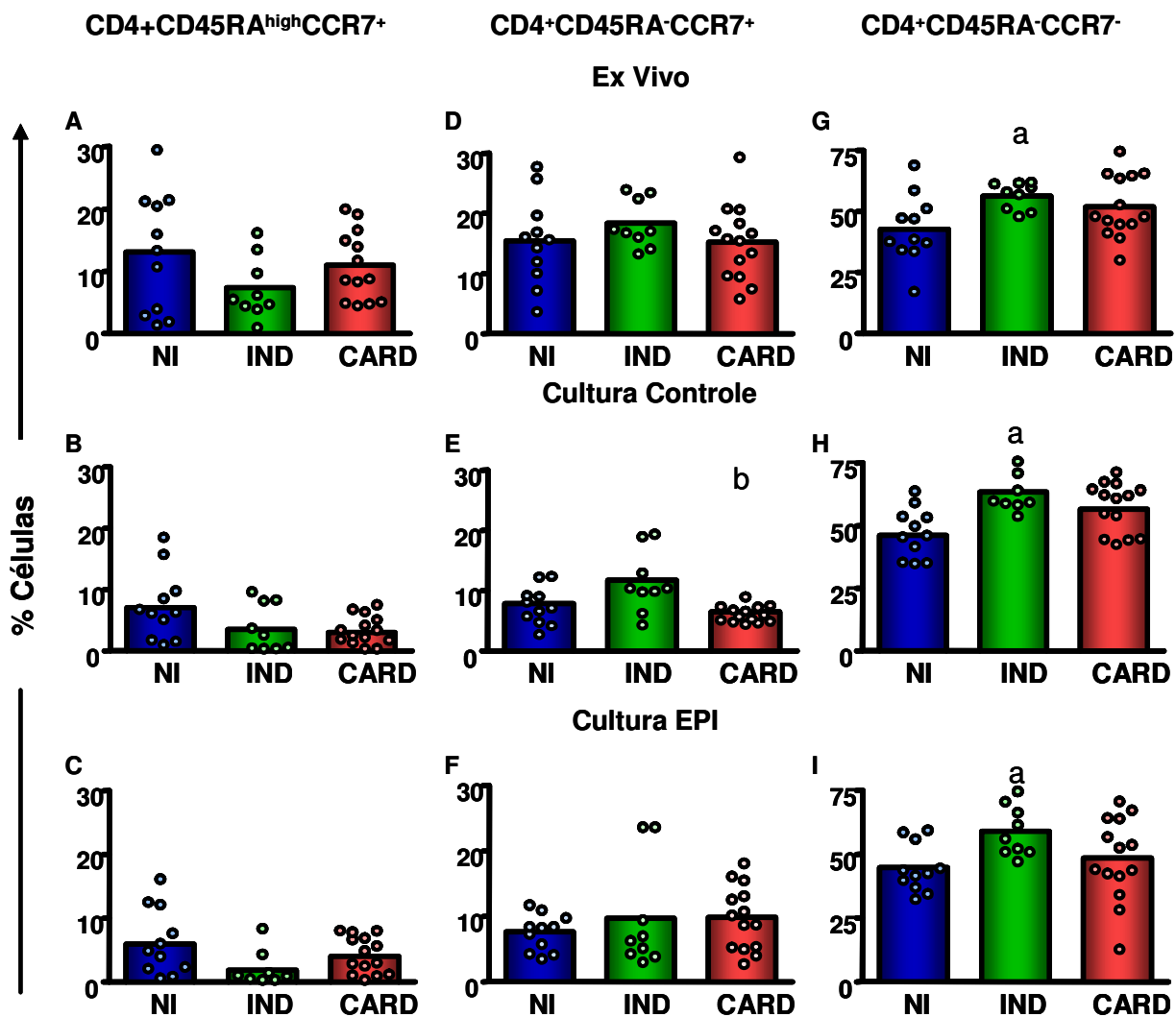
#### **4- Expressão das moléculas co-estimulatórias/adesão CD45RA/CCR7 e CD45RO/CCR7 por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores de doença de Chagas e indivíduos não infectados.**

A tripla marcação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico com as moléculas CD45RA, CD45RO e CCR7 nos permitem avaliar as vias de recirculação dos linfócitos: o percentual de células que estão em migração tanto para órgãos linfóides secundários quanto para foco inflamatório. Mas, principalmente, podem ajudar a distinguir as células de memória em duas sub-populações, resultado da seleção de sobrevivência das células efetoras e intermediárias geradas na resposta primária que se encontram em diferentes estágios de diferenciação (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000), sendo: 1- células de memória central (T<sub>CM</sub>), capazes de migrarem para linfonodos, possuem limitada função efetora, e se transformam em células de memória efetora após a resposta secundária, e 2- células de memória efetora (T<sub>EM</sub>), capazes de migrarem para foco inflamatório, produzem citocinas rapidamente, porém, possuem pouca capacidade proliferativa.

A análise dos dados mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na expressão de CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, nos contextos *ex vivo* e cultura celular *in vitro* (GRAF-16A,B, C). Quanto à avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos nos contextos *ex vivo* e *in vitro* na presença de EPI (GRAF-16D, F). Contudo, após cultura na ausência de antígenos de EPI, foi observada uma diminuição significativa (p<0,05) no percentual dessas células no grupo CARD quando comparado ao grupo IND (GRAF-16E). Os dados mostraram um aumento significativo no percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> em sangue total de pacientes IND quando comparado a indivíduos NI, (p<0,05) tanto *ex vivo* como *in vitro* na presença de EPI ou sem estimulação ) (p<0,01) (GRAF-16H).

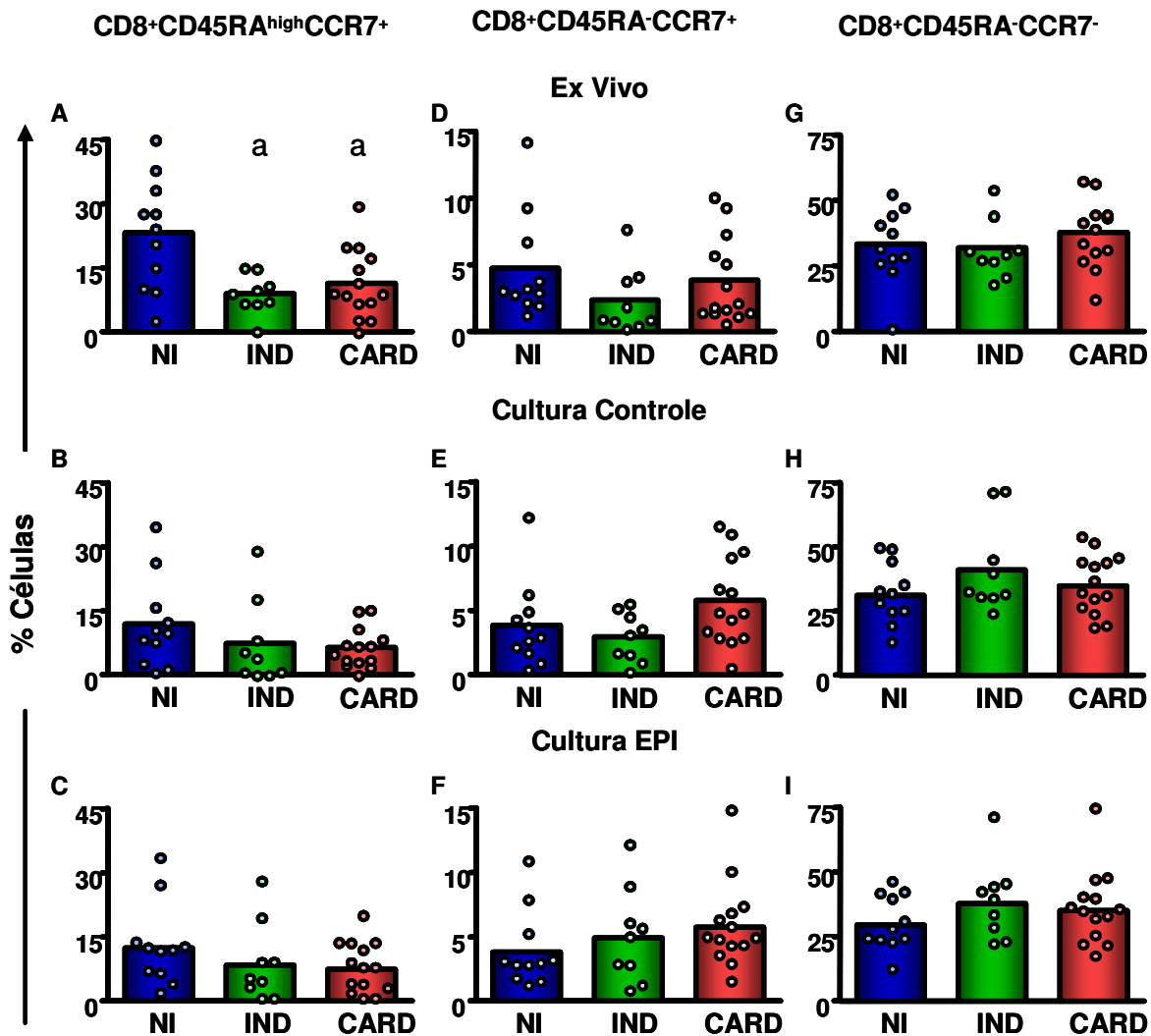
Em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os dados mostraram uma diminuição significativa (p<0,05) na expressão do fenótipo CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> por sangue total de pacientes portadores das forma clínicas IND e CARD em relação aos indivíduos NI quando avaliados no contexto *ex vivo* (GRAF-17A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados quando os dados foram avaliados após cultura na ausência e na presença

de antígenos de EPI (GRAF-17B, C). A análise dos dados relativos ao percentual de células  $CD8^+CD45RA^-CCR7^+$ , não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados nos tanto *ex vivo*, como na presença de antígenos de EPI ou em culturas controle (GRAF-17D, E, F). Também não foram observadas diferenças significativas quanto à análise dos dados do percentual de células  $CD8^+CD45RA^-CCR7^-$  entre os grupos, nos contextos *ex vivo* e cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-17G,H, I).



**GRÁFICO 16-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



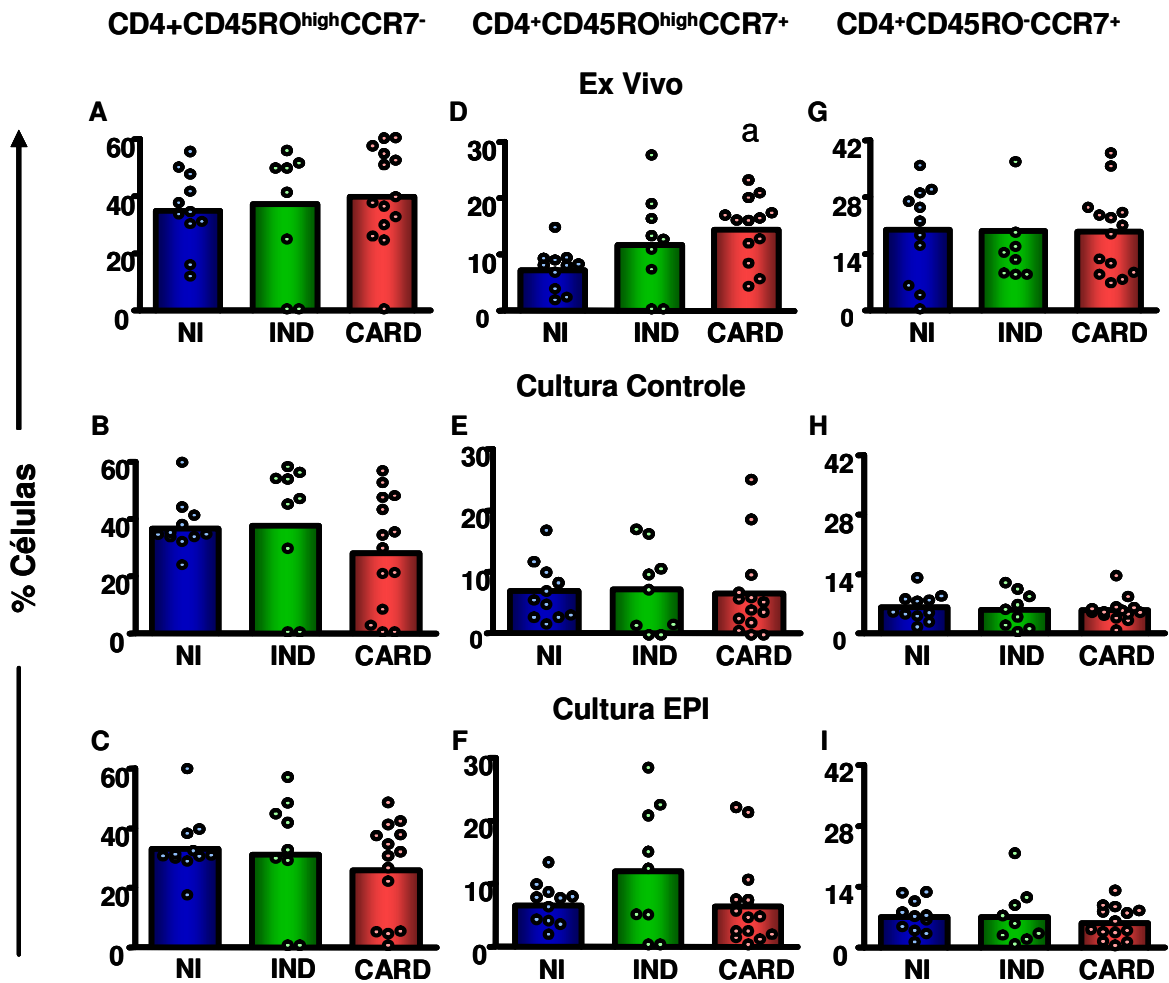
**GRÁFICO 17-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>/CCR7<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

A análise dos dados de células  $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^-$  não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados (GRAF-18A,B, C), porém o grupo de pacientes CARD apresenta uma tendência a diminuir o percentual dessas células após cultura *in vitro*, quando comparado aos grupos IND e NI (GRAF-18B, C). A avaliação do percentual de células T  $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^+$  mostrou que pacientes CARD apresentam percentual significativamente menor desta sub-população *ex vivo* ( $p<0,05$ ) quando comparado aos indivíduos NI (GRAF-18D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantivas quanto as análises dessas células após cultura (GRAF-18E,F).

Quando avaliamos o percentual de células T  $CD8^+CD45RO^{high}CCR7^-$ , observamos uma tendência de aumento do percentual no grupo CARD no contexto *ex vivo* (GRAF-19A) e uma diminuição do percentual celular após cultura *in vitro* (GRAF-19B, C) quando comparado aos grupos IND e NI, porém não foi observada nenhuma diferença significativa. A análise dos dados da expressão do fenótipo  $CD45RO^{high}CCR7^+$  por células  $CD8^+$ , os grupos IND e CARD apresentaram percentual significativamente maior ( $p<0,05$ ) e ( $p<0,001$ ) quando comparado ao grupo NI (GRAF-19D). A avaliação dessas células após cultura não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, (GRAF-19E, F).

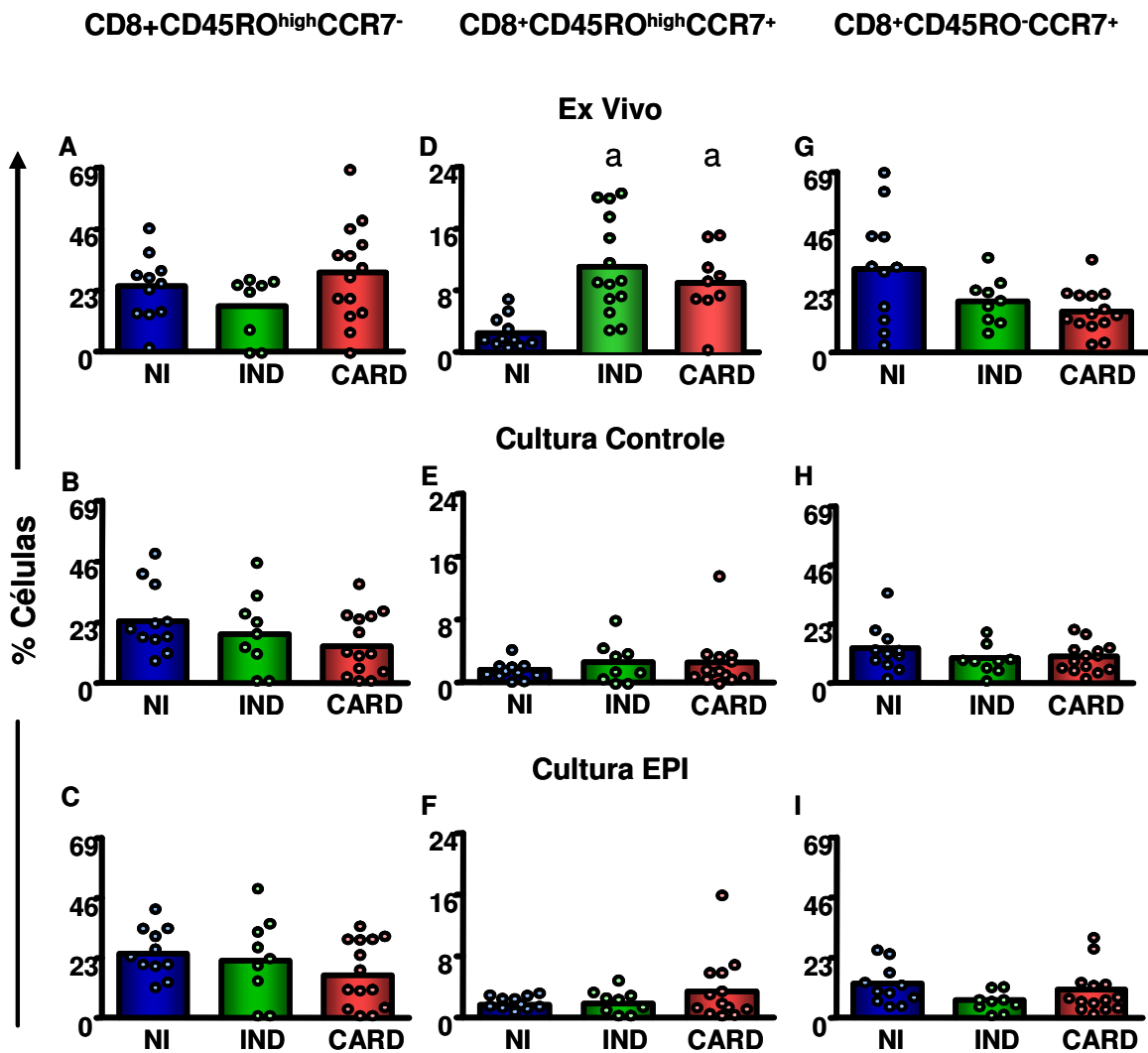
A análise das células T  $CD8^+$  apresentando os fenótipos  $CD45RO^-CCR7^+$  nos contextos *ex vivo* e após cultura *in vitro* não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (GRAF-19G,H, I). Entretanto, os grupos IND e CARD apresentaram um diminuição do percentual dessas células no contexto *ex vivo* (GRAF-19G).



**GRÁFICO 18-** Avaliação do percentual de células T  $CD4^+CD45RO^{high}/CCR7^-$ ,  $CD4^+CD45RO^{high}CCR7^+$  e  $CD4^+CD45RO^-/CCR7^+$  presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).





**GRÁFICO 19-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>/CCR7<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

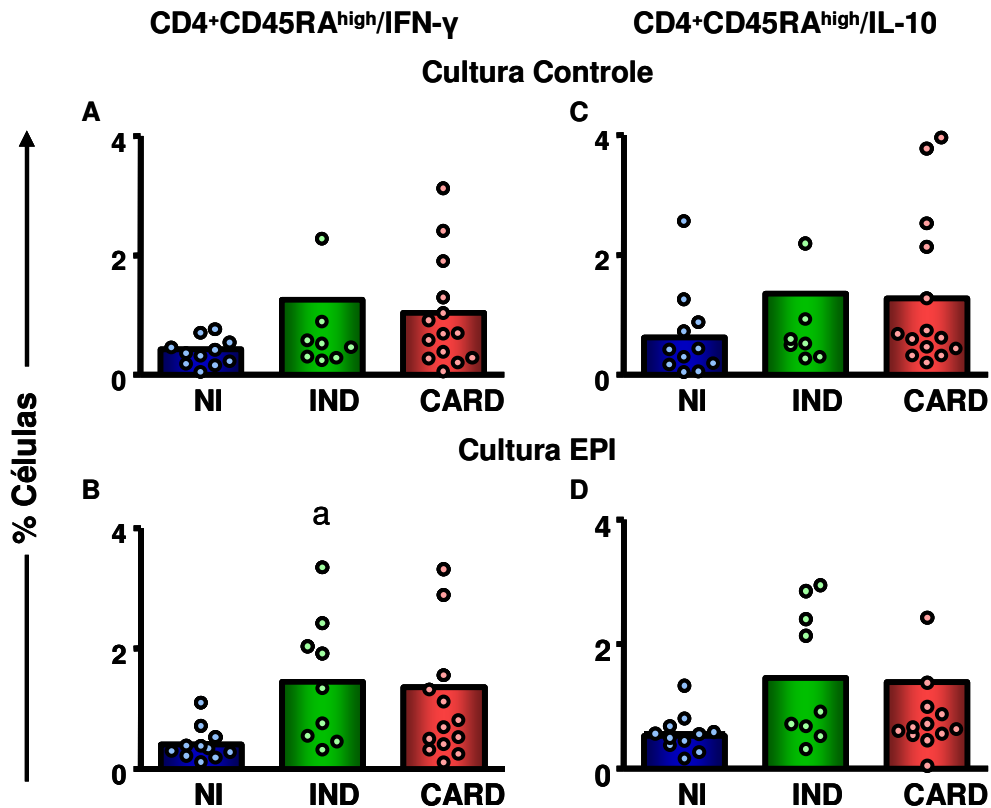
Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

**5- Expressão de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-10) por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentando o fenótipo celular CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> no sangue periférico de indivíduos portadores de doença de Chagas e não infectados**

A presença das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando CD45RA<sup>high</sup> e CD45RO<sup>high</sup> foi avaliada nos grupos IND, CARD e NI na ausência ou presença de estimulação *in vitro* por antígenos de EPI.

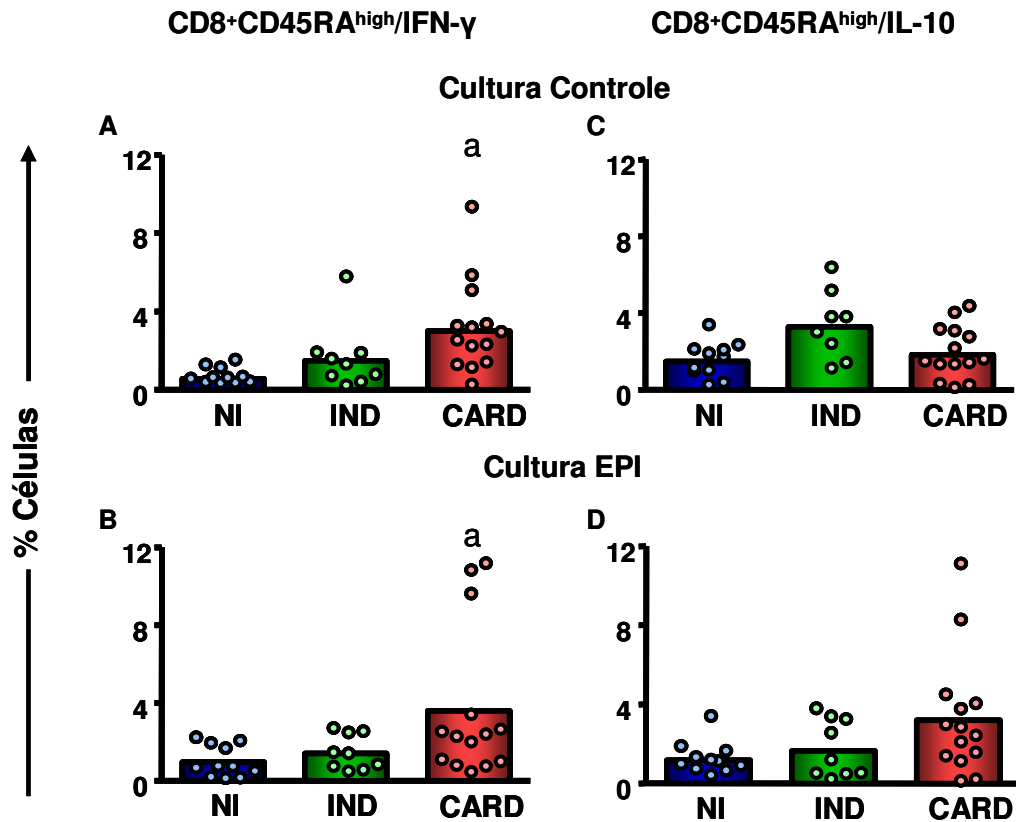
A análise dos dados mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> em sangue total de pacientes IND em relação aos indivíduos NI, quando avaliamos em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-20B). Não foi observada diferença estatística quando analisamos essas células em cultura na ausência de antígenos de EPI (GRAF-20A). Quanto à expressão da citocina IL-10 por células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em cultura de sangue total (GRAF-20C, D).

Além disso, os dados mostram que pacientes CARD apresentaram percentual significativamente maior ( $p < 0,001$ ) de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> expressando IFN- $\gamma$  em culturas controle (GRAF-21A), que é significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-21B), quando comparado com indivíduos NI. Não foram observadas diferenças significativas quando avaliamos o percentual de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> IL-10<sup>+</sup>, em cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI (GRAF-21C, D).



**GRÁFICO 20-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



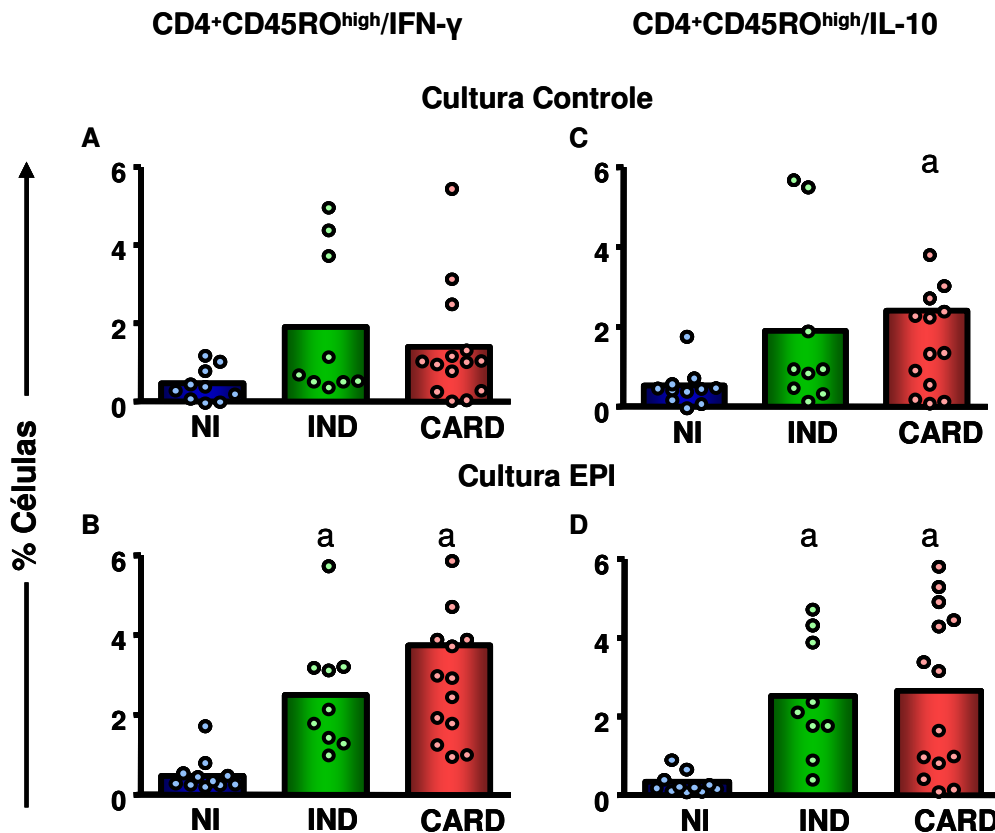
**GRÁFICO 21-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

A análise dos dados mostrou um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de células  $CD4^+CD45RO^{high}$  expressando  $IFN-\gamma$  por sangue total de pacientes IND em relação aos indivíduos NI, após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22B). O mesmo sendo observado para os pacientes CARD em relação aos indivíduos NI, após cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22B). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados após cultura na ausência de estímulo antigênico (GRAF-22A).

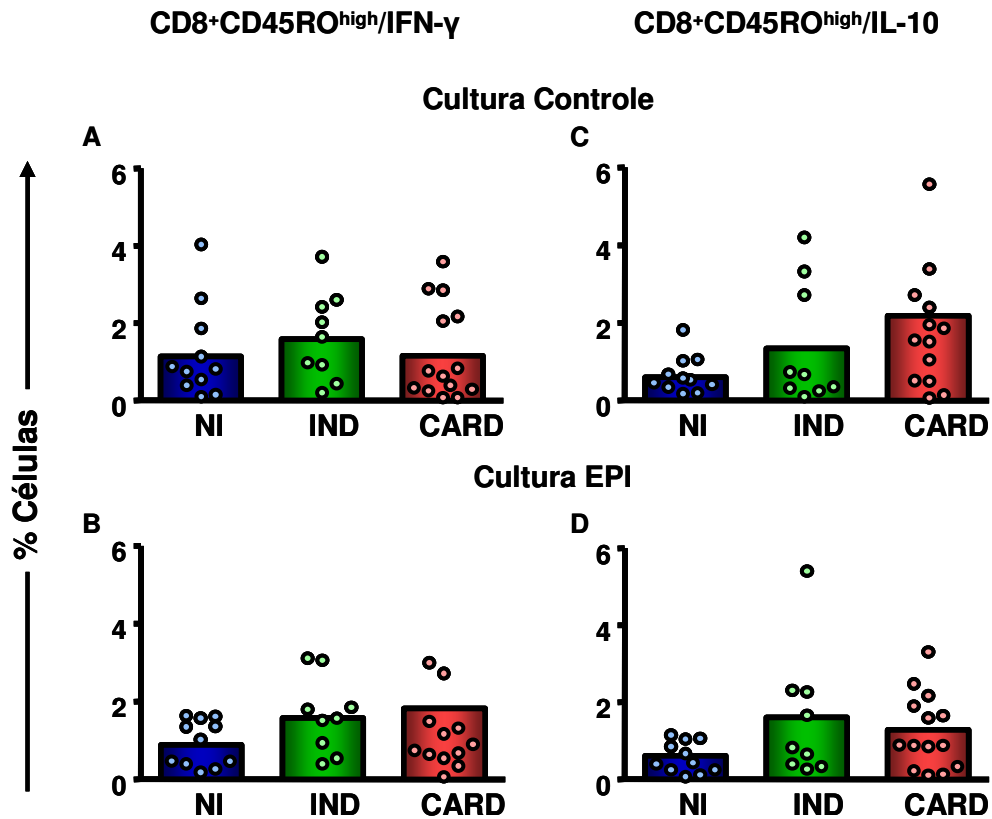
Quanto à análise das células T  $CD4^+CD45RO^{high}IL-10^+$ , observa-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do percentual dessas células em pacientes CARD quando comparado aos indivíduos NI em cultura na ausência de estímulo antigênico (GRAF-22C). Os dados mostraram que há um percentual significativamente maior ( $p < 0,01$ ) de linfócitos T  $CD4^+CD45RO^{high}$  em pacientes IND e CARD positivos para  $IL-10^+$  em cultura na presença de antígenos de EPI (GRAF-22D).

A análise dos dados de expressão das citocinas  $IFN-\gamma$  e  $IL-10$  por células T  $CD8^+CD45RO^{high}$  não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados, após cultura *in vitro* (GRAF-23).



**GRÁFICO 22-** Avaliação do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).



**GRÁFICO 23-** Avaliação do percentual de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e indivíduos não infectados.

Linfócitos presentes no sangue periférico de indivíduos NI, IND e CARD foram avaliados no contexto *ex vivo*, na ausência (Cultura Controle) e presença (Cultura EPI) de antígenos solúveis de EPI. Os resultados foram expressos em barras, representando as medianas, e em símbolos, os valores individuais. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras a e b (correspondentes aos grupos NI e IND, respectivamente).

## **DISCUSSÃO**



A infecção do hospedeiro pelo *Trypanosoma cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos que levam ao reconhecimento do parasito e ao desenvolvimento da resposta imune inata e específica. A lesão tecidual induzida pelo parasito tem continuidade ao longo do desenvolvimento da resposta imune que também aciona os mecanismos imunorreguladores. Esse quadro pode levar à persistência do patógeno e à destruição dos tecidos do organismo. No entanto, evidências em modelo experimental e no homem mostram que os mecanismos são ainda pouco definidos apresentando inclusive controvérsias quanto à sua natureza na agressão tecidual.

Embora a resposta imune participe como componente fundamental no desenvolvimento da miocardiopatia chagásica crônica, a persistência do parasito parece ser requerida para sustentar esse mecanismo de agressão imune (SOARES *et al.*, 2001). De fato, a infecção pelo *T. cruzi* causa alterações significativas no sistema imune, como a ativação policlonal e a imunossupressão (MINOPRIO *et al.*, 1986; 1987, D'IMPERIO LIMA *et al.*, 1986) verificada na fase aguda, podendo assim alterar os processos de regulação característicos da forma crônica assintomática.

Na fase crônica, a resposta imune montada contra diferentes patógenos pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, incluindo a produção de citocinas por células da imunidade inata. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação ou desenvolvimento da miocardite chagásica principalmente quando se avalia a relação entre a importância da persistência do parasito neste processo ou se este é um evento puramente mediado pela resposta imune dependente da genética do hospedeiro.

Os mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento e acúmulo de células inflamatórias para o tecido cardíaco durante a infecção pelo *T. cruzi* ainda são pouco esclarecidos. Para tentarmos elucidar essa questão, avaliamos a expressão (CD62L<sup>high</sup>) e perda (CD62L<sup>-</sup>) da molécula CD62L. Esta molécula tem participação funcional na ativação e migração de células T, como demonstrado em outros estudos (SPRINGER, 1994, SPRENT *et al.*, 1997). Nesta dissertação avaliamos a expressão dessa molécula por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas IND e CARD da doença de Chagas. Os dados mostram que pacientes IND apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> quando comparado aos

pacientes CARD e indivíduos NI, no contexto *ex vivo*, e significativamente menor do que o grupo CARD após cultura sem estímulo. Isto sugere que essas células não teriam a capacidade de interação com o endotélio vascular e, portanto, migrariam para os tecidos, dificultando sua recirculação para os órgãos linfóides secundários, onde não atuariam sobre a ativação dos linfócitos efetores. Neste mesmo contexto, observamos que os pacientes portadores da forma clínica CARD apresentaram um percentual significativamente maior de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> quando comparado aos pacientes IND e indivíduos NI quando as células foram avaliadas *ex vivo*, sugerindo que elas poderiam estar envolvidas na exacerbação da resposta imune ao parasito e conseqüentemente no desenvolvimento da miocardite chagásica, através da morte celular induzida por ativação. É interessante notar que ALBAREDA *et al.* (2005) mostraram que células de pacientes portadores da forma clínica CARD apresentaram um maior percentual de células CD8<sup>+</sup> sofrendo apoptose. Baseando em nossos resultados, acreditamos que o mesmo poderia estar acontecendo com as células CD4<sup>+</sup>. O grupo CARD também apresentou proporção estatisticamente menor de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> quando comparado ao grupo NI no contexto *ex vivo*. Já em cultura na presença de EPI, a razão de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>/CD62L<sup>-</sup> também foi menor, confirmando os resultados apresentados anteriormente demonstrando que pacientes CARD apresentaram mais células ativadas do que os indivíduos NI. Estudo em modelo experimental mostrou que células T de camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentam diminuição significativa de CD62L, sugerindo que estas células seriam funcionalmente de memória (MARTIN & TARLETON, 2005).

A análise dos dados de células T CD8<sup>+</sup> apresentando os fenótipos CD62L<sup>high</sup> e CD62L<sup>-</sup> não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa, nos contextos *ex vivo* ou em cultura. Estes achados são interessantes uma vez que reforçam que estas células poderiam sofrer ativação rapidamente e migrariam para o foco inflamatório, não sendo encontradas em grande quantidade no sangue periférico. DOS SANTOS *et al.* (2001) mostraram que a maioria das células CD4 e CD8 em infiltrados cardíacos, não expressa ou expressa pouco CD62L, ou seja, há mais células ativadas no foco inflamatório, e que há mais células T CD8<sup>+</sup> no tecido que estão ativadas (cardíaco e esplênico) do que células T CD4<sup>+</sup>. Vários trabalhos mostram que células T ativadas presentes no tecido cardíaco de camundongos infectados pelo *T. cruzi* expressam LFA-1 (CD11a,CD18). Portanto, a

interação LFA-1/ICAM-1 parece contribuir para o estabelecimento do dano tecidual (DOS SANTOS *et al.*, 2001). Estudos realizados em lesões do coração de pacientes portadores da doença de Chagas mostraram que a maioria dos linfócitos apresenta alta expressão de LFA-1, sugerindo que a expressão desta molécula juntamente com a expressão de CD44 e VLA-4, moléculas importantes para a ativação celular contribui para a progressão da reação inflamatória local (REIS *et al.*, 1993).

Além de marcador da ativação celular, muitos trabalhos consideram que a expressão da molécula CD62L seja essencial para migração de linfócitos para os linfonodos, juntamente com a expressão de CCR7 (BRADLEY *et al.*, 1994, BUTCHER *et al.*, 1996, GUNN *et al.*, 1999, GUARDA *et al.*, 2007). CCR7 é um receptor de quimiocina importante no controle da migração celular para focos inflamatórios. Portanto, a expressão do receptor de quimiocina CCR7 foi avaliada a fim de se conhecer o perfil de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na doença de Chagas para entendermos melhor se as células presentes no sangue periférico estão migrando para os linfonodos, células CCR7<sup>+</sup> ou para o foco inflamatório, células CCR7<sup>-</sup>. A avaliação dos dados mostrou que pacientes portadores da forma clínica IND possuem um percentual significativamente menor de células CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> em relação aos pacientes CARD e indivíduos NI tanto quando avaliadas *ex vivo* como após cultura na presença de antígenos de EPI, e significativamente menor que indivíduos NI. Portanto, pacientes portadores da forma clínica IND apresentaram menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> migrando para órgãos linfóides secundários do que pacientes CARD e indivíduos NI. Esses achados corroboram com os de ZIEGLER *et al.* (2007), que descrevem que além da função de migração celular, a molécula CCR7 possui a função de modulação da proliferação celular, experimentos realizados em nosso laboratório (dados não mostrados) mostram que células do sangue periférico de pacientes IND apresentaram maior proliferação celular, quando comparando aos outros grupos. ZIEGLER *et al.* (2007) ainda descrevem que CCL19 é capaz de desacelerar continuamente a divisão de células T CCR7<sup>+</sup>, o que seria consistente com uma proliferação celular debilitada.

Quando avaliamos os dados relativos a análise da população de células CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> foi observado que, *ex vivo*, o grupo de pacientes CARD apresentou um percentual significativamente menor dessa população celular do que o grupo IND, indicando que há um menor percentual de células migrando para SLO's. Pode-se perceber que o percentual

de células TCD8<sup>+</sup> primadas (CCR7<sup>-</sup>) é superior do que de células não primadas (CCR7<sup>+</sup>) em células de pacientes portadores da forma clínica CARD, sugerindo que há maior número de células TCD8<sup>+</sup> migrando para o tecido cardíaco nesse grupo. Porém, a avaliação dos dados relacionados somente ao marcador CCR7 pode ser inconclusiva, talvez pelo fato da molécula CCR7 não ser um bom marcador de evolução clínica da doença, ou ainda o tamanho amostral desse trabalho ser insuficiente para tal avaliação. Portanto, é de grande importância a avaliação do perfil de maturação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além dos marcadores de migração e ativação, já que a recirculação linfocitária depende da expressão de uma série de moléculas por estas células.

A maioria das células T maduras periféricas estão em repouso e podem ser divididas em células virgens e de memória. Esta divisão é baseada na resposta a antígenos em uma resposta secundária. Além da atividade funcional, vários marcadores foram identificados que permitem distinguir essas populações. As células T virgens, que não encontraram antígeno, expressam altos níveis de CD45RA e L-selectina em sua superfície, e não expressão os marcadores de ativação CD25, CD44 ou CD69 (LINTON *et al.*, 1997). Ao contrário, as células T de memória, que foram previamente estimuladas pelo antígeno uma ou várias vezes, expressam altos níveis de CD45RO e baixos níveis de L-selectina (CROFT *et al.*, 1992).

A análise de CD45, uma tirosina fosfatase transmembrana essencial na ativação de célula T, foi realizada em sangue total de pacientes portadores das formas IND e CARD e de indivíduos NI. Os resultados mostraram que o percentual de células expressando níveis elevados de CD45RA (CD45RA<sup>high</sup>) de pacientes IND foi estatisticamente menor do que em células dos indivíduos NI no contexto *ex vivo*. Apesar de não ser encontrada diferença estatisticamente significativa entre os CARD e NI, pode-se observar que há uma tendência a menor percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> em pacientes na fase crônica da doença de Chagas. A avaliação dos dados de células T CD8<sup>+</sup> expressando níveis elevados de CD45RA (CD45RA<sup>high</sup>) mostraram que os pacientes portadores da forma crônica da doença de Chagas possuem uma tendência a apresentar um menor percentual dessas células *ex vivo*, enquanto após cultura é encontrada uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo NI. Esses dados são confirmados por DUTRA *et al.* (1994), que observaram o mesmo perfil da expressão da molécula CD45RA<sup>high</sup>, tanto em células T

CD4<sup>+</sup> quanto em CD8<sup>+</sup>, quando avaliaram sangue total de pacientes na fase crônica da doença. Em modelo experimental, GRISOTTO *et al.* (2001) demonstraram que células T CD8<sup>+</sup> de baço de camundongos apresentavam menor expressão de CD45RA comparado a células de camundongos do grupo controle. A redução da expressão de CD45RA é resultado da troca isoforma de baixo peso molecular de A para C de CD45 que se associa facilmente com o complexo TCR (DIANZANI *et al.*, 1990, LEITEMBERG *et al.*, 1996; 1999), e ocorre em linfócitos T podendo facilitar a sinalização de TCR. A isoforma C permite a ativação celular por menores quantidades de antígeno e de co-estimulação do que é necessário para a isoforma A (IEZZI *et al.*, 1998). A avaliação da razão do valor absoluto mostrou que o grupo IND possui mais células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> do que CD45RA<sup>Total</sup> ou CD45RA<sup>high</sup> no contexto *ex vivo*, confirmando os achados na avaliação do percentual dessas células significando que as células T de pacientes portadores da forma crônica necessitam de menor concentração antigênica para serem estimuladas.

A avaliação de células T CD4<sup>+</sup> expressando CD45RO<sup>high</sup> mostrou que o grupo IND possui percentual maior quando comparado ao grupo NI nas culturas sem estímulo antigênico. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, pode-se observar que os grupo IND e CARD apresentaram uma grande variação com um numero grande de indivíduos com um maior percentual de células de memória do que o grupo NI nos contextos *ex vivo* e após cultura na presença de antígenos de EPI. Diversos estudos mostram como a alteração da expressão de CD45RO pode provocar profundos efeitos nas funções do sistema imune e desenvolvimento de doenças (DAWES *et al.*, 2006, HERMINSTON *et al.*, 2003, PENNINGER *et al.*, 2001, DIANZANI *et al.*, 1990, LEINTEMBERG *et al.*, 1996; 1999). ANTONELLI *et al.* (2004) defendem que os níveis de expressão de CD45RO podem ser usados como prognóstico da atividade intensa das células T antígeno-específicas em responder à infecção por *Leishmania* tanto pela produção de IFN- $\gamma$  quanto de IL-10.

As células T de memória podem ser divididas em duas sub-populações, baseando-se em suas heterogeneidades, funções efetoras e resposta ao antígeno ou a citocinas. De acordo com o modelo proposto por LANZAVECCHIA e SALLUSTO (2000) a memória protetora é mediada por células de memória efetoras (T<sub>EM</sub>), que migram para tecidos periféricos inflamados e possuem imediata função efetora, enquanto a memória reativa é

mediada pelas células de memória central ( $T_{CM}$ ), que migram para órgãos linfóides secundários e possuem nenhuma ou pouca função efetora, porém, proliferam e se diferenciam rapidamente em células efetoras em resposta à estimulação antigênica (SALLUSTO *et al.*, 2004).

As células  $T_{CM}$  humanas expressam CD45RO juntamente com as moléculas CCR7 e CD62L, dois receptores importantes para o extravasamento para a migração das células T para órgãos linfóides secundários (CAMPBELL *et al.*, 1998, FORSTER *et al.*, 1999). Quando comparada às células T virgens,  $T_{CM}$  possuem alta sensibilidade à estimulação antigênica, são menos dependentes da co-estimulação e fornecem “feedback” estimulatório eficiente para células dendríticas e células B.

Neste trabalho foi avaliada a expressão das moléculas CD45RA e CD45RO juntamente com o receptor de quimiocina CCR7, a fim de se conhecer o perfil das populações virgem,  $T_{CM}$  e  $T_{EM}$  em sangue total de pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas e os comparados aos de indivíduos não infectados. A avaliação dos dados de células T  $CD4^+$  virgens, ou seja, apresentando o fenótipo  $CD45RA^{high}CCR7^+$ , demonstrou que os grupos de pacientes portadores da fase crônica IND e CARD apresentaram um percentual menor dessas células quando comparado ao grupo NI, tanto no contexto *ex vivo* como em cultura. Esses resultados corroboram com os dados encontrados neste trabalho, onde a avaliação somente da molécula  $CD45RA^{high}$  mostra que esses pacientes possuem menor percentual de células virgens.

Quanto à avaliação das células T  $CD8^+CD45RA^{high}CCR7^+$ , mais uma vez os grupos IND e CARD apresentaram percentual significativamente menor dessas células quando comparado ao grupo NI no contexto *ex vivo*. O perfil se mantém semelhante após cultura na ausência e na presença de antígenos de EPI, porém sem diferença significativa. Esses resultados confirmam àqueles apresentados anteriormente, sugerindo que pacientes portadores da fase crônica da doença de Chagas possuem menor percentual de células virgens, sendo ativadas por concentrações menores de antígenos, se ligando mais facilmente ao complexo TCR (GRISOTTO *et al.*, 2001, DIANZANI *et al.*, 1990, LEINTEMBERG *et al.*, 1996, 1999, IEZZI *et al.*, 1998).

Quando avaliadas as células T  $CD4^+$  de memória central apresentando o fenótipo  $CD45RA^+CCR7^+$ , pode-se observar que pacientes CARD apresentaram percentual

significativamente menor dessas células quando comparados aos pacientes IND após cultura celular sem estímulo. O mesmo perfil foi observado no contexto *ex vivo*, porém sem diferença estatisticamente significativa. É importante ressaltar que o grupo IND apresentava a mediana de 20% dessas células no contexto *ex vivo*, sendo que após estimulação dessas células por antígenos solúveis de EPI a mediana passa para 10%, demonstrando a rápida capacidade de se tornarem células efetoras após o reencontro com o antígeno. O domínio extracelular CD45 é altamente polimórfico em vertebrados. Vale ressaltar que as variantes do polimorfismo humano que alteram a expressão da isoforma de CD45 está associada com doenças autoimunes e infecciosas, estabelecendo CD45 como um importante imunomodulador com significativa influência no desenvolvimento da doença (TCHILIAN & BERVERLEY, 2006).

A avaliação das células CD4<sup>+</sup> de memória central, porém apresentando o fenótipo CD45RO<sup>high</sup>CCR7<sup>+</sup>, mostraram que pacientes CARD possuem percentual significativamente maior quando comparados aos indivíduos NI no contexto *ex vivo*. Contudo, após cultura na presença de estímulo, pacientes do grupo IND apresentaram maior percentual dessas células enquanto o grupo CARD apresentou menor percentual dessas. Avaliando a mesma subpopulação dentro do mesmo contexto, agora dentro de células CD8<sup>+</sup>, observa-se que os grupos IND e CARD apresentaram percentual significativamente maior dessas células do que o grupo NI.

Quando avaliadas as células T CD8<sup>+</sup> de memória efetora, apresentando o fenótipo CD45RO<sup>high</sup>CCR7<sup>-</sup>, observa-se que o grupo CARD apresentou uma tendência a maior percentual dessas células no contexto *ex vivo*. Em modelo experimental, MARTIN & TARLETON (2005) demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas mantêm o fenótipo de T<sub>EM</sub> durante a persistência do *T. cruzi*. Estudos com pacientes infectados por HIV e LCMV (Vírus da Coriomeningite Linfocítica) mostraram um resultado interessante que sugeriam que as células passavam pelo processo de diferenciação: **virgem** → T<sub>CM</sub> → T<sub>EM</sub> (APPAY *et al.*, 2002, CHAMPAGNE *et al.*, 2001). Contudo, outros dados sugerem que as células T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub> na verdade são subpopulações independentes, baseadas no ambiente da geração da citocina ou na região anatômica de ativação e podem ser mantidas independentemente (MASOPUST and LEFRANCOIS, 2003, MANJUNHATH *et al.*, 2001, BARON *et al.*, 2003). Finalmente, outros estudos na infecção por LCMV mostram que as

células  $T_{CM}$  proliferam e/ou convertem para  $T_{EM}$  após a reexposição ao antígeno, conduzindo a um novo modelo de diferenciação da célula T CD8<sup>+</sup>: **virgem** →  $T_{EM}$  →  $T_{CM}$  (WHERRY *et al.*, 2003). Porém os dados neste trabalho sugerem que o modelo de diferenciação seja **virgem** →  $T_{CM}$  →  $T_{EM}$ , como descrito (APPAY *et al.*, 2002, CHAMPAGNE *et al.*, 2001).

As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 têm sido estudadas intensamente na doença de Chagas a fim de se conhecer o perfil de sua secreção, quais as principais populações envolvidas na produção, sua relação com o desenvolvimento da patologia ou regulação da resposta imune. Alguns estudos evidenciam um papel duplo do IFN- $\gamma$  na doença de Chagas (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Esta dupla atividade é observada em diferentes estágios da infecção (aguda e crônica) e sobre um contexto diferente da resposta imune do hospedeiro, principalmente na presença ou ausência de tratamento. Tem-se demonstrado que durante a fase aguda da infecção, o IFN- $\gamma$  pode contribuir para eliminar o parasito, como demonstrado na infecção experimental (MICHAILOWSKY *et al.*, 1998). Por outro lado, durante a fase crônica esta citocina pode exacerbar a resposta imune com uma produção não controlada de IFN- $\gamma$  no tecido cardíaco podendo promover a destruição do miocárdio (TARLETON *et al.*, 1999; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000). SOARES *et al.* (2001) investigaram o papel do IFN- $\gamma$  na patologia da infecção experimental pelo *T. cruzi* utilizando camundongos BALB/c deficientes de IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>), os quais apresentam resposta do tipo 1 acentuada. A infecção destes camundongos com a cepa Colombiana levou a uma menor parasitemia e parasitismo tecidual que a infecção de camundongos selvagens (IL-4<sup>+/+</sup>). Estes achados correlacionaram menor parasitismo tecidual com a produção de IFN- $\gamma$ , uma vez que camundongos IL-4<sup>-/-</sup> apresentavam níveis mais elevados desta citocina que os camundongos IL-4<sup>+/+</sup>. No entanto, camundongos IL-4<sup>-/-</sup> apresentavam uma miocardiopatia mais precoce e mais intensa que os camundongos IL-4<sup>+/+</sup>, sugerindo que o IFN- $\gamma$  tem papel duplo na infecção chagásica: um efeito protetor, controlando o parasitismo e, por outro lado, intensificando a inflamação cardíaca no decorrer da infecção (SOARES *et al.*, 2001). IFN- $\gamma$  é a citocina mais frequentemente identificada em células inflamatórias presentes em tecidos de pacientes chagásicos cardíacos obtidos de autópsias de coração (REIS *et al.*, 1997). Tem sido observado também que pacientes CARD e IND podem produzir níveis diferenciados de IFN- $\gamma$  induzidos por



estímulos relacionados a infecção (ABEL *et al.*, 2001). Assim, estes autores sugerem que um perfil de resposta do tipo 1 (produção vigorosa de IFN- $\gamma$ ) encontrado em linhagens de células do infiltrado inflamatório cardíaco de pacientes apresentando a forma clínica CARD, poderia ter papel importante no desenvolvimento da miocardiopatia. Neste trabalho encontramos uma maior produção de IFN- $\gamma$  em cultura de sangue total de pacientes CARD quando comparados aos demais grupos avaliados, confirmando os achados de nosso grupo onde na fase crônica IFN- $\gamma$  tem sido associado com a patologia cardíaca.

Por outro lado, tem-se demonstrado que a IL-10 apresenta papel importante em antagonizar a atividade de IFN- $\gamma$  na infecção experimental pelo *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1992). Sabe-se que a IL-10 tem atividade inibitória sobre a ativação de macrófagos, incluindo a morte intracelular do *T. cruzi in vitro* mediada por IFN- $\gamma$ . Esta atividade tem sido associada à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1992). GOMES (2002) sugeriu que a produção de IL-10 pode ter um papel importante em regular a resposta excessiva do tipo 1 induzida pelo *T. cruzi*, inibindo a ampliação de danos teciduais causados pela inflamação. Observamos que pacientes IND apresentaram níveis mais elevados de IL-10 em relação aos indivíduos NI e pacientes CARD, corroborando os resultados encontrados por GOMES *et al.* (2003). Assim, a presença de IL-10 nestes indivíduos teria papel importante em proteger o hospedeiro contra uma resposta do tipo 1 desregulada impedindo assim um dano tecidual que poderia ocorrer mais tardiamente.

Contudo, a avaliação da secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi realizada com o objetivo de conhecer o perfil da produção dessas citocinas por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> virgens (CD45RA<sup>high</sup>) e de memória (CD45RO<sup>high</sup>). Quanto à avaliação de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> expressando a citocina IFN- $\gamma$ , pode-se observar que os grupos IND e CARD apresentaram maior percentual dessas células secretando esta citocina quando comparado ao grupo NI após cultura na presença de antígenos de EPI, porém somente o grupo IND apresentou diferença significativa. Podemos observar ainda, que pacientes IND e CARD apresentaram tendência a um maior percentual dessas células secretando IL-10 quando comparado aos indivíduos NI, após cultura.

Quanto à avaliação das células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>, observa-se que o grupo CARD apresentou percentual significativamente maior dessas células secretando IFN- $\gamma$ , após cultura. Apesar de não termos observado diferença estatisticamente significativa, o grupo

IND apresentou um maior percentual dessas células secretando IL-10. BURREAU *et al.* (2002), avaliando PBMC de indivíduos NI estimuladas com antígenos de *L. guyanensis*, demonstraram que células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  são CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, enquanto aquelas produtoras de IL-10 são células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>.

Provavelmente essas células não são “virgens puras” (SWAIN & BRADLEY, 1992), já que elas exercem uma das principais funções efetoras, que é a secreção de citocinas. Sendo assim, é provável que o marcador CD45RA<sup>high</sup> seja insuficiente para identificar as células virgens. As células encontradas neste trabalho talvez estejam em Th0, sendo capazes de produzir um repertório extenso de citocinas, sendo consideradas como células efetoras “primárias”. Esses dados sugerem que a troca da isoforma CD45RA para CD45RO seja de efeito tardio, perdendo outras moléculas de ativação anteriormente a este evento. Outro estudo demonstra que as células virgens T CD4<sup>+</sup> respondem eficazmente ao antígeno, medido pela proliferação e secreção de IL-2 (CROFT *et al.*, 1992).

Nosso grupo também tem demonstrado que na doença de Chagas, pacientes do grupo CARD desenvolvem uma forte resposta contra antígenos do *T. cruzi*, com secreção de altos níveis de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-10 (GOMES *et al.*, 2003). Apesar de observamos que pacientes CARD apresentam mais células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> secretando esta citocina, outros mecanismos que podem estar envolvidos no desenvolvimento da miocardite chagásica precisarão ser estudados em maior detalhe.

A avaliação de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> secretando citocinas mostrou que pacientes IND e CARD apresentaram percentual significativamente maior dessas células secretando IFN- $\gamma$  quando comparado aos indivíduos NI após cultura na presença de EPI. Os grupos IND e CARD também apresentaram maior percentual dessas células secretando IL-10 quando comparando ao grupo NI após cultura. ANTONELLI *et al.* (2004) demonstraram que PBMC de pacientes infectados por *L. braziliensis* apresentavam alta frequência de células T CD4<sup>+</sup> de memória produzindo citocinas, tanto inflamatória (IFN- $\gamma$ ) quanto reguladora (IL-10).

Quanto à avaliação de células T CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> secretando IL-10, observa-se que o grupo CARD apresentou tendência à elevação desse percentual quando comparado aos outros grupos. Isso sugere que a secreção da citocina IL-10 por células CTL's de memória pode não ter um efeito protetor no grupo CARD como tem sido observado em pacientes

IND. Porém, a produção de IL-10 observada nessa população pode não ser suficiente para inibir o efeito do IFN- $\gamma$  secretado por outras populações celulares, como descrito em alguns trabalhos (ABEL *et al.*, 2001, GOMES *et al.*, 2003).

Resumidamente, podemos observar que pacientes IND apresentaram menor expressão de CD62L<sup>high</sup> em células T CD4<sup>+</sup>, enquanto os pacientes CARD apresentaram maior percentual de células ativadas (CD62L). Além disso, pacientes IND apresentaram menor expressão de CCR7<sup>+</sup> em células CD4<sup>+</sup>, enquanto os pacientes CARD apresentaram menor expressão dessa molécula em células CD8<sup>+</sup>. Mostrando que os pacientes IND apresentam menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> migrando para linfonodos, e os pacientes CARD apresentam menor percentual de células T CD8<sup>+</sup> para esses locais.

A avaliação das células virgens e de memória mostra que pacientes IND e CARD apresentaram menor percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> virgens CD45RA<sup>high</sup> e maior percentual de células de memória CD45RO<sup>high</sup> quando comparados a indivíduos NI. Já a avaliação dos dados de T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub> demonstra que pacientes IND apresentaram maior percentual de células T CD4<sup>+</sup> de memória central e efetora e de células T CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub>, porém pacientes CARD além de apresentarem percentual maior de células T CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>, possuem maior número de células T CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>. Isso sugere que as células T CD8<sup>+</sup> de memória efetora parecem estar envolvidas no desenvolvimento da miocardite chagásica.

Apesar dos pacientes portadores da forma crônica apresentarem perfis semelhantes quanto à produção de citocinas na maioria das subpopulações celulares, pode-se observar que os pacientes da forma clínica IND possuem mais células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> secretando IL-10, enquanto pacientes CARD possuem mais células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> secretando IFN- $\gamma$ . Essa alta produção da citocina IL-10 pelos pacientes da forma crônica IND poderia estar associado à susceptibilidade celular ao parasito, já que esta citocina impede a morte dos parasitos, regulando os efeitos inflamatórios induzidos pela resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a alta secreção de IFN- $\gamma$  por pacientes CARD poderia estar associada ao desenvolvimento da miocardite chagásica, através da diminuição da parasitemia e exacerbação da resposta imune.

O papel da migração e ativação dessas células na infecção experimental pelo *T. cruzi* e na doença de Chagas ainda não foi completamente estabelecido, neste estudo observamos diferenças fenotípicas importantes quando comparamos os grupos IND e

CARD e também comparados ao grupo NI, sugerindo que mecanismos reguladores possam estar atuando de maneira distinta nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, permitindo que o grupo CARD desenvolva a patologia e o grupo IND não possuindo nenhum acometimento. No entanto, sabemos que alterações no balanço de citocinas secretadas acarretam em mudanças significativas da resposta imune relacionada ao desenvolvimento da patologia chagásica que, juntamente com a participação de mecanismos de interação celular ainda não identificados, determinam a direção e o efeito da resposta imune no indivíduo infectado pelo *T. cruzi*.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que células T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> apresentam efeitos distintos nas formas clínicas da doença e estão possivelmente envolvidas na indução dos mecanismos de evolução da doença mediados por IFN- $\gamma$ . Os dados sugerem ainda que a menor expressão de CD62L por células T CD4<sup>+</sup>, maior número de células T CD8<sup>+</sup> de memória central associado a maior secreção de IL-10 células T CD8<sup>+</sup> por pacientes IND tem papel importante na proteção de hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS AK; LICHTMAN AH & POBER JS. Cytokines. In: ABBAS AK.; LICHTMAN AH; POBER J.S. (Ed) - *Cellular and Molecular Immunology*, 4<sup>th</sup> edition W.B. Saunders Company, New York, p. 235-269, 2000.

ABEL LC, RIZZO LV, IANNI B, ALBUQUERQUE F, BACAL F, CARRARA D, BOCCHI EA, TEIXERA HC, MADY C, KALIL J, CUNHA-NET E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun*, 17: 99-107, 2001.

ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasit*, 84: 231- 244, 1996.

ACOSTA AM, SANTOS-BUCH CA. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*, 71:1255-1262, 1985.

ALBAREDA MC, LAUCELLA SA, ALVAREZ MG, ARMENTI AH, BERTOCHI G, TARLETON RL, POSTAN M. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*, 18(3):465-71, 2006.

AL-SABBAGH A, GARCIA CA, DIAZ-BARDALES BM, ZACCARIAS C, SAKURADA JK, SANTOS LM. Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. *Exp Parasitol*, 89:304-311, 1998.

ANDRADE Z. A Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER Z; ANDRADE ZA; BARRAL-NETO M (Ed) - *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2<sup>nd</sup> edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p 201-230, 2000.

ANDRADE ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. *Research in Immunol*, 142:126-129, 1981.



ANDRADE ZA. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. *Ciba Found Symp*, 99:214-233, 1983.

ANEZ N, CARRASCO H, PARADA H, CRISANTE G, ROJAS A, FUENMAYOR C, GONZALEZ N, PERCOCO G, BORGES R, GUEVARA P, RAMIREZ JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg*, 60:726-732, 1999.

ANTONELLI LR, DUTRA WO, ALMEIDA RP, BACELLAR O, GOLLOB KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*, 136(2):341-8, 2004.

APPAY V, DUNBAR PR, CALLAN M, KLENERMAN P, GILLESPIE GM, PAPAGNO L, OGG GS, KING A, LECHNER F, SPINA CA, LITTLE S, HAVLIR DV, RICHMAN DD, GRUENER N, PAPE G, WATERS A, EASTERBROOK P, SALIO M, CERUNDOLO V, MCMICHAEL AJ, ROWLAND-JONES SL. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med*, 8(4):379-85, 2002.

AVILA HA, PEREIRA JB, THIEMANN O, PAIVA E, DEGRAVE W, MOREL C & SIMPSON L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparasion with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiology*, 31: 2421-2426, 1993.

ARAUJO FF, GOMES JA, ROCHA MO, WILLIAMS-BLANGERO S, PINHEIRO VM, MORATO MJ, CORREA-OLIVEIRA R. Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*, 12:2797-806, 2007.

ATO M, STÄGER S, ENGWERDA CR, KAYE PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*, 3(12):1185-91, 2002.

BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 9:565-8, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA LMG, GOMES JAS, CANÇADO JR, FERRARI T, LEMOS EM, LUZ ZMP, MOREIRA MCV, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis*, 182:634-638, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA LM, GOMES JA, ROCHA MO, MOREIRA MC, LEMOS EM, LUZ ZM, PEREIRA ME, COFFMAN RL, DIAS JC, CANÇADO JR, GAZZINELLI G, CORRÊA-OLIVEIRA R. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res*, 31(1):127-31, 1998.

BARON V, BOUNEAUD C, CUMANO A, LIM A, ARSTILA TP, KOURILSKY P, FERRADINI L, PANNETIER C. The repertoires of circulating human CD8<sup>+</sup> central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity*, 18:193- 200, 2003.

BELL EB, SPARSHOTT SM. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo. *Nature*, 8;348:163-6, 1990.

BONECCHI R, SOZZANI S, STINE JT, LUINI W, D'AMICO G, ALLAVENA P, CHANTRY D, MANTOVANI A. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood*, 92:2668-2671, 1998.

BRADLEY LM, WATSON SR, SWAIN SL. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J Exp Med*, 180:2401-6, 1994.

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

BRENER Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 205-213, 1987.

BRONFEN E, ROCHA FSA, MACHADO GBN, PERILLO MM, ROMANHA AJ, CHIARI E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 237-240, 1989.

BUSTAMANTE JM, BIXBY LM, TARLETON RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8<sup>+</sup> T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med*, 14:542-50, 2008.

BUTCHER EC, PICKER LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272:60-6, 1996.

CAMPBELL DJ, SHASTRI N. Bacterial surface proteins recognized by CD4<sup>+</sup> T cells during murine infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol*, 161:2339-47, 1998.

CARDILLO F, VOLTARELLI J, REED SG, SILVA JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. *Infect. Immun*, 64:128-134, 1996.

CEDILLOS RA, TORREALBA JW, TONN RJ, MOSCA W, ORTEGON A. Artificial xenodiagnosis in Chagas disease. *Bol Oficina Sanit Panam*, 93:240-249, 1982.

CERISOLA JA, NEVES DA SILVA N, PRATA A, SCHENONE H, ROHWEDDER R. Evaluation of the efficacy of nifurtimox in chronic human chagasic infection by using xenodiagnosis. *Bol Chil Parasitol*, 32:51-62, 1977.

CHAGAS C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.

CHAMPAGNE P, OGG GS, KING AS, KNABENHANS C, ELLEFSEN K, NOBILE M, APPAY V, RIZZARDI GP, FLEURY S, LIPP M, FÖRSTER R, ROWLAND-JONES S, SÉKALY RP, MCMICHAEL AJ, PANTALEO G. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*, 410:106-11, 2001.

CHANDRASEKAR B, MELBY PC, PENNICA D, FREEMAN GL. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Immunol Lett*, 61:89-95, 1998.

CHIARI E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1:299-300, 1999.

CORBETT CE, RIBEIRO U JR, PRIANTI MG, HABR-GAMA A, OKUMURA M, GAMA-RODRIGUES J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum*, 44:993-8, 2001.

COSSIO PM, LAGUENS RP, DIEZ C, SZARFMAN A, SEGAL A, ARANA RM. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, 50:1252-1259, 1974.

CROFT M, SWAIN SL. Analysis of CD4<sup>+</sup> T cells that provide contact-dependent bystander help to B cells. *J Immunol*, 149:157-65, 1992.

CUNHA-NETO E, DURANTI M, GRUBER A, ZINGALES B, DE MESSIAS I, STOLF N, BELLOTTI G, PATARROYO ME, PILLEGGI F, KALIL J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin –specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92:3541-3545, 1995.

CUNHA-NETO E, COELHO V, GUILHERME L, FIORELLI A, STOLF N, KALIL J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*, 98:1709-12, 1996.

DA SILVEIRA AB, FREITAS MA, DE OLIVEIRA EC, NETO SG, LUQUETTI AO, FURNESS JB, CORREA-OLIVEIRA R, D'AVILA REIS D. Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102:1154-6, 2008.

D'AVILA REIS D, LEMOS EM, SILVA GC, ADAD SJ, MCCURLEY T, CORREA-OLIVEIRA R, MACHADO CR. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95:177-8, 2001.

DAWES R, PETROVA S, LIU Z, WRAITH D, BEVERLEY PC, TCHILIAN EZ. Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol*, 176:3417-25, 2006.

DEGRAVE W, FERNADES O, THIEMANN O, WINCKER P, BRITTO C, CARDOSO A, PEREIRA JB, BOZZA M, LOPES U, MOREL C. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89:367-368, 1994.

DE JONG R, BROUWER M, MIEDEMA F, VAN LIER RA. Human CD8<sup>+</sup> T lymphocytes can be divided into CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells with different requirements for activation and differentiation. *J Immunol*, 146:2088-94, 1991.

DIANZANI U, LUQMAN M, ROJO J, YAGI J, BARON JL, WOODS A, JANEWAY CA JR, BOTTOMLY K. Molecular association on the T cell surface correlate with immunological memory. *Eur J Immunol*, 20:2249-2257, 1990.

D'IMPERIO LIMA MR, EISEN H, MINOPRIO P, JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol*, 137:353-6, 1986.

DIAS JC. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica*, 1:S13-22, 2007.

DIAS JCP. Epidemiologia. In: BRENER, Z; ANDRADE,Z.A; BARRAL-NETO, M (Ed) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2<sup>nd</sup> edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 48-74, 2000.

DIAS JCP. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 22:147-156, 1989.

DIAS JCP, COURA JR. Epidemiologia. In: DIAS JCP, COURA JR(eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para a clínica geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, 33-66, 1997.

DOS SANTOS PV, ROFFÊ E, SANTIAGO HC, TORRES RA, MARINO AP, PAIVA CN, SILVA AA, GAZZINELLI RT, LANNES-VIEIRA J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*- elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 3:971-84, 2001.

DUTRA WO, ROCHA MO, TEIXEIRA MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol*, 21:581-7, 2005.

DUTRA WO, COLLEY DG, PINTO-DIAS JC, GAZZINELLI G, BRENER Z, PEREIRA ME, COFFMAN RL, CORREA-OLIVEIRA R, CARVALHO-PARRA JF. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5<sup>+</sup> B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol*, 51:91-7, 2000.

DUTRA WO, MARTINS-FILHO OA, CANÇADO JR, PINTO-DIAS JC, BRENER Z, GAZZINELLI G, CARVALHO JF, COLLEY DG. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 43:88-93, 1996.

DUTRA WO, MARTINS-FILHO OA, CANÇADO JR, PINTO-DIAS JC, BRENER Z, FREEMAN JÚNIOR GL, COLLEY DG, GAZZINELLI G, PARRA JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol*, 6:499-506, 1994.

DUTTON RW, BRADLEY LM, SWAIN SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol*, 16:201-23, 1998.

EBERT EC. Endogenous inhibitory cytokines repress TNF- $\alpha$  secretion. *Cell Immunol*, 237:106-14, 2005.

FÖRSTER R, SCHUBEL A, BREITFELD D, KREMMER E, RENNER-MÜLLER I, WOLF E, LIPP M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99:23-33, 1999.

FUJII Y, OKUMURA M, INADA K, NAKAHARA K, MATSUDA H. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur J Immunol*, 22:1843-50, 1992.

GALLI G, CHANTRY D, ANNUNZIATO F, ROMAGNANI P, COSMI L, LAZZERI E, MANETTI R, MAGGI E, GRAY PW, ROMAGNANI S. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol*, 30:204-10, 2000.

GARCIA ES, AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, 7:240-244, 1991.

GARCIA CA, OLIVEIRA EC, SAKURADA JK, SANTOS LM. Protective immunity induced by a *Trypanosoma cruzi* soluble extract antigen in experimental Chagas' disease. Role of interferon gamma. *Immunol Invest*, 29:1-12, 2000.

GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, BUSEK SC, TEIXEIRA MM, SILVA JS, CORREA-OLIVEIRA R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*, 73:7960-6, 2005.

GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, MARTINS-FILHO OA, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*, 71:1185-93, 2003.

GOMES, JAS. Doença de Chagas: perfil imunológico das formas clínicas indeterminada e cardíaca. Tese Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 147p., 2002.

GOWANS JL, KNIGHT EJ. THE ROUTE OF RE-CIRCULATION OF LYMPHOCYTES IN THE RAT. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 159:257-82, 1964.

GRISOTTO MG, D'IMPÉRIO LIMA MR, MARINHO CR, TADOKORO CE, ABRAHAMSOHN IA, ALVAREZ JM. Most parasite-specific CD8<sup>+</sup> cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha beta and CD8 molecules. *Immunology*, 102:209-17, 2001.

GUARDA G, HONS M, SORIANO SF, HUANG AY, POLLEY R, MARTÍN-FONTECHA A, STEIN JV, GERMAIN RN, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. L-selectin-negative CCR7<sup>-</sup> effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol*, 8:743-52, 2007.



GUNN MD, KYUWA S, TAM C, KAKIUCHI T, MATSUZAWA A, WILLIAMS LT, NAKANO H. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*, 189:451-60, 1999.

HARDISON JL, WRIGHTSMAN RA, CARPENTER PM, KUZIEL WA, LANE TE, MANNING JE. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 74:135-43, 2006.

HARDY RR, CARMACK CE, LI YS, HAYAKAWA K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5<sup>+</sup> B cells. *Immunol Rev*, 137:91-118, 1994.

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

HERMISTON ML, XU Z, WEISS A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol*, 21:107-137, 2003.

HIGUCHI MDEL, BENVENUTI LA, MARTINS REIS M, METZGER M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*, 60:96-107, 2003.

HIGUCHI ML, REIS MM, AIELLO VD, BENVENUTI LA, GUTIERREZ PS, BELLOTTI G, PILEGGI F. Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*, 56:485-589, 1997.

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

IEZZI G, KARJALAINEN K, LANZAVACCHIA A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*, 8:89-95, 1998.

ITANO AA, JENKINS MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*, 4:733-9, 2003.

INOUE T, ASANO Y, MATSUOKA S, FURUTANI-SEIKI M, AIZAWA S, NISHIMURA H, SHIRAI T, TADA T. Distinction of mouse CD8<sup>+</sup> suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *J Immunol*, 150:2121-8, 1993.

JANEWAY CAJR. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 10:645-74, 1992.

JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med Hyg*, 48:348-357, 1993.

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

KORETZKY GA. Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *FASEB J*, 7:420-6, 1993.

KUNKEL EJ, RAMOS CL, STEEBER DA, MÜLLER W, WAGNER N, TEDDER TF, LEY K. The roles of L-selectin, beta 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *J Immunol*, 161:2449-56, 1998.

KUROBE H, LIU C, UENO T, SAITO F, OHIGASHI I, SEACH N, ARAKAKI R, HAYASHI Y, KITAGAWA T, LIPP M, BOYD RL, TAKAHAMA Y. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity*, 24:165-77, 2006.

LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*, 290:92-7, 2000.

LEITEMBERG D, BOUTIN Y, LU DD, BOTTOMLY K. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity*, 10:701, 1999.

LEITENBERG D, NOVAK TJ, FARBER D, SMITH BR, BOTTOMLY K. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med*, 183:249-256, 1996.

LEON JS, ENGMAN DM. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol*, 31:555-61, 2001.

LEVITUS G, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, VAN REGENMORTEL MH, LEVIN MJ. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol*, 85:413-417, 1991.

LINTON PJ, HAYNES L, TSUI L, ZHANG X, SWAIN S. From naive to effector--alterations with aging. *Immunol Rev*, 160:9-18, 1997.

MACHADO FS, KOYAMA NS, CARREGARO V, FERREIRA BR, MILANEZI CM, TEIXEIRA MM, ROSSI MA, SILVA JS. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*, 191:627-36, 2005.

MACKAY CR. T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol Today*, 12:189-92, 1991.

MACKAY CR, MARSTON WL, DUDLER L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*, 171:801-17, 1990.

MANJUNATH, N, SHANKAR P, WAN J, WENINGER W, CROWLEY MA, HIESHIMA K, SPRINGER TA, FAN X, SHEN H, LIEBERMAN J, VON ANDRIAN UH. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest*, 108:871-878, 2001.

MARTIN DL, TARLETON RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 174:1594-601, 2005.

MASOPUST D, LEFRANCOIS L. CD8 T-cell memory: the other half of the story. *Microbes Infect*, 5:221-229, 2003.

MCCABE RE, REMINGTON JS, ARAUJO FG, DEKKER M. Enhancement of resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by recombinant IFN- $\gamma$ . In: BYRNE, G., TURCO, J. (Ed). *Interferon and nonviral pathogens*. Marcel Dekker, New York, p.203-216, 1988.

MCCABE RE, MEAGHER SG, MULLINS BT. Endogenous IFN- $\gamma$ , macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Infect. Disease*, 163:912-915, 1991.

MENEGHELLI UG. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37:252-60, 2004.

MERKENSCHLAGER M, BEVERLEY PC. Memory T cells. *Nature*, 341:392-401, 1989.

MICHAILOWSKY V, MURTA SM, CARVALHO-OLIVEIRA L, PEREIRA ME, FERREIRA LR, BRENER Z, ROMANHA AJ, GAZZINELLI RT. Interleukin-12 enhances *in vivo* parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42:2549-2556, 1998.

MICHIE CA, MCLEAN A, ALCOCK C, BEVERLEY PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 360:264-5, 1992.

MINOPRIO P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol*, 31:588-91, 2001.

MINOPRIO P, EISEN H, JOSKOWICZ M, PEREIRA P, COUTINHO A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J Immunol*, 139:545-50, 1987.

MINOPRIO PM, EISEN H, FORNI L, D'IMPERIO LIMA MR, JOSKOWICZ M, COUTINHO A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol*, 24:661-8, 1986.

MINTER-GOEDBLOED E, MINTER DM, MARSHALL JFC. Quantitative comparison between xenodiagnosis and haemoculture in detection of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans Roy. Soc. Med. Trop. Hyg*, 72: 84-91, 1978.

MORRIS SA, TANOWITZ HB, WITTNER M, BILEZIKIAN JP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*, 82:1900-9, 1990.

MULLER U, KOHLER G, MOSSMANN H, SCHAUB GA, ALBER G, DI SANTO JP, BROMBACHER F, HOLSCHER C. IL-12-independent IFN- $\gamma$  production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol*, 167:3346-3353, 2001.

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

MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, HEBERT CA, HORUK R, MATSUSHIMA K, MILLER LH, OPPENHEIM JJ, POWER CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharm*, 52:145-173, 2000.

NABORS GS, TARLETON RL. Differential control of IFN- $\gamma$  and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol*, 146:3591-3598, 1991.

NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28:1039-57, 1979.

OKUMURA M, FUJII Y, INADA K, NAKAHARA K, MATSUDA H. Both CD45RA<sup>+</sup> and CD45RA<sup>-</sup> subpopulations of CD8<sup>+</sup> T cells contain cells with high levels of lymphocyte function-associated antigen-1 expression, a phenotype of primed T cells. *J Immunol*, 150(2):429-37, 1993.

OLIVARES FE, VRAY B. Relationship between granulocyte macrophage- colony stimulating factor, tumor necrosis factor - $\alpha$  and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. *Paras. Immunol*, 17:135- 141, 1995.

PALOMINO SA, AIELLO VD, HIGUCHI ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, 94:571-579, 2000.

PENNINGER JM, IRIE-SASAKI J, SASAKI T, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat. Immunol*, 2:389–396, 2001.

PICKER LJ. Mechanisms of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, 4:277-86, 1992.

PITZALIS C, KINGSLEY G, HASKARD D, PANAYI G. The preferential accumulation of helper-inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol*, 18:1397-404, 1988.

PRINCE HE, YORK J, JENSEN ER. Phenotypic comparison of the three populations of human lymphocytes defined by CD45RO and CD45RA expression. *Cell Immunol*, 145:254-62, 1992.

REED SG, BROWNELL CE, RUSSO DM, SILVA JS, GRABSTEIN KH, MORRISSEY PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 153:3135-3140, 1994.

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

REIS MM, HIGUCHI MDEL, BENVENUTI LA, AIELLO VD, GUTIERREZ PS, BELLOTTI G, PILEGGI F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R<sup>+</sup> in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol*, 83:165-72, 1997.

REIS DD, JONES EM, TOSTES S, LOPES ER, CHAPADEIRO E, GAZZINELLI G, COLLEY DG, MCCURLEY TL. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 49:192-200, 1993.

RIBEIRO-DOS SANTOS R, MENGEL J, POSTOL E, SOARES RAO, FERREIRA-FERNANDEZ E, SOARES MBP, PONTES-DE-CARVALHO LC. A heart-specific CD4<sup>+</sup>T-cell line obtained from a cronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplantats in absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 23:93-101, 2001.

ROCHA MO, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci*, 8:44-54, 2003.

ROCHA A, DE MENESES AC, DA SILVA AM, FERREIRA MS, NISHIOKA SA, BURGARELLI MK, ALMEIDA E, TURCATO JÚNIOR G, METZE K, LOPES ER. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 50:261-8, 1994.

SALLUSTO F, GEGINAT J, LANZAVECCHIA A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22:745-63, 2004.

SALLUSTO F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica*, 84:28-31, 1999.

SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A, MACKAY CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, 19:568-574, 1998.

SALMI M, JALKANEN S. Endothelial ligands and homing of mucosal leukocytes in extraintestinal manifestations of IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 4:149-56, 1998.

SALMI M, SMITH DJ, BONO P, LEU T, HELLMAN J, MATIKAINEN MT, JALKANEN S. A mouse molecular mimic of human vascular adhesion protein-1. *Mol Immunol*, 34:1227-36, 1997.



SALTINI C, KIRBY M, TRAPNELL BC, TAMURA N, CRYSTAL RG. Biased accumulation of T lymphocytes with "memory"-type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung. *J Exp Med*, 171:1123-40, 1990.

SAMUDIO M, MONTENEGRO-JAMES S, DE CABRAL M, MARTINEZ J, ROJAS DE ARIAS A, WORONIECKY O, JAMES MA. Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. *Acta Trop*, 69:89-97, 1998.

SAMUDIO M, MONTENEGRO-JAMES S, CABRAL M, MARTINEZ J, ROJAS DE ARIAS A, JAMES MA. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg*, 58:119-21, 1998.

SCHNEIDER MA, MEINGASSNER JG, LIPP M, MOORE HD, ROT A. CCR7 is required for the in vivo function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med*, 204:735-45, 2007.

SCHOFIELD CJ, DIAS JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*, 42:1-27, 1999.

SILVA JS, MORRIESSEY PJ, GRABSTEIN KH, MOHLER KM, ANDERSON D, REED SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med*, 175:169-174, 1992.

SILVA JS, VESPA GN, CARDOSO MA, ALIBERTI JC, CUNHA FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*, 63:4862-4867, 1995.

SOARES MBP, 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*, 73:547-559, 2001.

SPRENT J. Immunological memory. *Curr Opin Immunol*, 9(3):371-9, 1997.

SPRINGER TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, ;76:301-14, 1994.

STÅHLS A, HONG SC, LIWSZYC GE, JANEWAY C JR, ANDERSSON LC, WOLFF H. Signalling initiated with CD4-TCR or TCR-TCR interactions: comparison of tyrosine phosphorylation patterns and CD45 effects. *Immunol Lett*, 60:103-9, 1998.

STAMPER HBJR, WOODRUFF JJ. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. *J Exp Med*, 144:828-33, 1976.

SWAIN SL, CROFT M, DUBEY C, HAYNES L, ROGERS P, ZHANG X, BRADLEY LM. From naive to memory T cells. *Immunol Rev*, 150:143-67, 1996.

SWAIN SL, BRADLEY LM. Helper T cell memory: more questions than answers. *Semin Immunol*, 4:59-68, 1992.

TALVANI A, RIBEIRO CS, ALIBERTI JC, MICHAILOWSKY V, SANTOS PV, MURTA SM, ROMANHA AJ, ALMEIDA IC, FARBER J, LANNES-VIEIRA J, SILVA JS, GAZZINELLI RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*, 2:851-66, 2000.

TARLETON RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*, 36:550-554, 2001.

TARLETON RL, ZHANG L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*, 15:94-9, 1999.

TCHILIAN EZ, BEVERLEY PC. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol*, 27:146-53, 2006.

THOMAS ML. The leucocyte common antigen family. *Annual Review of Immunology*, 7:339-445, 1989.

TORRICO F, HEREMANS H, RIVERA MT, MARCK EV, BILLIAU A, CARLIER Y. Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol*, 146:3626-3632, 1991.

VAGO AR, MACEDO AM, OLIVEIRA RP, ANDRADE LO, CHIARI E, GALVAO LM, REIS D, PEREIRA ME, SIMPSON AJ, TOSTES S, PENA SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*, 149:2153-2159, 1996.

VAGO AR, MACEDO AM, ADAD SJ, REIS DD, CORRÊA-OLIVEIRA R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348:891-2, 1996.

VAN VOORHIS WC, EISEN H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med*, 169:641-52, 1989.

VESPA GNR, CUNHA FQ, SILVA JR. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun*, 62:5177-5182, 1994.

VINHAES MC, DIAS JC. Chagas disease in Brazil. *Cad Saude Publica*, 2:7-12, 2000.

VON ANDRIAN UH, MEMPEL TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 3:867-78, 2003.

YIN X, LADI E, CHAN SW, LI O, KILLEN N, KAPPES DJ, ROBEY EA. CCR7 expression in developing thymocytes is linked to the CD4 versus CD8 lineage decision. *J Immunol*, 179:7358-64, 2007.

WENDEL S. Doença de Chagas transfusional. In: DIAS JCP, COURA JR (Ed). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, pg411-428, 1997.

WENDEL A, KUESTERS S, TIEGS G. Ebselen--an in vivo immune response modifier. *Biomed Environ Sci*, 10:253-9, 1997.

WAGNER N, ENGEL P, TEDDER TF. Regulation of the tyrosine kinase-dependent adhesion pathway in human lymphocytes through CD45. *J Immunol*, 150:4887-99, 1993.

WHERRY EJ, TEICHGRÄBER V, BECKER TC, MASOPUST D, KAECH SM, ANTIA R, VON ANDRIAN UH, AHMED R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*, 4:225-34, 2003.

WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 905:I-VI, 1-109, 2007.

ZHANG L, TARLETON RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*, 180:480-486, 1999.

ZOLA H, FLEGO L, MACARDLE PJ, DONOHOE PJ, RANFORD J, ROBERTON D. The CD45RO (p180, UCHL1) marker: complexity of expression in peripheral blood. *Cell Immunol*, 145:175-86, 1992.

ZIEGLER E, OBERBARNSCHEIDT M, BULFONE-PAUS S, FÖRSTER R, KUNZENDORF U, KRAUTWALD S. CCR7 signaling inhibits T cell proliferation. *J Immunol*, 179:6485-93, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)