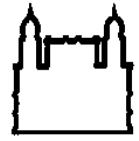




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA (PGPAT)

TESE DE DOUTORADO

**PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T DE MEMÓRIA E
LINFÓCITOS CD4+CD25+Foxp3+ (REGULADORES) NOS
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.**

JORGE SADAO NIHEI

Salvador - Bahia - Brasil

2013



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T DE MEMÓRIA E
LINFÓCITOS CD4+CD25+Foxp3+ (REGULADORES) NOS
MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.**

JORGE SADAO NIHEI

Orientador: Prof. Dr. José Orivaldo Mengele Jr.

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

Salvador - Bahia - Brasil

2013

FONTES DE FINANCIAMENTO
FAPESB e CNPq

Dedico esta tese aos meus pais:
Ayako Nihei (*in memoriam*) e
Ryuichi Nihei (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. José Orivaldo Mengele Jr.** pelos ensinamentos sobre Imunologia, atenção dispensada, paciência, dedicação, profissionalismo e por acreditar em mim, permitindo o desenvolvimento desta tese.

À **Dra. Fabiola Cardillo** pela dedicação, disposição em ajudar, ensinamentos sobre Imunologia e métodos empregados, de inestimável valor na minha formação.

Ao **Daniel Huber Pessina** pela amizade, auxílio nos experimentos e discussões essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

À **Sharah Menezes, Carolina Pirajá e Gabriel Carvalho** pela amizade e discussões sobre imunologia.

Aos outros integrantes do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI), pelo companheirismo e amizade: **Juracy Magalhães** (*in memorian*), **Maria de Fátima Magalhães e Presciano Correa** pelo auxílio na realização deste trabalho.

À **Dinalva França de Jesus** pela amizade, apoio nos momentos mais difíceis e conselhos que sempre foram fundamentais nessa caminhada.

Às **equipes** da Biblioteca, do setor de Histopatologia, de Informática e de Recursos Audio-visuais, e do Biotério do CPqGM, que sempre se mostraram prontos para prestar o auxílio necessário.

A **todos** aqueles que, mesmo não sendo citados nominalmente, colaboraram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

Por fim, agradeço em especial à: **Tatiana Simas, Oscar Nihei, Márcia Nihei e Silvio Nihei** e aos meus pais, **Ayako Nihei** (*in memorian*) e **Ryuichi Nihei** (*in memorian*).

NIHEI, Jorge Sadao. Participação das células T de memória e Linfócitos T CD4+CD25+Foxp3+ (Reguladores) nos mecanismos de resistência a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. 130 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) resulta em uma resposta imune que controla a predominância do parasito, mas é incapaz de eliminá-lo completamente, levando a persistência do parasito. A gravidade da doença de Chagas está correlacionada com a persistência do parasito nos tecidos musculares, neurais e intestinais. A função imunorregulatória das células T reguladoras em limitar a resposta imune poderia ser explorada no sentido de verificar a sua quantidade e qualidade no modelo experimental de infecção por *T. cruzi*. O principal objetivo deste projeto foi estudar a participação e influência dos linfócitos Treg sobre os mecanismos de resistência a infecção por *T. cruzi*, principalmente sobre a geração/manutenção de células T CD4+ e CD8+ memória efetora e central. Para tal, foi realizado um estudo comparativo da importância dos linfócitos T, e alterações das células Treg na infecção experimental por *T. cruzi*, de animais susceptíveis (C57Bl/6) e resistentes (BALB/c) nos dias 10, 20 e 30 após a infecção. Adicionalmente, com o objetivo de investigar o papel das células T reguladoras, foi realizada a neutralização da citocina IL-2, com o tratamento *in vivo* com anti-IL-2 monoclonal (clone JES6-1A12), em animais C57Bl/6, durante a infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*. A análise da cinética de infecção (10, 20 e 30 dias) revelou que os animais resistentes (BALB/c) apresentaram maior expansão de células T efetoras CD4+ e CD8+ no baço e no tecido muscular esquelético. Os dados coletados demonstram que o tratamento com anti-IL-2 resultou em diminuição significativa da população de células T CD4+CD25+Foxp3+ nos animais infectados, comparado ao grupo infectado e tratado com imunoglobulina de rato. A diminuição das células Treg nestes animais resultou em alterações importantes nos mecanismos efetores como, por exemplo: o aumento da expansão das células T CD4+ e CD8+ efetoras e a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no baço e tecido muscular esquelético. O reflexo destas alterações foi relacionado à diminuição da parasitemia e da mortalidade dos animais. Desta forma, as células Treg parecem exercer um controle da resposta imune efetora ao *T. cruzi* no sentido de tentar controlar a disseminação do patógeno e, ao mesmo tempo, impedir a destruição tecidual decorrente de uma exacerbação da resposta imune. Portanto, sugere-se que as células Treg estariam participando da resposta imune ao *T. cruzi* no sentido de modular a resposta imune efetora.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Células T regulatórias e Infecção.

NIHEI, Jorge Sadao. Involvement of memory T cells and regulatory T cells during mechanism resistance of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. 130 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) infection results in an immune response that controls the parasite prevalence, but is unable to eliminate it completely, leading to infection persistence. The severity of Chagas' disease is correlated with the parasite persistence in the muscle, neural and bowel tissues. The immunoregulatory function of regulatory T cells in limiting the immune response could be exploited in order to verify its quantity and functional activities in an experimental model of *T. cruzi* infection. The main objective of this project was to study the participation and influence of Treg lymphocytes on the mechanisms of resistance to *T. cruzi* infection, mainly on generation and maintenance of central/effector memory T cells. In the first step, it was conducted a comparative study of the importance of T lymphocytes and alterations of Treg cells in experimental *T. cruzi* infection in susceptible (C57BL/6) and resistant (BALB/c) animals for 10, 20 and 30 days of infection. Additionally, in order to investigate the role of regulatory T cells, it was performed the neutralization of the cytokine IL-2, with the *in vivo* treatment with anti-IL-2 monoclonal antibody (clone JES6-1A12) of C57BL/6 animals during infection with Tulahuen strain of *T. cruzi*. The analysis of the kinetics of infection (10, 20 and 30 days) revealed that the resistant animals (BALB/c) showed greater expansion and effector activity of the CD4+ and CD8+ splenic T cells and skeletal muscle tissue. The collected data demonstrate that the treatment with anti-IL-2 resulted in significant reduction of CD4+CD25+Foxp3+ T cells population in infected animals, compared to those infected and untreated. The decrease of Treg cells in those animals resulted in significant changes in the effector mechanisms such as: an increase in expansion of CD4+ and CD8+ T effector cells, and production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the spleen and skeletal muscle tissue. The reflection of these changes was verified by the decrease in parasitemia and mortality of the animals. Thus, Treg cells seem to have control of the effector immune response to *T. cruzi* in trying to control the spread of the pathogen and, at the same time, preventing tissue destruction due to an exacerbation of the immune response. Therefore, it is suggested that Treg cells would be participating in the immune response to *T. cruzi* by modulating the effector immune response.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Regulatory T cells and Infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de parasitos circulantes (parasitemia).....	54
Figura 2	Curva de Sobrevivência.....	54
Figura 3	Número total das populações de células esplênicas (A), e de linfócitos T CD4+ (B) e CD8+ (C) aos 10, 20 e 30 dias de infecção.....	56
Figura 4	Análise de populações de células T esplênicas CD4+ e CD8+, que apresentam perfil fenotípico de memória efetora e de memória central, durante a fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	59
Figura 5	Quantificação de células T CD4+ IFN- γ + (A) e CD8+ IFN- γ + (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção.....	61
Figura 6	Quantificação de células T CD4+ IL-10+ (A) e CD8+ IL-10+ (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção.....	63
Figura 7	Ilustração gráfica da marcação intracelular de IL-10+ e IFN- γ em células T CD4+ e CD8+ do músculo esquelético, durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção.....	65
Figura 8	Ilustração gráfica da marcação intracelular de IL-10+ e IFN- γ em células T CD4+ e CD8+ do músculo cardíaco, durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção.....	67
Figura 9	Quantificação de células T CD4+CD25+ (A) e CD4+CD25+Foxp3+ (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção.....	69
Figura 9.1.	Análise por citometria de fluxo de células T CD4+ expressando CD25+ e Foxp3+, em animais C57Bl/6 durante a infecção aguda.....	70
Figura 9.2.	Análise por citometria de fluxo de células T CD4+ expressando marcadores CD25+ e Foxp3+ em animais BALB/c durante a infecção aguda.....	72

Figura 10	Números de parasitos circulantes (A) e a curva de sobrevivência (B).....	74
Figura 11	Populações de células T Foxp3+ nos dias 4 e 21 após a infecção inicial em animais C57Bl/6 tratados ou não com anti-IL-2.....	76
Figura 12	Número de células esplênicas totais, células T CD4+ ou CD8+ no 4º e 21º após a infecção.....	77
Figura 13	Números totais e a porcentagem de células T CD4+ e CD8+ apresentando fenótipo de ativação recente (CD69+) no 21º dia após a infecção.....	79
Figura 14	Quantificação numérica de populações de linfócitos com marcadores de memória central (CD44 ^{alto} CD62L ^{alto}) e efetora (CD44 ^{alto} CD62L ^{baixo}), durante a fase aguda (21 dias) da infecção, tratados ou não com anti-IL-2.....	81
Figura 15	Quantificação numérica de populações de linfócitos T com marcadores de memória central (CD44 ^{alto} CD62L ^{alto}) e efetora (CD44 ^{alto} CD62L ^{baixo}), durante a fase aguda (21 dias) da infecção em animais C57Bl/6 tratados ou não com anti-IL-2.....	82
Figura 16	Número total de populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- γ , IL-10 e TNF- α , durante a fase aguda (21º dia) da infecção em animais C57Bl/6 tratados ou não com anti-IL-2.....	84
Figura 17	Análise morfométrica e qualitativa das populações de linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético e cardíaco, durante a fase aguda (21 dias) da infecção em animais C57Bl/6 tratados ou não com anti-IL-2.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti	Anticorpo
BSA	Soro Albumina Bovino
CD4+ ou CD8+	Moléculas de superfície de subpopulações de células T.
CD44 ^{alto}	Alta expressão de CD44
CD62 ^{baixo}	Baixa expressão de CD62
DAB	Diaminobenzidina
H.E.	Hematoxilina e Eosina
IFN- γ	Interferon gamma
IgA	Imunoglobulina A
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina-2
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-10 KO	Inativação gênica para produção de IL-10.
iNOS	enzima óxido nítrico sintetase induzível.
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
Naive	Do inglês – virgem
NK	Natural Killer ou célula NK
NK1.1	Marcador NK1.1 sobre células T e NK
NO	Óxido Nítrico
OPD	orto-fenil-diamina
PBS	Solução de Tampão Fosfato
pg/mL	Picogramas por mililitro
RPMI	Meio de cultura celular
SFB	Soro Bovino Fetal
TBS	Solução Tampão com Tris
TCR	Receptor de linfócitos T
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	Fator de Transformação e Crescimento Tumoral
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th1 ou Th2	Padrão de linfócitos T auxiliar (1 ou 2).
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa.
$\alpha\beta$ +	TCR formado pelas cadeias α e β
$\gamma\delta$ +	TCR formado pelas cadeias γ e δ .
μ MT C57Bl/6	Animais C57Bl/6 desprovidos de linfócitos B.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Aspectos gerais da resposta imune ao <i>T. cruzi</i>	14
1.2. Células NK e NK T na resposta imune à infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	18
1.3. Células B na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	24
1.4. Células T $\alpha\beta$ na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	28
1.5. Células T $\gamma\delta$ na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	33
1.6. Células T reguladoras (Treg) na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	34
2. JUSTIFICATIVA.....	43
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. OBJETIVO GERAL.....	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1. Animais.....	47
5.2. Parasitos.....	47
5.3. Determinação do número de parasitos no sangue circulante (parasitemia).....	48
5.4. Protocolo de neutralização de citocina.....	48
5.5. Isolamento de células mononucleares do músculo estriado esquelético.....	48
5.6. Preparação das células esplênicas ou de células mononucleares do infiltrado inflamatório do tecido muscular para Citometria de fluxo.....	49
5.7. Marcação de moléculas de superfície para determinação de fenótipo celular....	50
5.8. Marcação de citocina intracelular e Foxp3 (intranuclear) de esplenócitos <i>ex vivo</i>	50
5.9. Avaliação Histológica.....	51
5.10. Forma de Análise dos Resultados.....	52
6. RESULTADOS.....	53

6.1. Avaliação dos padrões de resistência e susceptibilidade à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando-se a cepa Tulahuen em camundongos BALB/c e C57Bl/6, respectivamente.....	53
6.1.1. Comparação dos níveis parasitêmicos de animais C57Bl/6 e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
6.1.2. Curva de sobrevivência.....	53
6.1.3. Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
6.2. Marcadores de superfície em linfócitos T esplênicos estudados por citometria de fluxo (FACS) durante a fase aguda da infecção (10, 20 e 30 dias).....	57
6.2.1. Alterações quantitativas das populações de células T CD4+ e CD8+ esplênicas expressando CD44 e CD62L.....	57
6.2.2. Alterações na quantidade de esplenócitos CD4+ ou CD8+ produtores de Interferon- γ	60
6.2.3. Quantificação da população de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de Interleucina-10, na fase aguda da infecção.....	61
6.2.4. Alterações na produção de IL-10 e IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ do infiltrado inflamatório do músculo esquelético dos diferentes grupos experimentais na fase aguda da infecção.....	63
6.2.5. Alterações na produção de IL-10 e IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ do infiltrado inflamatório do músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais na fase aguda da infecção.....	66
6.2.6. Alterações quantitativas das populações de células T esplênicas apresentando o fenótipo CD4+CD25+ ou CD4+CD25+Foxp3+ durante a fase aguda da infecção.....	68
6.2.6.1. Ilustração gráfica referente aos estudos de citometria de fluxo e marcadores de células T regulatórias CD4+CD25+ e Foxp3+ na fase aguda da infecção.....	69
6.3. Avaliação dos padrões de resistência à infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> de animais C57Bl/6 submetidos à administração de anticorpos monoclonais que neutralizam a IL-2 <i>in vivo</i>	72
6.3.1. Comparação dos níveis parasitêmicos de animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados ou não com anti-IL-2.....	72
6.3.2. Efeito do tratamento de animais C57Bl/6, com anticorpo monoclonal anti-IL-2 (clone JES6-1A12), na fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i>	74
6.3.3. Alterações na celularidade total esplênica e em subpopulações de linfócitos T decorrente da diminuição de linfócitos T regulatórios nos animais tratados com anti-IL-2 e infectados com <i>T. cruzi</i>	77

6.3.4. Aumento da ativação celular nos animais tratados com anti-IL-2 e infectados com <i>T. cruzi</i>	78
6.3.5. Aumento da geração de linfócitos T de memória efetora (CD44 ^{alto} CD62L ^{baixo}) e de memória central (CD44 ^{alto} CD62L ^{alto}) durante a fase aguda (21º dia) da infecção de animais tratados com anti-IL-2.....	80
6.3.6. Quantificação da produção de citocinas por linfócitos T CD4+ e CD8+ do baço de animais infectados e tratados ou não com anti-IL-2.....	83
6.3.7. Análise das populações de linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético e cardíaco de animais C57Bl/6 infectados e tratados ou não com anti-IL-2.....	85
7. DISCUSSÃO.....	87
8. CONCLUSÃO.....	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da resposta imune ao *T. cruzi*

A infecção por *T. cruzi* resulta na ativação de múltiplos compartimentos do sistema imune inato e adaptativo. Quando o patógeno invade o organismo, o sistema imune inato imediatamente inicia uma reação inflamatória local, limitando com maior ou menor eficiência a extensão da infecção. Nos linfonodos drenantes são iniciadas as respostas do sistema imune adaptativo que resultam, dentre outras coisas, na produção de anticorpos específicos, uma a duas semanas após a infecção. Ao mesmo tempo anticorpos pré-existentes, chamados de naturais, colaboram com o sistema imune inato, bloqueando e eliminando o patógeno, através da amplificação da fagocitose e da ação do sistema complemento (OCHSENBEIN e ZINKERNAGEL, 2000). Ademais, com o desenvolvimento da resposta imune celular inata e adaptativa, a parasitemia é gradualmente controlada ou reduzida. A falha neste controle inicial da infecção pode levar à generalização da infecção e até a morte do hospedeiro. Nesse sentido, é de extrema relevância a defesa imediata proporcionada pelo sistema imune inato para a sobrevivência e preparação para a resposta adaptativa.

A resposta imune orquestrada na fase aguda de infecção pode ser efetiva em controlar o número de parasitos sanguíneos circulantes e a infecção tecidual inicial, porém, é ineficiente em eliminar, totalmente, o agente patogênico, acabando com a infecção. Desta forma, o parasito persiste nos tecidos, por décadas, frequentemente como uma infecção pouco ou nada sintomática. A persistência do parasito nos tecidos (miocárdio e músculo esquelético) tem sido demonstrada, como um dos principais fatores na patogênese de animais cronicamente infectados (LEON et al., 2003; VIOTTI et al., 2006; ZHANG et al., 1999; NAGAJYOTHI et al., 2012).

As moléculas e células efetoras que compõem a imunidade inata apresentam importantes funções na resposta do hospedeiro à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Semelhante a outros organismos patogênicos, o *T. cruzi* é capaz de ativar proteínas e enzimas efetoras do sistema complemento (YOSHIDA et al., 1987; JOINER et al.,

1985). Este sistema é um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro a agir contra o parasito, sendo que a primeira via a ser ativada é a lectina, na qual a lectina ligante de manose (MBL - do inglês “Mannan-binding lectin”), L-ficolina, H-Ficolina e M-Ficolina se ligam a moléculas de carboidratos glicosiladas na superfície de tripomastigotas, estas últimas chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A via lectina desencadeia a ativação da via alternativa do complemento através da geração do componente C3b, essencial na ativação desta via, resultando na ativação sinérgica do sistema complemento (CESTARI et al., 2013). Posteriormente, parasitos que obtiveram sucesso na evasão deste mecanismo, podem ser eliminados pela ativação da via clássica do sistema complemento, a qual é dependente de anticorpos gerados em uma resposta imune humoral. Desta forma, o sucesso na progressão da infecção do hospedeiro dependerá da capacidade do parasito de resistir e evadir do sistema complemento. Inicialmente, pesquisadores demonstraram que somente as formas não infectivas (epimastigotas) do parasito são destruídas e as formas infectivas (tripomastigotas) são resistentes à ação lítica do complemento (NOGUEIRA et al., 1975). Mais tarde, Cestari e colaboradores, em 2009, e Ferreira e colaboradores em 2004, demonstraram que o *T. cruzi* expressa moléculas receptoras do complemento que podem inibir a cascata do mesmo, bloqueando a formação da C3 convertase, ou C1q ou a ligação de MBL. Entretanto, infere-se que a capacidade de evasão do parasito pelo sistema complemento depende de característica intrínseca ao parasito como a variação antigênica (CESTARI et al., 2013).

Além, da expressão de moléculas que apresentam atividade inibitória sobre componentes do sistema complemento, o protozoário *T. cruzi* apresenta outras moléculas que estão envolvidas com a evasão da resposta imune inata, como as moléculas mucinas ancoradas em glicofosfatidilinositol (GPI), glicofosfolipídeos, cruzipaina e Tc52. As mucinas ancoradas em GPI e glicofosfolipídeos, presentes no *T. cruzi*, foram relacionadas com alterações na maturação de células dendríticas esplênicas. Durante a infecção ao *T. cruzi* ocorre aumento de células dendríticas imaturas esplênicas (CHAUSSABEL et al., 2003), e a maioria destas células permanece imatura no processo infeccioso, apresentando baixa expressão de CD86 e pouca migração para a zona de linfócitos T (CHAUSSABEL et al., 2003). Além disso,

experimentos *in vitro* mostram que a adição de LPS (lipopolissacarídeo) em cultura de células dendríticas pré-incubadas com *T. cruzi*, resulta em baixa maturação destas células e secreção de IL-10 e TGF- β (PONCINI et al., 2008; BRODSKYN et al., 2002). Adicionalmente, a cruzipaina foi relacionada com a indução de secreção de IL-10 e TGF- β pelos macrófagos (STEMPIN et al., 2002). A Tc52, uma glutathione tiotransferase, foi correlacionada com aumento de IL-10 (GARZON et al., 2003). Desta forma, as moléculas expressas pelo *T. cruzi* possuem efeito imunomodulatório sobre células primordiais da resposta imune inicial, favorecendo a replicação do parasito e, portanto, sua persistência no hospedeiro.

Após o início da infecção, o parasito pode ser fagocitado por células apresentadoras de antígenos classificadas como profissionais, como por exemplo os macrófagos e células dendríticas, ou invadir essas mesmas células, e células não fagocíticas, como os fibroblastos, células endoteliais, células mesenquimais e vários outros tecidos, de uma maneira sistêmica. Esse processo inicia uma série de interações moleculares que mobilizam os mecanismos celulares da resposta imune inata do hospedeiro e concomitantemente uma reação inflamatória local e sistêmica antiparasitária (ALIBERTI et al., 1996).

Desta forma, apesar do *T. cruzi* invadir as células fagocíticas, estas são as principais células da primeira linha de defesa celular contra o *T. cruzi*. Os fagócitos possuem receptores de reconhecimento padrão (PRR – do inglês “Pattern Recognition Receptor”) capazes de reconhecer uma variedade de moléculas comuns aos diversos microrganismos, denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os chamados PRRs, incluem moléculas da família dos receptores tipo Toll (TLR – do inglês “Toll-Like Receptors”) e receptores tipo NOD (do inglês “nucleotid-binding oligomerization domain receptors”) (CARNEIRO-SAMPAIO e COUTINHO, 2007). A ativação dos fagócitos por tais receptores induz a produção de mediadores inflamatórios que também são importantes na mediação da resposta imune adaptativa (SCHNARE et al., 2001; KANNEGANTI et al., 2007; UNDERHILL et al., 2007). Um dos principais fagócitos residentes é o macrófago, e este pode apresentar amplificação nos mecanismos microbicidas através do aumento na produção de componentes oxidativos que atuam contra patógenos intracelulares (GAZZINELLI et al., 1992a).

Além dos mecanismos microbicidas, os macrófagos apresentam diferentes funções imunomoduladoras. Dentre as primeiras evidências, foi mostrado que os macrófagos esplênicos, de camundongos com tumor induzido, apresentam atividade supressora *in vitro* sobre a proliferação de linfócitos T (KIRCHNER et al., 1975). Adicionalmente, outros estudos na década de 70, utilizando modelo experimental de tumor, demonstraram a capacidade imunossupressora dos macrófagos esplênicos, principalmente *in vitro* (WEISS et al., 1977; WALDMANN et al., 1977).

Desde então, diversos estudos foram realizados para descrever a ontogenia, fenótipo e função desta população celular, utilizando-se não só de modelos experimentais de tumor, mas também de infecção. Interessantemente, nos últimos anos foi descrita uma população celular denominada células supressoras de origem mielóide (MDSC, do inglês “Myeloid-Derived Suppressor Cell”). Esta população celular é heterogênea sendo composta por progenitor mielóide e precursores de macrófagos, células dendríticas e granulócitos (PERANZONI et al., 2010). Tudo indica que os macrófagos supressores descritos na década de 70 são os mesmos que compõem esta população celular de MDSC. Em camundongos as MDSC são identificadas fenotipicamente pela expressão variável de Gr1 e CD11b sobre sua superfície celular. A molécula CD11b caracteriza macrófagos, entretanto Gr1 apresenta algumas complexidades na fenotipagem. A molécula Gr1 é constituída por duas moléculas ou epítomos, sendo elas, Ly6C e Ly6G que caracterizam células precursoras de macrófagos e células dendríticas, respectivamente (FLEMING et al., 1993). Sendo assim, apresentam baixa expressão nestas duas populações celulares uma vez que alcançam a maturação celular. Além do mais, Ly6G também é expresso em precursores de neutrófilos e Ly6C é expresso por monócitos e por granulócitos da medula óssea (GUMLEY et al., 1995; MCCORMACK et al., 1993).

De maneira relevante, utilizando-se modelo experimental de câncer de pulmão, onde animais foram tratados com anticorpo monoclonal anti-Gr1, foi demonstrado que ocorre aumento da resposta imune antitumoral, com aumento quantitativo e qualitativo das células T CD8+ e NKT e conseqüente sobrevida ou cura do animal (SRIVASTAVA et al., 2012). Adicionalmente, foram identificadas células MDSC no infiltrado inflamatório de células mononucleares no tecido cardíaco na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. A

fenotipagem identificou uma predominância de 70% de células Ly6G negativa e Ly6C positivo e 30% de Ly6G positivo e Ly6C positivo no infiltrado inflamatório do coração. Quanto ao aspecto funcional, células Ly6G negativo CD11b positivo apresentaram expressão considerável de arginase I e NO sintase induzível. Ensaio *in vitro* revelaram a capacidade destas células em inibir a proliferação de linfócitos T, provavelmente por mecanismo dependente de NO, sendo uma característica funcional das células MDSC (CUERVO et al., 2011). A expressão de arginase I, pela célula Ly6G-CD11b+, leva ao consumo de L-arginina plasmática *in vivo*, resultando na diminuição da concentração plasmática da L-arginina que é essencial para a proliferação dos linfócitos T (CHOI et al., 2009). Assim, a alta expressão de arginase I resulta em imunomodulação negativa da resposta imune no infiltrado inflamatório do miocárdio em animais em fase aguda da infecção por *T. cruzi* (CUERVO et al., 2011).

1.2. Células NK e NK T na resposta imune à infecção experimental pelo *T. cruzi*.

CARDILLO e colaboradores mostraram, em 1996, através de experimentos *ex vivo*, que no sobrenadante de esplenócitos de camundongos eutímicos ou atímicos cultivados com tripomastigotas vivos (e não mortos por irradiação, ultravioleta ou aquecimento), houve indução da produção de IFN- γ por células NK. Mais além, o tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ causou exacerbação da parasitemia somente se administrado antes ou logo depois da infecção. Adicionalmente, animais depletados da população de células NK apresentaram alta parasitemia, mostrando a importância das células NK que fazem parte do sistema imune inato. Desse modo, os dados revelam que o IFN- γ produzido principalmente por células NK do sistema imune inato é importante no controle da replicação do parasito no início da infecção (CARDILLO et al., 1996). O marcador NK1.1, pode ser encontrado em células “natural killer”, pertencentes ao sistema imune inato (CD3-) (KOO et al., 1984; BALLAS et al., 1990). No entanto, também é expresso em outras subpopulações celulares como células T CD4+ $\alpha\beta$ + (LEVITSKY et al., 1991) e células T $\gamma\delta$ + (AZUARA et al., 1997; AZUARA et al., 1998).

O IFN- γ é secretado principalmente por células presentes em uma resposta

imune de padrão Th1 e tem sido correlacionado a resistência à infecção por diferentes patógenos como a *Leishmania* (SCOTT et al., 1989), o *Toxoplasma* (GAZZINELLI et al., 1992c) e o *Schistosoma* (PEARCE et al., 1991). Adicionalmente, o perfil de liberação de citocinas durante a infecção por *T. cruzi* ainda não está totalmente entendido. O interferon- γ tem a capacidade de ativar macrófagos e inibir a replicação intracelular do parasito através do aumento da produção de componentes oxidativos (GAZZINELLI et al., 1992a).

Interessantemente, os macrófagos infectados pela forma tripomastigota do *T. cruzi* são induzidos a produzir e secretar a citocina IL-12. Esta citocina foi correlacionada com o controle da replicação do parasito, através da detecção da secreção de IFN- γ após adição de sobrenadante de cultura de macrófagos, obtidos de animais infectados, em culturas de esplenócitos de animais não infectados (ALIBERTI et al., 1996). A IL-12, produzida pelos macrófagos, foi descrita como um potente indutor da produção de IFN- γ por células NK e por outras subpopulações de células T (GATELY et al., 1994). Quando camundongos infectados são tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-12, ocorre aumento da parasitemia e da mortalidade neste grupo, quando comparado ao grupo controle (SILVA et al., 1998). Em outro enfoque experimental, o tratamento com a citocina recombinante IL-12 feito em camundongos da linhagem BALB/c, infectados com *T. cruzi*, resultou na redução da parasitemia e um significativo aumento da sobrevivência quando comparado aos animais não tratados. As evidências mostraram que este efeito protetor poderia ser correlacionado com altos níveis de IFN- γ e TNF- α no soro destes animais (HUNTER et al., 1996). Juntos, esses dados reforçam a idéia de que a citocina IL-12 exerce um efeito protetor na regulação da parasitemia, sendo que este efeito envolve, principalmente, a produção de IFN- γ e TNF- α (HUNTER et al., 1996).

Adicionalmente, um dos principais mecanismos que os macrófagos utilizam para eliminar patógenos intracelulares é a produção de óxido nítrico que é induzida por IFN- γ e TNF- α . O óxido nítrico é um importante fator citotóxico e citostático na resposta imune mediada por células a muitos patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania major* (GREEN et al., 1990), *Mycobacterium bovis* (FLESCH et al., 1991), *Toxoplasma gondii* (ADAMS et al., 1990), e *Trypanosoma cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992b). Além do óxido

nítrico, outros fatores foram previamente citados como fundamentais para ativar a função microbicida de macrófagos. A ativação dos mecanismos microbicidas do macrófago também causa a liberação de peróxido de hidrogênio, que está envolvido na morte do *T. cruzi* (NATHAN et al., 1979). Assim, a ativação dos mecanismos tripanocidas de macrófagos pode ser devido à liberação de citocinas por células T ativadas (TARLETON et al., 1990) e células NK (CARDILLO et al., 1996), que amplificam a eliminação de formas amastigotas intracelulares (BOGDAN et al., 1999).

O tratamento dos camundongos C57Bl/6 com inibidores de iNOS resulta em maior suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1995). A infecção por *T. cruzi* em camundongos C57Bl/6 selvagens e iNOS^{-/-}, demonstrou que os animais iNOS^{-/-} poderiam compensar a ausência de produção de NO através do aumento qualitativo e quantitativo de outras citocinas importantes no controle imune da infecção. Esse dado mostra que a produção de NO é importante, mas não é essencial para o controle da infecção. (CUMMINGS et al., 2004).

Desta forma, foi demonstrada a importância das células NK CD3⁻ e NK CD3⁺ T na resistência a infecção experimental por *T. cruzi*, uma vez que a depleção de ambas as populações celulares, em animais infectados, resulta em aumento da parasitemia e da mortalidade (CARDILLO et al., 2002). Resultados similares foram obtidos em modelo de depleção seletiva de células NK CD3⁻, com anticorpos anti-asialo GM1 (ASGM1) (ROTTENBERG et al., 1988) e em modelo de deficiência de células iNKT (DUTHIE et al., 2002). Portanto, ambas as populações celulares auxiliam na resistência a infecção pelo *T. cruzi*, mas pouco se sabe sobre a relação entre as duas populações celulares. Em estudo de DUTHIE e colaboradores (2009) foi mostrado que, aparentemente, as células NK sofrem ativação e apresentam atividade efetora independentemente da presença das células NKT. Entretanto, a manutenção do número de células NK CD3⁻ durante o curso de infecção dependeu da presença das células NKT.

As células T “Natural Killer” (NKT) são uma classe de células T que regula a resposta imune inata e adaptativa. Diferente das células T convencionais, células NKT são estimuladas por glicolipídios apresentados via MHC classe I não clássico, denominado CD1d. Este tipo de MHC está presente em células B, células dendríticas, macrófagos e tímócitos imaturos e, é composto pela molécula β 2-microglobulina e a

cadeia CD1d não polimórfica. As células NKT ou células T naturais são “restritas” à moléculas de CD1d (GODFREY et al., 2000; KRONENBERG e GAPIN, 2002). Durante o processo de maturação no timo, as células NKT compartilham dos mesmos eventos iniciais de desenvolvimento tímico com as células T convencionais, mas divergem no processo de seleção positiva pois utilizam apenas um tipo de receptor de células T (TCR) composto por apenas uma cadeia α e um único componente J ($V\alpha 14$ - $J\alpha 18$), bem como um restrito conjunto de cadeias beta de pouca diversidade. Durante o desenvolvimento tímico as células NKT reconhecem glicolipídios apresentados via CD1d pelos timócitos do microambiente. Deste modo a molécula CD1d é essencial no desenvolvimento de células NKT (DELLABONA et al., 1994; PORCELLI, 1995). Camundongos deficientes em CD1d são desprovidos de todas as células TNK restritas a CD1d, também chamadas de células NK T invariáveis (iNKT) (SMILEY et al., 1999).

As células NKT reconhecem e tornam-se ativadas em resposta a antígenos lipídicos próprios e não próprios apresentados pela molécula CD1d que é expresso na superfície de células apresentadoras de antígenos chamadas de profissionais. Para verificar a participação das moléculas CD1d na ativação das células NKT, durante a infecção pelo *T. cruzi*, animais foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CD1d (clone 20H2), com o intuito de bloquear esta molécula, e posteriormente, foram infectados. O resultado foi o aumento do infiltrado inflamatório e da mortalidade, quando comparado ao animal selvagem infectado. Estes experimentos demonstraram que durante a infecção pelo *T. cruzi* as células NKT são ativadas, essencialmente, pela ligação de seu TCR ao complexo glicolipídios-CD1d apresentado por células dendríticas, macrófagos ou células B (ROARK et al., 1998). O mecanismo de ativação das células NKT pode ocorrer, também, através do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores tipo Toll (TLR), presentes na superfície de células NKT (SHIMIZU et al., 2002). Porém, esta via de ativação parece não ser essencial, pois animais deficientes para a molécula adaptadora MyD88, importante na via de sinalização de receptores TLR, apresentam ativação normal de células NKT durante a infecção por *T. cruzi* (DUTHIE et al., 2005). Entretanto, esta via de ativação corrobora com o fato desta população celular ser rapidamente ativada mediante infecção

patogênica, e migrar para o sítio inflamatório no início da infecção. Além disso, animais deficientes em CD1d apresentam diminuição na migração e ativação de neutrófilos para o sítio inflamatório. Outro fator importante, mas não essencial, na ativação destas células, é a presença da citocina, como a IL-12, pois animais deficientes em IL-12 apresentaram alteração na ativação das células NKT durante a infecção por *T. cruzi*. Assim, para a ativação das células NKT parece ser necessário a ligação do TCR ao complexo glicolípido-CD1d e adicionalmente, a presença de citocinas, que por sua vez, aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias, facilitando a ativação das mesmas (YANG et. al., 2003; IKARASHI et. al., 2001). Há estudos que também mostram que as células NKT podem reconhecer superantígenos derivados de bactérias como, por exemplo, a enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) (NOMIZO et al., 2005).

Funcionalmente, dentre as funções efetoras apresentadas pelas células NKT está a atividade citolítica e a secreção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-13) (TANIGUCHI e NAKAYAMA, 2000). Estas células apresentam fenótipo de célula T ativada e possuem a capacidade de responder rapidamente a diferentes estímulos. Durante infecções, as células NKT podem secretar citocinas pro-inflamatórias que estimulam a resposta inata e adaptativa para eliminar o patógeno (KAWAKAMI et al., 2001; KAWAKAMI et al., 2003; EMOTO et al., 2003). Por outro lado, as células NKT podem também secretar citocinas anti-inflamatórias que limitam certas respostas patogênicas (DIELI et al., 2003). Os estudos sobre as células NKT sugerem que há diferentes subpopulações destas células que são funcionalmente distintas e são ativadas diferentemente a depender do estímulo antigênico. Desse modo, alguns estudos indicam que há uma subpopulação de células NKT utilizando TCR de pouca variabilidade ou invariável ($V\alpha 14$ - $V\alpha 18$) (ou iNKT), e também outra subpopulação desta célula que utiliza TCR com variabilidade (ou vNKT), estas podem ser parcialmente diferentes quanto a função, distribuição tecidual e marcadores de superfície (CARDEL et al., 1995; CHEN et al., 1998; GUMPERZ et al., 2002).

Estudos de depleção *in vivo* das células NK1.1+, através do tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-NK1.1, tem mostrado um aumento na parasitemia e mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi*. (CARDILLO et al.,

2002). Estes dados demonstram a participação de células NK1.1+, que podem incluir tanto as células NK+ CD3- como as NK+ CD3+ na resistência à infecção, já que ambas são fonte importante de IFN- γ . Dados adicionais têm sugerido que as células T NK1.1+ podem também estar envolvidas na geração de células T efectoras/memória durante a fase aguda da infecção (CARDILLO et al., 2002). Este estudo é corroborado pelo trabalho de KAHN e colaboradores (2005), os quais demonstraram que durante a infecção por *T. cruzi*, as células iNK T parecem exercer papel anti-inflamatório, que tem sido atribuído à secreção de IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (FAUNCE et al., 2002; NAKAMURA et al., 2003; SONODA et al., 1999; SZALAY et al., 1999; TERABE et al., 2003). Enquanto que, as células vNK T estariam envolvidas na resposta pró-inflamatória, com secreção de citocinas do perfil Th1 (KAHN et al., 2005).

CARDILLO e colaboradores (2002) demonstraram que animais depletados de células NK1.1+, na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, apresentaram uma diminuição dos níveis de IgG e acúmulo de IgM, indicando que a ausência de células NKT acarreta diminuição da produção de anticorpos e da mudança de isotipo de imunoglobulinas. Adicionalmente, estudos com animais deficientes em CD1d ou α 18 demonstraram reduzida resposta humoral comparado ao animal selvagem, em modelos de infecção experimental e de doenças autoimunes (HANSEN et al., 2003; LANG et al., 2006; KOBRYNSKI et al., 2005; BALPERRON et al., 2005). Estes dados demonstram que os linfócitos B são importantes na apresentação de antígeno lipídico via CD1d para as células NKT, e que esta última, exerce atividade auxiliar sobre as células B. LEADBETTER e colaboradores (2008) mostraram que a atividade auxiliar exercida pelas células NKT sobre as células B, necessita, além da interação do TCR com o complexo lipídio-CD1d, da interação de moléculas coestimulatórias como a CD40L e B7-1/2 e de citocinas como o IFN- γ . Esta interação forneceria a sinalização para a proliferação das células NKT e linfócitos B e também para a alteração de classe de isotipo de imunoglobulina para IgG específico.

Utilizando modelo experimental de inflamação crônica intestinal, foi constatado que as células B com alta expressão da molécula CD1d, possivelmente as células B da zona marginal dos folículos linfóides do baço, poderiam atuar como células reguladoras durante a inflamação. Esse processo regulatório poderia ser atribuído à secreção de

interleucina 10, pois foi verificado que a transferência de células B de animais geneticamente modificados para não produzirem a citocina IL-10 não foram capazes de controlar esse tipo de inflamação em animais duplo KO para os genes μ e TCR- α . Dessa forma, foi demonstrada a importância das células B como importante componente regulatório de processos inflamatórios (MIZOGUCHI et al., 2002).

1.3. Linfócitos B na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Estudos iniciais mostraram que na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, a capacidade da resposta imune mediada por células não é totalmente suficiente para controlar a replicação do parasito (TRISCHMANN et al., 1983). A produção de anticorpos parece ser necessária para eventual controle da replicação do parasito na corrente sanguínea (TRISCHMANN et al., 1984).

Posteriormente, diversos estudos foram feitos quanto às diversas funções dos anticorpos anti-*T. cruzi*: lise (LAGES SILVA, 1987), opsonização (SCOTT e MOYES 1982), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (LIMA MARTINS, 1985), ativação de complemento (MOTA e UMEKITA, 1989, SPINELLA et al., 1992) e neutralização. Outros estudos sugerem que os anticorpos poderiam não participar no controle inicial da proliferação dos parasitos, mas seriam eficazes na destruição dos mesmos, após a fase aguda da infecção. Esses anticorpos provavelmente seriam produzidos a partir de uma resposta imune específica dependente de células T e foram denominados anticorpos protetores, possuindo isotipo IgG (TAKEHARA et al., 1981). Neste sentido, ROTTENBERG e colaboradores (1995) mostraram que, cerca de 20 dias após a infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, camundongos geneticamente deficientes para a molécula CD4+ apresentaram baixos títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* quando comparados aos animais controles que continham células T CD4+.

Adicionalmente, CARDILLO e colaboradores (2007) demonstraram que animais deficientes em células B, não apresentaram significativa diferença na mortalidade durante a fase aguda da infecção, porém, apresentaram maior mortalidade durante a fase crônica. Desta forma, apesar dos trabalhos demonstrarem uma participação relativa dos anticorpos durante a fase aguda da infecção, estes se mostram

absolutamente fundamentais na resistência à infecção durante a fase crônica.

Estudo de POSTOL e colaboradores (2001a) mostraram que animais deficientes para células B apresentaram infiltrado inflamatório menos intenso quando comparados com o grupo controle selvagem, na fase aguda da infecção (20 dias de infecção). No entanto, o infiltrado inflamatório, nos animais deficientes em células B, aumenta na fase crônica da infecção (60 dias de infecção), no músculo esquelético. Adicionalmente, o número de células T CD45RB^{baixo/neg} e T NK1.1.+ diminuem em animais deficientes em células B, comparado aos selvagens, durante a infecção crônica. Esses dados sugerem que as células B poderiam regular a migração de células T NK1.1.+ para o músculo esquelético e que as imunoglobulinas poderiam ser importantes regulando a migração destas células para os tecidos, na fase crônica da infecção (POSTOL et al., 2001b). Possivelmente as células B poderiam atuar como reguladoras durante o processo inflamatório (MIZOGUCHI et al., 2002) e também regular a migração de células T NK1.1+ (POSTOL et al., 2001b).

POSTOL e colaboradores (2001c) e CARDILLO e colaboradores (2007) utilizando-se de camundongos deficientes em linfócitos B (μ MT) demonstraram que estes apresentaram maior parasitemia, produção aumentada de citocinas do padrão Th2 (IL-4 e IL-10), diminuição da produção de citocinas do padrão Th1 (IFN- γ e IL-12), durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Adicionalmente, a ausência da célula B, ainda resultou na diminuição da geração e manutenção de células T CD4+ e CD8+ de memória central e efetora. Deste modo, CARDILLO (2007) demonstrou que as células B possuem importante papel na regulação da resposta imune, principalmente na polarização do padrão de resposta para Th1 e na geração e manutenção de células T de memória central e efetora, durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Corroborando estes resultados, NGO e colaboradores, em 2001, mostraram que células B influenciam no desenvolvimento das células T. Utilizando-se de modelo experimental livre de infecção foi mostrado que em camundongos deficientes em células B, ocorre falha no desenvolvimento da zona de células T da polpa branca. Desse modo, a deficiência de células B pode causar ineficácia da resposta imune relacionada à ausência de produção de anticorpos e uma diminuição da população de células T. Assim, as conseqüências da ausência de células B, incluem redução da resposta de

células T nos modelos de infecção com *Salmonella typhimurium* (MASTROENI et al., 2000), *Bordetella pertussis* (LEEF et al., 2000), *Chlamydia trachomatis* (YANG et al., 1998), *Francisella tulaensis* (ELKINS et al., 1999), *Plasmodium chabaudi* (LANGHORNEE et al., 1998) e *Leishmania major* (HOERAUF et al., 1996).

Entre as moléculas efetoras do sistema imune, os anticorpos são extremamente relevantes no sentido de controlar certos patógenos, principalmente microrganismos extracelulares ou aqueles com um estágio extracelular no seu ciclo de vida. Após a infecção por *T. cruzi* ocorre ativação policlonal de linfócitos B, provavelmente por ligação de antígenos do patógeno às imunoglobulinas de membrana, por estimulação mediada por citocinas, ou estímulo via receptores de moléculas ligantes de “Toll-like receptor” (FAGARASAN et al., 2000; MOND et al., 1995), ou ainda aos três fatores citados, conjuntamente. Esta estimulação policlonal de células B, de modo independente de linfócitos T auxiliares, resulta na produção de imunoglobulinas IgM e IgG2a, detectados em altos níveis na circulação dos animais infectados (DÍMPERIO et al., 1986; SPINELLA et al., 1992).

Adicionalmente, anticorpos naturais são encontrados no soro de camundongos normais independente de prévia imunização, em sua maioria de isotipo IgM e de baixa afinidade de ligação aos antígenos (OCHSENBEIN e ZINKERNAGEL, 2000). Esses anticorpos também limitam a disseminação do patógeno. No entanto, para uma resposta eficiente, é necessária a produção de imunoglobulinas dependente de linfócitos T, onde anticorpos específicos ao antígeno de *T. cruzi* poderiam exercer função importante no controle da infecção. Desse modo, as células B maduras necessitam de estimulação, expansão e seleção no centro germinativo do baço, na presença de linfócitos T auxiliares. Tipicamente, o desenvolvimento de uma resposta adaptativa humoral necessita de pelo menos 1 semana, e resulta na produção de anticorpos específicos com alta afinidade, sendo inicialmente a IgM e posteriormente a IgG (MCLENNAM et al., 1997).

A ativação policlonal de linfócitos B associada com hipergamaglobulinemia resulta na produção de anticorpos de baixa especificidade ao antígeno e poderia estar relacionada com a susceptibilidade a infecção experimental pelo *T. cruzi*. BRYAN e colaboradores (2010) demonstraram que animais C57Bl/6 desenvolveram resposta

imune humoral específica após duas semanas de infecção e baixa ativação policlonal, resultando em resistência a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Em contrapartida, animais BALB/c, infectados pela mesma cepa, apresentaram grande ativação policlonal de linfócitos B antes de duas semanas de infecção e baixa resposta imune humoral específica, estes por sua vez foram susceptíveis a infecção. Análise mais detalhada permitiu verificar que o perfil de citocinas do animal resistente foi do padrão Th1, comparado ao perfil Th2 do animal susceptível (BRYAN et al., 2010).

Recentemente, a importância das células B no envolvimento de diversas doenças autoimune tem levado ao aumento de pesquisas relacionadas aos mecanismos de controle de homeostasia, expansão e função efetora desta população celular. De particular interesse, é o fator de ativação de células B (BAFF), que inicialmente foi descrito como fator responsável pela sobrevivência e maturação de linfócitos B (MACKAY et al., 2003; KALLED et al., 2003). BAFF é produzido principalmente por células de origem mielóide (SCHNEIDER et al., 1999; MOORE et al., 1999), como as células dendríticas que expressam altos níveis de CD11c (NARDELLI et al., 2001) e também, possivelmente, por linfócitos T e B (SCHNEIDER et al., 1999; POSTOL et al., 2008). Estudo recente, demonstrou a produção de IL-6, IL-10 e BAFF por células CD11b+ *in vitro*, quando estimulados por antígenos de *T. cruzi* (GRUPPI et al., 2006).

As primeiras evidências de que BAFF estaria relacionado à sobrevivência de células B surgiram em experimento *in vitro*, na qual células B periféricas de humano foram cultivadas com ou sem BAFF solúvel. A presença de BAFF aumentou a viabilidade da cultura de linfócitos B (SCHNEIDER et al., 1999). Evidência da possibilidade de que a disregulação na produção de BAFF poderia resultar em patogênese autoimune surgiu em modelos experimentais de camundongos transgênicos para BAFF (BAFF-Tg). Esses camundongos apresentaram altos níveis de BAFF na circulação e desenvolveram hiperplasia de linfócitos B e elevados níveis de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE no soro. Os camundongos BAFF-Tg desenvolveram quadro clínico semelhante aos camundongos F1(NZB/NZW), com autoanticorpos anti-dupla fita de DNA (MACKAY et al., 1999; GROSS et al., 2000). Posteriormente, demonstrou-se que os camundongos F1(NZB x NZW) também apresentam

hiperprodução de BAFF (POSTOL et al., 2008). Em contrapartida, a geração de camundongos geneticamente modificados onde o gene responsável pela codificação do BAFF foi inativado (BAFF $-/-$) mostrou que na ausência deste há uma drástica diminuição de linfócitos B. Ademais, o bloqueio do receptor de BAFF e posterior infecção pelo *T. cruzi*, mostrou que não há alteração dos níveis de anticorpos IgG específicos. Em contrapartida, houve uma diminuição considerável de anticorpos IgM não específicos (BERMEJO et al., 2010). Estudos prévios haviam indicado que células B de memória secretoras de IgM são dependentes de sinalização via BAFF, ao contrário, células B de memória secretoras de IgG não o são (SCHOLZ et al., 2008; GRUPPI et al., 2002).

O BAFF se liga a três receptores diferentes BAFF-R, BCMA e TACI; sendo que TACI é expresso também em linfócitos T (GROSS et al., 2000; THOMPSON et al., 2000; GRAS et al., 1995). Camundongos deficientes para BCMA não sofreram nenhuma alteração na homeostasia e atividade efetora de linfócitos T e B (XU et al., 2001). Diferentemente, camundongos deficientes em receptor de BAFF apresentaram redução na maturação de linfócitos B (SCHIEMANN et al., 2001). Enquanto que camundongos deficientes para TACI (XU et al., 2001; YAN et al., 2000) apresentaram expansão de linfócitos B circulantes e esplênicos, e níveis normais de imunoglobulinas no soro. Nestes animais, a resposta humoral dependente e independente de célula T estaria amplificada. Portanto, TACI estaria envolvido na modulação inibitória da proliferação e/ou maturação de células B, ao contrário de BAFF-R (MELCHERS et al., 2003).

1.4. Células T $\alpha\beta$ + na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Experimentos *in vivo* (ROBERSON et al., 1973) e *in vitro* (HOFF, 1975; NOGUEIRA et al., 1977) têm indicado o envolvimento de mecanismos efetores mediados por células na resistência à infecção (NOGUEIRA et al., 1981). O tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-L3T4+ (CD4+) e sua concomitante imunização com antígenos de *T. cruzi* revelou redução nos níveis de anticorpos contra os antígenos de *T. cruzi* e na resposta imune mediada por células, quando comparados aos controles não tratados, mostrando que os linfócitos T CD4+ são essenciais para o

desenvolvimento da resistência ao parasito (ARAUJO et al., 1989; RUSSO et al., 1988; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1992).

No modelo experimental de depleção de células T CD8+ em camundongos C57BL/6 (resistentes) e C3H/HeSnJ (susceptíveis), e posterior infecção com a cepa Brazil de *T. cruzi*, foi demonstrado que camundongos resistentes e suscetíveis para esta cepa, desenvolveram altos níveis de parasitemia e mortalidade precocemente na fase aguda da infecção, quando comparados aos animais não depletados de CD8+. Desse modo, demonstrou-se que as células T CD8+ seriam fundamentais, durante a imunidade ao *T. cruzi*, na fase aguda de infecção (TARLETON, 1990). Em outro trabalho, TARLETON e colaboradores (1992) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* em camundongos $\beta_2m^{-/-}$, ou seja, deficientes para a expressão das moléculas do MHC de classe I e conseqüentemente desprovidos de células T CD8+, resulta em alta parasitemia e morte precoce. Adicionalmente, esses animais ($\beta_2m^{-/-}$) apresentaram infiltrado inflamatório muito diminuído, quando comparado aos camundongos $\beta_2m^{+/+}$. Foi sugerido que as células T CD8+ estariam relacionadas ao recrutamento de células inflamatórias e produção de citocinas nos tecidos infectados. A infecção de camundongos deficientes em células T CD8+ causa aumento da suscetibilidade, enquanto que a infecção de camundongos deficientes em perforina ou granzima B resulta em pouca alteração na suscetibilidade destes animais quando comparados aos controles (KUMAR et al., 1998).

Desse modo, as células T CD8+, mais do que eliminar células infectadas com patógenos intracelulares via perforina/granzima B, utilizam outros mecanismos citolíticos, como a via Fas/FasL e a produção de citocinas que agem sobre macrófagos e outras células (BERKE, 1995; KAGI et al., 1996; SAD et al., 1996). A função das células T CD8+ na resistência à infecção tem sido amplamente estudada. Sabe-se que estas células estão presentes nos infiltrados inflamatórios de tecidos parasitados (SATO et al., 1992) em proporções maiores que as células T CD4+ (RUSSO et al., 1988; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1992), na fase aguda da infecção. Outro dado importante, é que a depleção de células T CD4+ e CD8+ de camundongos infectados causou aumento quantitativo de células mononucleares no infiltrado inflamatório em associação com o aumento no número de parasitos no tecido (TARLETON et al., 1994).

A suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* na ausência de células T também foi observada em modelos experimentais utilizando camundongos nu/nu (KIERSZENBAUM et al., 1979), timectomia neonatal (SCHMUNIS et al., 1971) ou pela utilização do tratamento com ciclosporina A (McCABE et al., 1985). A ausência de células T com fenótipo CD4+ e/ou CD8+ causa alterações quantitativas e qualitativas na resposta imune contra o *T. cruzi*, envolvendo o padrão de citocinas, isotipo e especificidade de imunoglobulinas. Estas alterações resultam no aumento da susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi* (ROTTENBERG et al., 1993). Outros fatores como a carga genética do hospedeiro e do parasito, o número de formas tripomastigotas inoculadas e a qualidade do sistema imune do hospedeiro também influenciam o curso da infecção (ROTTENBERG et al., 1995).

Camundongos geneticamente modificados para não expressarem linfócitos CD4+ ou CD8+, quando infectados mostraram-se suscetíveis. Nesse mesmo estudo, foi verificado que as células do baço e linfonodo de camundongos deficientes em células T CD8+ apresentaram altos níveis de mRNA para IL-4. Portanto, neste modelo experimental, o aumento da suscetibilidade ao *T. cruzi*, devido a ausência de células T CD8+, foi associado ao aumento da interleucina 4 (ROTTENBERG et al., 1993) que regula de modo negativo os mecanismos microbicidas de macrófagos (GAZZINELLI et al., 1992). Adicionalmente, o tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-IL-4, durante a infecção com *T. cruzi*, revelou baixa parasitemia (PETRAY et al., 1993), mostrando desse modo, a importância da citocina IL-4 durante a resposta imune. As células T não ativadas, uma vez ativadas, irão produzir citocinas como a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ (MOSMANN et al., 1986). A capacidade em secretar citocinas do padrão Th2 em relação ao padrão Th1 está intimamente ligada à presença de níveis suficientes de IL-4 no início da resposta imune, tanto *in vivo* como *in vitro* (LÊ GROS et al., 1990; SWAIM et al., 1990). Então, provavelmente, uma resposta imune gerada na ausência de IL-4, irá se desenvolver com o padrão de citocinas do tipo Th1. Mais tarde foi sugerida que as células T NK são as principais células produtoras de IL-4 (BENDELAC et al., 1997).

As células T CD8+ são consideradas componentes essenciais na resposta imune protetora ao *T. cruzi*, pois a sua importância foi demonstrada tanto em modelos

experimentais como em humanos (ALVAREZ et al., 2008). Durante a infecção por *T. cruzi*, foi demonstrado a predominância de linfócitos T CD8+ em tecidos não linfóides não somente em modelos experimentais, mas também no miocárdio de pacientes infectados (VOGT et al., 2008). Apesar da resposta imune efetiva dos linfócitos T CD8, o parasito pode sobreviver e persistir por toda a vida do hospedeiro (MARTIN et al., 2006). A persistência do parasito estimula constantemente o sistema imune do hospedeiro, sendo, portanto, fonte de estímulo para a manutenção da população de células T CD8 efectoras ou de memória (MARTIN et al., 2006)

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorrem alterações nos compartimentos de células T, principalmente nos órgãos linfóides, como ativação policlonal e redução da celularidade no timo, principalmente devido à depleção de timócitos duplo-positivo CD4+ CD8+ por apoptose (TALIAFERRO et al., 1955; SAVINO et al., 1989; LEITE-DE-MORAES et al., 1991) bem como alterações das populações de células T CD4+ e CD8+ (LEITE-DE-MORAES et al., 1992). Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, a atrofia tímica parece ocorrer devido ao desequilíbrio entre dois hormônios antagônicos, o glicocorticóide e a prolactina. O glicocorticóide causa aumento de apoptose dos timócitos e inibe a proliferação de timócitos duplo positivos, em contraposição aos efeitos opostos da prolactina (LEPLETIER et al., 2012).

Após a exportação das células do timo para o tecido linfóide periférico, as células T maduras localizam-se dentro de regiões de recirculação de linfócitos e expressam marcadores celulares que as caracterizam fenotipicamente como células “virgens”, “naive” ou não ativadas. Em camundongos, as células T “naive” expressam altos níveis de CD45RB e CD62L e níveis baixos ou intermediários de CD44 (SPRENT, 1993). A sobrevivência das células T “naive” requer continuo contato com peptídeos próprios através do complexo principal de histocompatibilidade combinado com a exposição à citocinas como a IL-7 e IL-15. Hipoteticamente, esses estímulos presumivelmente induzem uma forma de baixo nível de sinalização que é suficiente para a manutenção da homeostasia celular, mas não induzem a entrada no ciclo celular (SPRENT, 2001). Após estimulação, as células T diminuem ou negativam a expressão de CD45RB e CD62L e aumentam a expressão de CD44. Portanto, há uma modulação na expressão dessas moléculas sobre a superfície celular. Evidências sugerem que a actina do

citoesqueleto celular estaria regulando a redistribuição de receptores sobre a superfície celular após a estimulação das células T (KUPFER et al., 1987).

As condições necessárias para a diferenciação de linfócitos T “naive” em células efetoras ocorre após dois sinais: (1) Primeiro é necessário à ligação do TCR com o complexo peptídeo/complexo principal de histocompatibilidade e (2) através de interações das moléculas acessórias na superfície de células T com seus ligantes sobre as células apresentadoras de antígenos. Quando há a ausência do segundo sinal, os linfócitos entram em estado de anergia. Este importante mecanismo regulatório protege contra a estimulação periférica de células T auto-reativas, mas pode também levar a tolerância imunológica a antígenos externos e tumorais que não são eficientemente apresentados por células apresentadoras de antígenos profissionais (JENKINS et al., 1987; HARDING et al., 1992).

Uma vez que os linfócitos sofram ativação celular e mecanismos efetores sejam desenvolvidos contra o patógeno, este último pode ou não ser eliminado. Ao final do processo grande parte das células efetoras geradas durante a resposta imune pode ser eliminada por apoptose, uma vez que não há mais estímulo patogênico/antigênico. Cerca de 90% das células efetoras são eliminadas após o término da resposta primária, sendo assim, somente poucas células sobrevivem para tornarem-se células de memória de longa vida (SPRENT, 2001). Este processo pode ser extremamente importante na homeostasia do sistema imune, pois a sobrevivência em massa dessas células poderia resultar em um acúmulo nos tecidos linfóides e, portanto, comprometendo respostas imunes subseqüentes.

Durante a infecção ocorrem alterações quantitativas e qualitativas das diferentes subpopulações de células T CD4⁺ ou CD8⁺ quanto à expressão de marcadores de superfície. CARDILLO e colaboradores (2002) mostraram em estudos de depleção *in vivo* das células NK1.1⁺, através do tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-NK1.1, uma diminuição na geração e manutenção das células T de memória efetora e central. Mais tarde, foi demonstrado que animais deficientes em células B apresentaram maior susceptibilidade à infecção comparada ao controle, devido aos baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias e de células T CD4 e CD8 de memória central e efetora, na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (CARDILLO et al.,

2007). Estes dados evidenciaram a participação das células T de memória efetora e central na resistência à infecção por *T. cruzi*.

Adicionalmente, utilizando-se um modelo de infecção experimental em que o patógeno estimula uma resposta imune intensa e esta por sua vez seja capaz de eliminá-lo, ou seja, o patógeno não persiste como é o caso de infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV). AHMED e colaboradores (2009) utilizaram animais deficientes em células B infectados com LCMV para demonstrar que a geração de células T CD4 de memória requer a presença das células B. Adicionalmente, SUN e colaboradores (2004) mostraram que a formação de células T CD8+ de memória não é dependente de células T CD4+. Porém, a manutenção da subpopulação de células T CD8+ de memória é dependente de células T CD4+ em animais C57Bl/6 selvagens e MHC KO (“nocautes”) infectados com *Listeria monocytogenes* e o vírus LCMV. Pode-se afirmar, portanto que mesmo que haja diferenças na predominância de células T CD8+ (SUN e TARLETON, 1998) ou de células T CD4+ (RUSSO et al., 1988; ARAUJO et al., 1989; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 2001) no infiltrado inflamatório, é necessária a presença de ambas as populações celulares durante a infecção pelo *T. cruzi* para que haja uma resposta efetora apropriada, já que as células T em geral são importantes na resistência à infecção.

Pode ser ainda proposto que para a geração e manutenção de células T CD8+ é preciso haver determinadas citocinas no microambiente linfocitário. Notadamente, SPRENT (2003) descreve que o linfócito T CD8+ de memória depende da presença de interleucina 15 e interleucina 2 para se manter viável a nível periférico. No mesmo artigo, foi sugerido que estas citocinas, por sua vez, seriam capazes de induzir quantidades ótimas de secreção de IFN- γ que, juntamente com a própria IL-15, poderiam controlar a expansão destas células.

1.5. Células T $\gamma\delta$ na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

A heterogeneidade das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ + está relacionada à atividade pro e anti-inflamatória que é mediada por subpopulações distintas de células T $\gamma\delta$ + (CARDING et al., 2002; ANDREW et al., 2005). O'BRIEN e colaboradores (2000),

utilizando modelo experimental de infecção por *Listeria monocytogenes*, mostraram que as subpopulações de linfócitos T $V\gamma 1$ e $V\gamma 4$ possuem funções imunomodulatórias opostas.

Recentemente, MENGEL e colaboradores (2006), demonstraram que a subpopulação de células T $\gamma\delta^+ V\gamma 1^+$ estariam envolvidas na indução de uma resposta imune pró-inflamatória durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Utilizando modelo experimental de depleção de células $V\gamma 1^+$ de camundongos infectados por *T. cruzi* (cepa Y), foi observado aumento da suscetibilidade a infecção dos camundongos depletados juntamente a uma diminuição dos níveis de IFN- γ e aumento de IL-4 produzidas por células T convencionais, associados a um aumento da inflamação tecidual. Adicionalmente, foi observado também diminuição na conversão de linfócitos T CD4+ “naive” para células T efectoras/memória. Adicionalmente, o mesmo estudo mostra que a inativação de células $V\gamma 1^+$ leva a um aumento do número de células T CD4+CD25+, o que pode sugerir que as células T $V\gamma 1^+$ podem regular o número de células T regulatórias durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (MENGEL et al., 2006). Por outro lado, CARDILLO e colaboradores descreveram uma atividade supressora das células T $\gamma\delta^+$ em camundongos BALB/c infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (CARDILLO et al., 1993). Esta atividade supressora foi relacionada à idade do hospedeiro, estando ausente em camundongos idosos que também foram extremamente resistentes à infecção. Posteriormente, demonstrou-se que esta atividade supressora estava relacionada a presença do timo e poderia envolver a presença de células recém migradas do timo (CARDILLO et al., 1998). Desta forma, foi demonstrado que na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* as células T $\gamma\delta^+$ poderiam apresentar um papel regulatório/supressor sobre os linfócitos T convencionais, sendo que esta atividade pode estar relacionada a uma subpopulação de células $\gamma\delta^+$.

1.6. Células T reguladoras (Tregs) na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Durante o período de vida de um mamífero, células progenitoras hemoatopoiéticas migram constantemente da medula óssea para o timo, onde eles realizam um processo de diferenciação para produzir células T maduras. As células T expressam um receptor

clonalmente distribuído (TCR) que reconhece o antígeno peptídico apresentado juntamente com a molécula do MHC na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). O processo aleatório de rearranjo e recombinação gênica gera uma ampla diversidade para o conjunto de TCRs, resultando num repertório extremamente diversificado na população de células T. Conseqüentemente, essas células são capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos de patógenos, e inevitavelmente há células T que reagem contra antígenos próprios. A maioria destas células T autoreativas é “deletada” durante o desenvolvimento intratímico, em um processo denominado de seleção negativa. Entretanto, algumas células que escapam da deleção tímica irão alcançar os órgãos linfóides periféricos. Adicionalmente, as células T periféricas devem necessariamente apresentar um determinado grau de autoreatividade para o MHC/peptídeos próprios para se manterem como linfócitos maduros nos órgãos linfóides secundários. Este ponto foi elegantemente demonstrado em estudos que utilizaram transferência de linfócitos T “naive” maduros, CD4+ ou CD8+ para animais que não expressavam moléculas do MHC de classe II ou I. Uma análise posterior mostrou que os linfócitos transferidos não persistiam nesses receptores (VON BOEHMER et al., 1992; VON BOEHMER et al., 2003). Deste modo, podemos considerar que todo linfócito T dentro de um determinado organismo apresenta uma determinada avidéz (baixa) por células apresentadoras de antígenos. Tal situação permite a manutenção do repertório de células T sem, contudo, promover ativação clonal. No entanto, situações onde haja aumento da expressão de moléculas do MHC, em infecções e pela ação do IFN- γ , por exemplo, essas células poderiam ser potencialmente agressivas, pois haveria a possibilidade de ativação pelo aumento generalizado da avidéz entre células T e células apresentadoras de antígeno. Tal entendimento, juntamente com trabalhos de diferentes grupos, estudando doenças autoimunes e transplantação precipitou o desenvolvimento do conceito de células reguladoras, bem como sua caracterização (WALDMANN et al., 1993; MASON et al., 1996, SAKAGUCHI et al., 1995).

Assim como as células T convencionais, as células T regulatórias (Treg) também se diferenciam no timo, sendo denominadas de Treg naturais ou nTreg (ROMAGNOLI et al., 2012). No entanto, as Treg podem ainda se diferenciar nos órgãos linfóides

secundários, com estímulos apropriados e neste caso são denominadas de Treg induzidas ou iTreg. Desta forma, o repertório de células Treg é constituída de células específicas a auto-antígenos, denominadas de nTreg, e a antígenos não próprios, chamadas de iTreg (RUDENSKY et al., 2012; ROMAGNOLI et al., 2002; HSIEH et al., 2011).

SAKAGUCHI e colaboradores (1995) demonstraram que a transferência de células esplênicas, depletadas de células CD25+, em camundongos BALB/c atímico nude (nu/nu) induzia doença autoimune tecido-específica como tireoidite, gastrite, insulite, glomerulonefrite e outras. Ademais, a transferência de células T CD4+CD25+ resultou na prevenção do desenvolvimento da síndrome autoimune. Estes dados evidenciaram que as células T CD4+CD25+ contribuem na manutenção da tolerância imunológica a antígenos próprios. Em trabalho posterior, SAKAGUCHI e colaboradores (1996) relacionaram a síndrome autoimune desenvolvida após a timectomia neonatal (até o 3º dia após o nascimento) em camundongos a um retardo no aparecimento de células Treg. Os autores mostraram que as células T CD4+CD25+ iniciam seu desenvolvimento tímico após o 3º dia de nascimento, aumentando progressivamente até a 2ª semana de vida, na qual atingem níveis próximos ao do adulto (cerca de 10% das células CD3+ CD4+). Estas doenças autoimunes apresentam aumento de anticorpos auto-reativos na circulação, como por exemplo, anticorpos específicos contra células parietais gástricas, tireoglobulina e DNA dupla-fita. Tal fato sugere que as células CD4+CD25+ exerceriam uma ação reguladora também sobre as células B (BYSTRY et al., 2001).

Outros estudos mostraram que as células T reguladoras não estavam relacionadas apenas com o controle da tolerância a antígenos próprios, mas também, que estas células controlam a resposta imune a antígenos não próprios. Foi demonstrado (MUCIDA et al., 2005) que as células Treg são fundamentais no desenvolvimento da tolerância oral à Ovalbumina. Em outros modelos experimentais demonstrou-se que a diminuição de células Treg está envolvida no desenvolvimento de doença inflamatória intestinal, fato este que foi correlacionado com uma resposta imune exacerbada contra bactérias comensais da flora intestinal (SINGH et al., 2001). Ademais, outros autores mostraram que a depleção de células CD4+CD25+ ou o

bloqueio da molécula de CTLA-4 que está presente nas células Treg resultou em efetiva resposta contra tumores (ALLISON et al., 2001; BELKAID e ROUSE, 2005).

De acordo com os trabalhos citados acima, as células T reguladoras apresentam a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e um marcador considerado essencial na diferenciação destas células, o fator de transcrição Foxp3. A importância do fator de transcrição Foxp3 foi evidenciada inicialmente, em estudos utilizando uma linhagem de animais chamada Scurfy, que apresentam mutação no gene Foxp3. Esta linhagem de camundongo desenvolve uma doença letal ligada ao cromossomo X, que resulta em hiperproliferação e ativação linfocitária contra antígenos próprios em microambiente ausente de linfócitos T regulatórios (BRUNKOW et al., 2001). Em humanos a deleção funcional do Foxp3 tem sido observada nos pacientes portadores da síndrome IPEX (Do inglês “Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and Enteropathy X-linked syndrome”), caracterizada clinicamente por múltiplas doenças autoimunes, incluindo diarreia, eczema, diabetes com destruição das glândulas endócrinas, insulinite e tireoidite, acometendo crianças do sexo masculino e culminando com óbito precoce, ao redor de 2 anos de idade (GAMBINERI et al., 2003). Desta forma, semelhanças imunológicas e clínicas entre IPEX em humanos e autoimunidade produzida em modelos experimentais de animais pela depleção de células Treg permitiram aos pesquisadores associar a possível função de Foxp3 no desenvolvimento e função das células Treg (HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003; FONTENOT et al., 2003). Para reforçar tais dados, estudos de HORI e colaboradores (2003) revelaram que células T CD4⁺CD25⁺ periféricas e timócitos CD8⁻CD4⁺CD25⁺ de camundongos normais expressam Foxp3, enquanto que outras células T e timócitos não expressam. Além disso, o mesmo grupo mostrou que a transdução retroviral ectópica do gene Foxp3 em células T CD4⁺CD25⁻ foi capaz de convertê-las em células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras que foram capazes de suprimir a proliferação de outras células T convencionais em experimentos *in vitro* e inibir o desenvolvimento de doença autoimune *in vivo*. Outro dado importante, na determinação da função do Foxp3 na diferenciação das células Treg, foi obtido em estudo de reconstituição de medula óssea de animais deficientes em células T. Estes animais foram reconstituídos com uma mistura de células da medula de animal deficiente em Foxp3 e de animal normal. O resultado demonstrou que as células

Treg Foxp3⁺ que se diferenciaram no animal receptor, foram originadas das células da medula do animal normal (FONTENOT et al., 2003).

Adicionalmente à subpopulação de células Tregs de desenvolvimento intratímico, denominada linfócitos Tregs naturais (nTregs), sugere-se que outras subpopulações de células Treg possam desenvolver a partir de células T CD4⁺ “virgem” ou “naive” periféricas. Estas são denominadas de células Tregs induzidas ou adaptativas (iTreg ou aTreg). Dentre as aTreg, são descritas duas subpopulações: a primeira chamada Tr1, que se desenvolve na presença de IL-10 e tem como característica a secreção de IL-10 e a ausência do fator de transcrição Foxp3 (GROUX et al., 1997; WAKKACH et al., 2003); a segunda é diferenciada na presença de TGF- β e ácido retinóico e podem expressar Foxp3 (CHEN et al., 2003; FANTINI et al., 2004, MUCIDA et al., 2007). As células nTreg por sua vez, apresentam alta expressão de receptor de IL-2 (CD25) e expressam o fator de transcrição Foxp3 que é necessário para o seu desenvolvimento intratímico (SAKAGUCHI et al., 2004). A expressão de Foxp3 em linfócitos T CD4⁺CD25⁻ convencionais induz ao desenvolvimento das características funcionais e fenotípicas similares aos das nTregs, como a expressão de CD25, receptor de TNF induzido por glucocorticóide (GITR), e CTLA-4 (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003; WALKER et al., 2003). Estudos recentes indicam que a expressão de Foxp3 e a função reguladora das nTreg não necessita de IL-2 ou CD25. Por outro lado, ambos (IL-2 e CD25) seriam necessários para a homeostasia de nTreg após a exportação tímica (D'CRUZ et al., 2005; FONTENOT et al., 2005). Portanto, as doenças autoimunes que são associadas à diminuição ou ausência de Treg em camundongos deficientes para IL-2, IL-2R α ou IL-2R β (WOLF et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; MALEK et al., 2002) podem ser devidas à deficiência no desenvolvimento e manutenção de nTreg periféricas, e não a um defeito no desenvolvimento intratímico. Outro efeito relevante observado em camundongos deficientes em IL-2 ou CD25 foi a diminuição da expressão de TGF- β 1 (FONTENOT et al., 2005), que parece ser importante na manutenção da expressão de Foxp3 (MARIE et al., 2005).

A importância biológica da IL-2 foi mostrada inicialmente em animais deficientes para a produção de IL-2 (SCHORLE et al., 1991) ou em animais deficientes do receptor de IL-2R (SUZUKI et al., 1995; WILLERFORD et al., 1995). Nesses dois modelos os

animais apresentam doença linfoproliferativa fatal de maneira similar ao modelo animal de Scurfy. Mais tarde, modelos experimentais de neutralização da IL-2 com anticorpo monoclonal anti-IL-2 mostraram que este procedimento induz gastrite autoimune em camundongos BALB/c. De modo similar, o tratamento de camundongos NOD (Do inglês - “Non-Obese Diabete”) resulta em progressão da doença mais precocemente e o aparecimento de outras doenças como gastrite, tireoidite e neuropatia (SAKAGUCHI et al., 2004). Apesar de ter sido demonstrado que a IL-2 seja necessária para a manutenção periférica das células Treg, as próprias células Treg não sintetizam esta citocina. Em camundongos normais “naive”, foi mostrado que as células T não reguladoras CD4⁺ CD25^{baixo} transcrevem ativamente o gene da IL-2 e secretam a proteína IL-2 neste estado fisiológico. Desse modo, a principal fonte de IL-2 para a manutenção de nTreg parece ser outras células T, especificamente células T CD4⁺ CD25^{baixo} (SAKAGUCHI et al., 2004).

A expressão de Foxp3, nas células Treg, inibe a síntese de IL-2 e aumenta a expressão do receptor de IL-2 (CD25). Alguns estudos têm demonstrado que a capacidade das células Treg de utilizar a IL-2 durante uma resposta imune é um dos mecanismos pelos quais as células Treg controlam as células T efetoras convencionais que necessitam de IL-2 para proliferação após a ativação celular (TAKAHASHI et al., 1998; THORNTON e SHEVACH, 1998). Sugere-se que este mecanismo de supressão envolvendo a IL-2 ocorra de maneira indireta, pois o contato celular entre as células apresentadoras de antígenos (APC) com as células Treg resulta na interação das moléculas de CD80/86 da primeira com a molécula CTLA-4 da segunda, consumindo a IL-2 do microambiente (DE LA ROSA et al., 2004). Esta interação de moléculas coestimulatórias resulta em sinalização de inibição da expressão de moléculas coestimulatória, levando a célula APC a não exercer sua função de apresentação de antígeno. Adicionalmente, o consumo de IL-2 do microambiente resulta em ativação ineficiente das células T efetoras convencionais, resultando em pouca proliferação e/ou apoptose (PANDIYAN et al., 2007).

Além do possível mecanismo de supressão mediado pelo consumo de IL-2, as células T reguladoras Foxp3⁺ exercem sua atividade imunoreguladora através de outros mecanismos: citocinas inibitórias e contato celular. O mecanismo dependente de

contato celular é a interação das células Treg expressando CTLA-4 com moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno. A molécula de CTLA-4 é expressa em altos níveis em células T CD4+CD25+, parecendo ser crucial na função das Treg tanto *in vitro* como *in vivo* (ALLISON et al., 2004; SAKAGUCHI et al., 2004; SAKAGUCHI et al., 2001; MALOY et al., 2003). Esta interação resulta na ativação de uma enzima, presente nas células dendríticas, chamadaIDO (indoleamina 2,3 dioxigenase) que apresenta função imunoreguladora sobre células T efectoras (MELLOR et al., 2004). IDO cataliza a conversão de triptofano em kineurina e esta última apresenta efeito imunossupressor sobre as células efectoras do microambiente (MIYARA et al., 2007). Um segundo mecanismo parece ser mediado por citocinas. Neste caso, duas citocinas produzidas por células Treg apresentam atividade imunomodulatória: a IL-10 e o TGF- β .

A IL-10 e o TGF- β apresentam atividade inibitória quanto à expressão de MHC classe II e de moléculas coestimulatórias em células dendríticas, resultando em diminuição na apresentação antigênica aos linfócitos T, tanto em humanos como em camundongos (STROBL et al., 1999; IVARS et al., 2000; MOORE et al., 2001). Apesar de diversos estudos terem demonstrado mecanismos imunoregulatórios exercidos pelas células Treg, ainda não há consenso entre os diversos grupos (RUDENSKY e CAMPBELL, 2006; SAKAGUCHI et al., 2009; SHEVACH, 2009).

Desta forma, além da manutenção da tolerância a antígenos próprios, os mecanismos imunoregulatórios exercidos pelas células Treg também devem estar ativos em uma resposta imune a antígenos não próprios, incluindo infecções por diferentes patógenos. Estudos iniciais mostraram que durante a infecção de animais com *Plasmodium spp* há um aumento de células T CD4+CD25+Foxp3+ que resulta em aumento da resposta anti-inflamatória, favorecendo o aumento da parasitemia e desenvolvimento do processo infeccioso pelo parasito (MINIGO et al., 2009; TODRYK et al., 2008).

Na tentativa de elucidar o papel das células T reguladoras no modelo experimental de infecção por *T. cruzi*, alguns grupos de pesquisa utilizaram do modelo de depleção direta das células Treg através do tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD25. KOTNER e TARLETON (2007) demonstraram que a depleção de células

CD25+ *in vivo* não resultou em alterações significativas nos mecanismos efetores e parasitemia, durante a fase aguda da infecção. SALES e colaboradores (2008), utilizando-se do mesmo modelo de depleção, porém, com uma cepa diferente (Colombiana), observaram que os animais depletados de CD25+ apresentaram-se discretamente mais resistente à infecção. Os dados mostraram aumento da população de células T CD4+ efectoras com diminuição da parasitemia e da mortalidade, na fase aguda da infecção. No mesmo ano, MARIANO e colaboradores (2008), demonstraram que os animais depletados de CD25+ apresentaram aumento da mortalidade e nenhuma alteração significativa nos mecanismos efetores. Desta forma, as investigações realizadas até este momento sobre as células Treg na infecção experimental ao *T. cruzi*, ainda são inconclusivas, apesar dos resultados apresentarem um consenso de que há uma participação limitada da célula Treg na infecção pelo *T. cruzi*. Este consenso nos diferentes estudos apresentados, pode ser devido à semelhança do modelo experimental, que foi o tratamento *in vivo* com anticorpo monoclonal anti-CD25 (clone PC61).

Estudos de infecção com *Leishmania major*, mostraram que a imunossupressão exercida pelas células Treg estariam favorecendo a persistência do patógeno na pele, após a infecção intradérmica (LEE et al., 2011). Outro estudo mostrou que a depleção seletiva de células T Foxp3+ em modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, resultou em uma resposta imune pró-inflamatória mais robusta e redução da infecção (MONTROYA et al., 2004).

Sendo assim, se as células Treg exercerem sua atividade imunoreguladora logo no início da infecção, a resposta imune necessária para o controle inicial da parasitemia estaria suprimida e os níveis parasitários poderiam aumentar, podendo resultar no agravamento da doença. Em contraste, a diminuição de sua atividade imunomodulatória no início da infecção, resultaria em aumento da resposta imune efetora, com diminuição da parasitemia e aumento da destruição tecidual. Por outro lado, as células Treg podem ser benéficas ao hospedeiro, no final da infecção, quando a parasitemia está sendo controlada, realizando uma imunomodulação inibitória da resposta inflamatória, prevenindo possíveis respostas imunes indesejadas. Desta forma, através dos estudos apresentados, infere-se que o equilíbrio imunomodulatório

das respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ser a melhor maneira de se eliminar o patógeno com pouca destruição tecidual.

Neste projeto utilizamos o bloqueio da citocina IL-2, com o tratamento *in vivo* com anti-IL-2, durante a infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Nossos dados demonstraram que o tratamento com anti-IL-2 resultou em diminuição significativa da população de células T CD4+CD25+Foxp3+ nos animais infectados, comparado ao infectado e não tratado. A diminuição das células Treg nestes animais resultou em alterações importantes nos mecanismos efetores como, por exemplo: o aumento da expansão das células T CD4+ e CD8+ efetoras e a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, no baço e tecido muscular esquelético. O reflexo destas alterações foi verificado através da diminuição da parasitemia e aumento da sobrevivência dos animais. Este perfil da resposta imune de maior resistência à infecção é semelhante ao perfil de resistência encontrado nos animais BALB/c (resistente), quando comparado ao C57Bl/6 (susceptível). Desta forma, as células Treg parecem exercer um controle da resposta imune efetora ao *T. cruzi* no sentido de permitir a tentativa de controlar a disseminação do patógeno e, ao mesmo tempo, impedir a destruição tecidual excessiva decorrente de uma potente resposta imune. Portanto, sugerimos que as células Treg estariam participando da resposta imune ao *T. cruzi* no sentido de modular a resposta imune efetora.

2. JUSTIFICATIVA

A subpopulação de linfócitos T reguladoras tem sido amplamente estudada em diversos modelos experimentais, incluindo modelos de autoimunidade (por exemplo: Lupus eritematoso, Encefalomielite, Diabetes tipo 2) e de infecção experimental (por exemplo: *Pneumocystis carinii*, *Cândida albicans*, *Leishmania major*, HIV e HCV). Durante a infecção, a interação entre o hospedeiro e o patógeno pode variar, em dois extremos: descontrole no crescimento até a eliminação completa do patógeno. O controle excessivo da resposta imune efetora por linfócitos Treg pode resultar em grande crescimento do patógeno e conseqüentemente morte do hospedeiro. Ao contrário, a neutralização da função das células Treg pode restaurar a capacidade do hospedeiro em controlar de modo eficiente a infecção, porém, esta situação pode levar a imunopatologia. Poucos estudos da participação das células Treg na resposta imune ao *T. cruzi* foram realizados até o momento. Durante a infecção por *T. cruzi*, a resposta imune não consegue eliminar o protozoário completamente, resultando na sua persistência em tecidos periféricos. É necessário esclarecer os mecanismos imunorregulatórios envolvidos na resposta imune ao *T. cruzi*, de modo a verificar a participação das células Treg e outras subpopulações celulares. O esclarecimento das características e funções das células Treg neste modelo experimental, poderia acrescentar informações no auxílio da elaboração de novos tratamentos, visando o controle da infecção e suas patologias.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

O objetivo principal deste projeto foi investigar a formação de células T de memória CD4+ e CD8+ em camundongos susceptíveis e resistentes a cepa Tulahuen do *T. cruzi*, avaliando o papel das células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) no controle da geração destas células de memória durante a infecção aguda.

3.2. Objetivos específicos:

1. **Estudo comparativo para verificar a importância dos linfócitos T na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*, de animais susceptíveis (C57Bl/6) e resistentes (BALB/c).**

Em nossos estudos utilizamos duas linhagens de camundongos diferentes, C57Bl/6 e BALB/c considerados susceptíveis e resistentes, respectivamente. Utilizamos o modelo de infecção pela cepa Tulahuen para analisar inicialmente os parâmetros de resistência à infecção (parasitemia e mortalidade). Analisamos ainda, de modo quantitativo e qualitativo, as populações de linfócitos T quanto ao número, fenótipo de memória e produção de diferentes citocinas (IFN- γ , IL-10 e TNF- α).

2. **Estudo da influência das células T reguladoras nos padrões de resistência na infecção experimental pelo *T. cruzi*.**

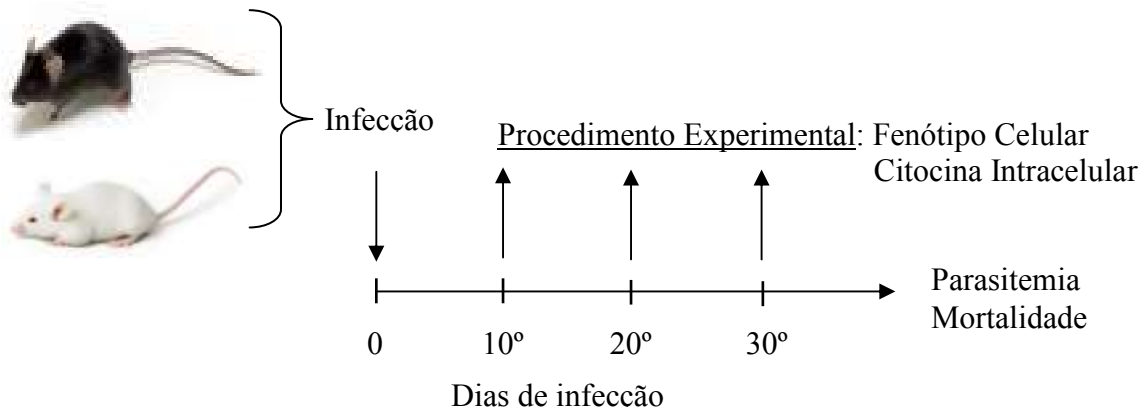
Neste conjunto de estudos, utilizamos a depleção da IL-2 pelo tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais neutralizantes para diminuir os números das células T reguladoras, durante a infecção aguda em camundongos susceptíveis. Dessa forma, alterando a quantidade e qualidade das células T reguladoras, verificou-se a influência destas sobre a geração e manutenção de linfócitos T de memória central

e efetora, bem como as citocinas produzidas por estas células, durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

4. DESENHO EXPERIMENTAL

Objetivo específico 1.

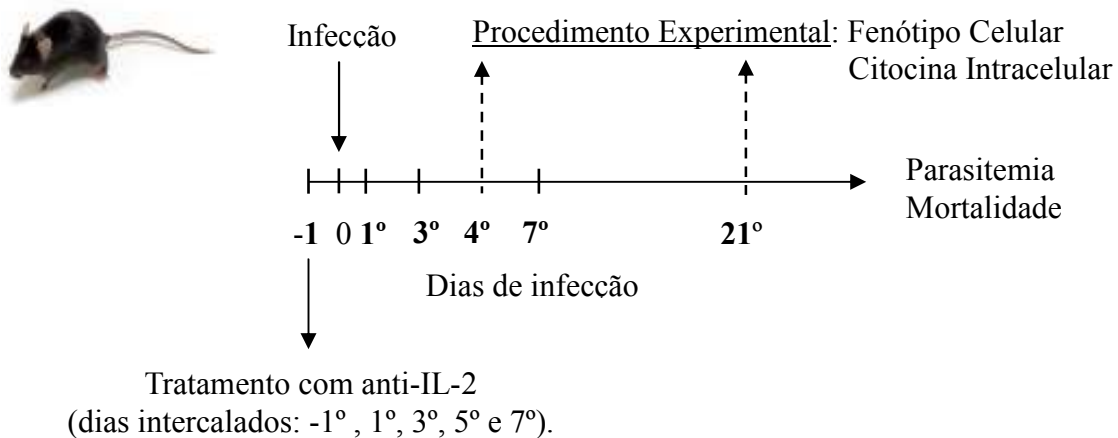
Estudo comparativo da importância dos linfócitos T na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*, de animais susceptíveis (C57Bl/6) e resistentes (BALB/c).



- Grupos Controles: BALB/c e C57Bl/6 não infectados.

Objetivo específico 2.

Influência das células T reguladoras nos padrões de resistência a infecção experimental por *T. cruzi*.



- Grupos Controles: C57Bl/6 não infectados e C57Bl/6 infectado e tratado com Imunoglobulina de rato.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais.

Foram utilizados camundongos fêmeas, das linhagens C57Bl/6, BALB/c de 4 a 6 semanas, criadas e mantidas no Biotério de Animais Isogênicos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPqGM-FIOCRUZ, Bahia. Os protocolos experimentais aqui utilizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

5.2. Parasitos.

Foi utilizada a cepa Tuhauen de *T. cruzi*, que segundo o novo consenso de classificação das cepas (ZINGALES et al., 2009), a mesma é caracterizada como DTU VI. Atualmente, foi adotada por consenso dos diversos grupos de pesquisa, uma classificação padrão, na qual as cepas são divididas em seis unidades discretas típicas (DTUs), utilizando-se todo o conhecimento acumulado em todas as outras classificações propostas anteriormente (ZINGALES et al., 2009).

O parasito *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen foi mantido por passagens seriadas quinzenais em camundongos C57Bl/6, através da administração, por via intraperitoneal, de 10^3 formas tripomastigotas/animal.

Para infecção dos grupos experimentais, foi utilizado o método utilizado no trabalho de CARDILLO e colaboradores (2004) e que será descrito a seguir: o sangue dos camundongos na fase aguda de infecção foi coletado e acondicionado em microtubos contendo heparina. Após determinação do número total de parasitos por ml de sangue do animal, uma alíquota do sangue foi então diluída em solução tampão de fosfato (PBS). A partir da solução diluída contendo o número de formas tripomastigotas definido, 0,2 ml foi injetado via intraperitoneal em camundongos. Animais C57Bl/6 e BALB/c foram infectados para análise em diferentes dias de infecção (10, 20 e 30 dias) quanto à resposta imune celular e humoral.

5.3. Determinação do número de parasitos no sangue circulante (parasitemia).

O número de parasitos circulantes foi obtido em diferentes dias após a infecção, segundo método previamente descrito por MELO e BRENER (1978). Posteriormente, os dados foram compilados graficamente para visualização da cinética da parasitemia no animal. Foi determinada também a taxa de sobrevivência/mortalidade do animal.

5.4. Protocolo de neutralização da citocina.

Como demonstrado por BOYMAN e colaboradores (2006) o anticorpo anti-IL-2 (Clone JES6-1A12) é capaz de neutralizar a citocina IL-2 *in vivo* de maneira eficiente. Sendo assim, o procedimento para a neutralização de citocina IL-2 circulante, foi realizado através da injeção intravenosa de anticorpo monoclonal anti-IL-2, Clone JES6-1A12 (500 µg/injeção/dia). O protocolo de tratamento com anti-IL-2 foi realizado da seguinte maneira: o tratamento iniciou-se um dia antes (dia -1) da infecção de animais C57Bl/6 por *T. cruzi*, sendo que esse tratamento teve prosseguimento em dias intercalados até o 7º dia de infecção, seguindo-se assim, nos dias 1º, 3º, 5º e 7º de infecção. Como controle experimental, outro grupo de animais C57Bl/6 foi infectado e submetido à injeção endovenosa de Imunoglobulina de rato com o mesmo protocolo. Os animais foram submetidos à eutanásia para procedimento experimental, no 4º e 21º dia de infecção. Todos os experimentos foram repetidos ao menos duas vezes.

5.5. Isolamento de células mononucleares do músculo estriado esquelético.

A separação das células mononucleares foi realizada por método previamente padronizado e descrito em trabalho realizado por CARDILLO e colaboradores (2007). O tecido muscular, retirado dos animais de diferentes grupos, foi previamente separado do tecido ósseo, cortado em pequenos pedaços e tratado com 1 mg/ml de colagenase, tipo IV (Sigma-Aldrich), diluída em PBS, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células mononucleares provenientes do músculo esquelético foram separadas através de gradiente descontínuo de Percoll (Pharmacia, Biothec), coletadas na interface 40-80%. As células mononucleares foram então obtidas, com o auxílio de pipetas Pasteur, na interface entre as soluções de Percoll 40 e 80%. Estas células foram então lavadas por centrifugação a 197 x G por 10 minutos a 4°C, com PBS/SFB/Azida. Terminadas as

lavagens, foi determinado o número de células por mililitro através da contagem em câmara de Neubauer. Após esses procedimentos a célula foi submetida à marcação de moléculas de superfície celular e análise por citometria de fluxo. É importante ressaltar que o número de células mononucleares que pode ser obtida do músculo esquelético de animais cronicamente infectados apresenta grande variação numérica entre experimentos.

5.6. Preparação de células esplênicas ou de células mononucleares provenientes do infiltrado inflamatório do tecido muscular para citometria de fluxo.

Baços de camundongos provenientes de diferentes grupos experimentais foram extraídos e submetidos ao processo de homogeneização. As células mononucleares do infiltrado inflamatório do músculo esquelético foram obtidas como descrito acima em item 5.5. A preparação de células mononucleares esplênicas ou do tecido muscular para a marcação com anticorpo conjugado ao fluorocromo é semelhante, descrita a seguir. Após a obtenção das células mononucleares esplênicas ou do tecido muscular, elas foram lavadas por 2 vezes, com PBS, por centrifugação a $197 \times G$ por 10 minutos a $4^{\circ}C$. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi ressuspenso em PBS e após os primeiros “debris” (sedimentos) se depositarem no fundo do tubo, retirou-se a solução para outro tubo a fim de excluí-los. Terminado o processo, foi realizada outra centrifugação e por fim as células foram diluídas em cerca de 3 ml de PBS. Para melhor preservação das células os tubos foram acondicionados em isopor contendo gelo. Após as lavagens, o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Ao obter o número de células por mililitros, foram preparadas diluições contendo 2×10^6 células em cada 100 μl . As células foram, então, distribuídas em placas de 96 poços (Falcon), na concentração de 2×10^6 /poço e as placas foram, posteriormente, centrifugadas a 2000 rpm por 3 segundos. Em seguida o líquido dispensado e as placas foram, cuidadosamente, colocadas para “agitação” no aparelho Vortex. Após este procedimento foi adicionado em cada poço cerca de 100 μl de tampão de FACS (PBS/Soro Fetal Bovino/Azida). Terminado o processo, as células estavam prontas para serem utilizadas no processo de marcação de moléculas de superfície e de moléculas intracelulares para análise posterior em citômetro de fluxo (BD Facsorter).

5.7. Marcação de moléculas de superfície para determinação de fenótipo celular.

Os esplenócitos totais e as células mononucleares do músculo esquelético/coração foram ressuspensas, na concentração de 2×10^7 células/ml, em PBS/SFB/Azida. Alíquotas de 100 μ l das suspensões celulares foram incubadas, por 20 minutos a 4°C e protegidos da luz, com os seguintes mAbs: anti-TCR $\alpha\beta$, anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com isotiocianato de fluoresceína; anti-CD62L, anti-CD69, anti-CD44 e anti-CD25 conjugados com ficoeritrina; além de reagentes controles para bloqueio do receptor de Fc (reagentes obtidos da BD bioscience). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes por centrifugação e ressuspensas em 0,5 ml de PBS/Azida. As suspensões de células foram lidas em citômetro de fluxo (FACSsort, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). A partir da frequência das subpopulações e o número total de células, calculou-se o número total de células de um determinado fenótipo nos órgãos linfóides. A análise dos dados obtidos pelo método descrito acima foi realizado de acordo com o descrito no trabalho de CARDILLO e colaboradores (2007).

5.8. Marcação para citocina intracelular e Foxp3 (intranuclear) de esplenócitos *ex vivo*.

Para marcação de citocinas intracelular, foi necessária a realização de cultura das células a serem analisadas. Os esplenócitos totais foram colocados em cultura com ou sem estímulo (anti-CD3/anti-CD28 para esplenócitos totais) associados a “Brefeldin” (“StopGolgi”) (Pharmingen) para impedir que as células secretem as citocinas que se acumulam no citoplasma. Desse modo, após incubação por 12 horas com “Brefeldin”, as células foram submetidas à marcação de moléculas de superfície. Após esta marcação, as células foram lavadas por duas vezes em tampão PBS/SFB/Azida e adicionou-se 100 μ L de fixador (“Citofix” – Pharmingen) por 45 minutos a 10° C. Após esta incubação centrifugou-se a placa a 2000 rpm, 10° C por 15 segundos. Lavou-se duas vezes em 200 μ L com solução contendo detergente para permeabilização (“PermWash”– BDbioscience). Após ressuspensão por “agitação” no vortex, foram adicionados os anticorpos anti-citocina (anti-IL-10, anti-IFN ou anti-TNF, conjugados à ficoeritrina, diluídos em PermWash), incubando-se as placas por 45 minutos adicionais.

Ao fim da incubação, as células foram lavadas por duas vezes com 100 μ l de “PermWash” e por fim suspensas em 100 μ L de PBS e posteriormente, lidas em citômetro de fluxo.

Para detecção intracelular do fator de transcrição Foxp3 (conjugado ao Cy), foram utilizados reagentes específicos para essa marcação. Após marcação por anti-CD4 (alexa) e Anti-CD25 (fitc), os esplenócitos foram incubados por 1 hora com solução específica para marcação intranuclear conforme indicação do fabricante (eBioscience). Após este período as células foram centrifugadas a 2000 rpm, 15 segundos e 10° C, para descartar o fixador e foram então acrescentados 100 mL de solução permeabilizante contendo detergente do mesmo fabricante (eBioscience). As células foram lavadas por 2 vezes com o tampão permeabilizante e por fim incubadas por 1 hora com o anticorpo anti-Foxp3, diluído em permeabilizante na temperatura de 10° C. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com detergente e ressuspensas em PBS. A mensuração de Foxp3 foi realizada nos 7°, 14° 21° dias de infecção durante o procedimento experimental de cinética de infecção na qual foram comparados os grupos BALB/c e C57Bl/6 infectados. E nos 4° e 21° dias de infecção dos animais C57Bl/6 durante o procedimento de neutralização da citocina IL-2.

5.9. Avaliação histológica

Os camundongos foram submetidos à eutanásia ao final do experimento, e amostras de tecidos de músculos esquelético para posterior análise histológica, especificamente uma análise morfométrica. Uma parte dos fragmentos foi fixada em solução de PBS-10% (v/v) de formaldeído (Merck), emblocada em parafina e os cortes histológicos foram corados por H.E. As secções histopatológicas de tecido muscular esquelético coradas com H.E. foram visualizadas em microscópio óptico e analisadas por estudo duplo-cego e o infiltrado foi quantificado morfologicamente com a ajuda do software Axio-Vision 3.1 (1998-2002). Para tanto, foram selecionados aleatoriamente 10 campos microscópicos (400x) de cada caso (lâminas em duplicata) e as células mononucleares infiltrantes contadas, sendo sua densidade expressa em células infiltrantes/mm² de tecido.

5.10. Forma de análise dos resultados

A comparação entre os grupos experimentais foi feita utilizando-se o teste U Mann-Whitney. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. Para análise dos dados de parasitemia foi utilizado o teste t student, teste não paramétrico Mann-Whitney, na qual foi considerado significativo, quando $p < 0,05$. Para análise da curva de sobrevivência foi utilizada teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon, no qual foi considerado significativo aquele com $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação dos padrões de resistência e susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* utilizando-se a cepa Tulahuen em camundongos BALB/c e C57Bl/6, respectivamente.

6.1.1. Comparação dos níveis parasitêmicos de animais C57Bl/6 e BALB/c infectados com a cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*.

Nessa primeira fase experimental nosso objetivo foi infectar animais C57Bl/6 e BALB/c para obter grupos de animais em fase aguda de infecção pelo *T. cruzi*. Assim, utilizando-se de método descrito no item Material e Métodos, foram obtidos os gráficos de parasitemia dos diferentes grupos ao longo da infecção até aproximadamente 60 dias após (Fig.1). Podemos observar na figura 1 que os animais C57Bl/6 infectados apresentaram níveis parasitêmicos semelhantes ao de animais BALB/c infectados até o 23º dia de infecção. Após esse dia, animais C57Bl/6 apresentam um pico no vigésimo quinto dia de infecção, que foi significativamente maior que o encontrado nos animais BALB/c. Posteriormente, os níveis decrescem e no 30º dia após a infecção, os níveis parasitêmicos de ambos os grupos se igualam e permanecem assim até 60º dia.

6.1.2 Curva de sobrevivência.

Através da comparação da porcentagem de sobrevivência dos diferentes grupos experimentais, os animais C57Bl/6 mostraram maior susceptibilidade comparado ao grupo BALB/c, de maneira estatisticamente significativa. Notadamente, os animais C57Bl/6 foram os primeiros a apresentar mortalidade já no 24º dia de infecção. Em contrapartida, o grupo BALB/c apresentou o primeiro óbito no 51º dia de infecção. A mortalidade no grupo C57Bl/6 alcançou 60% ao final dos 60 dias e, portanto maior do que BALB/c com apenas 20% de mortalidade neste mesmo período de tempo (Fig. 2)

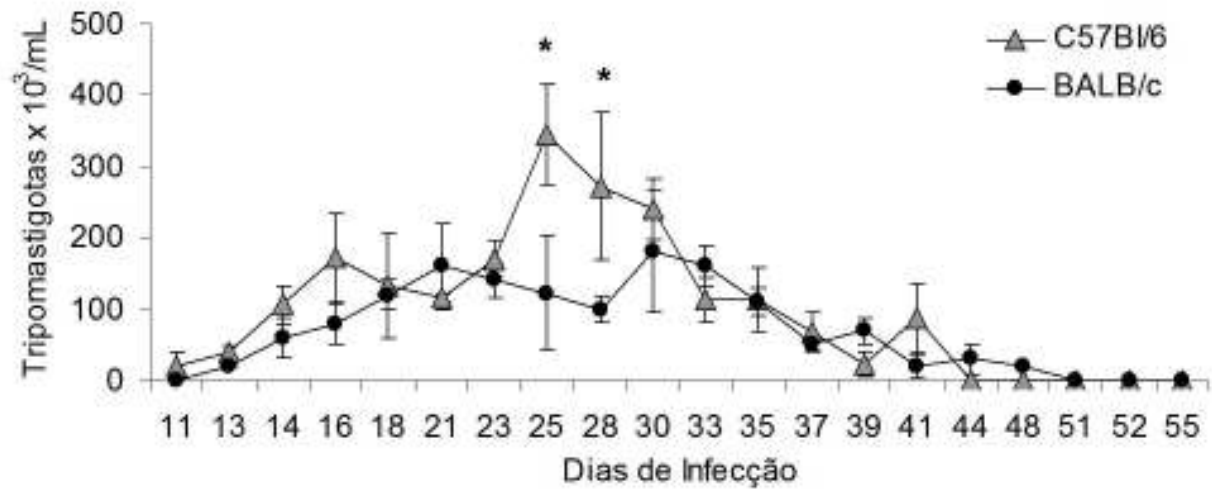


Figura 1. Números de parasitos circulantes (parasitemia). Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram infectados por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen e a parasitemia foi determinada nos dias indicados. Grupo: n=10. Teste Estatístico t student *(p<0,05), teste não paramétrico Mann-Whitney. Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

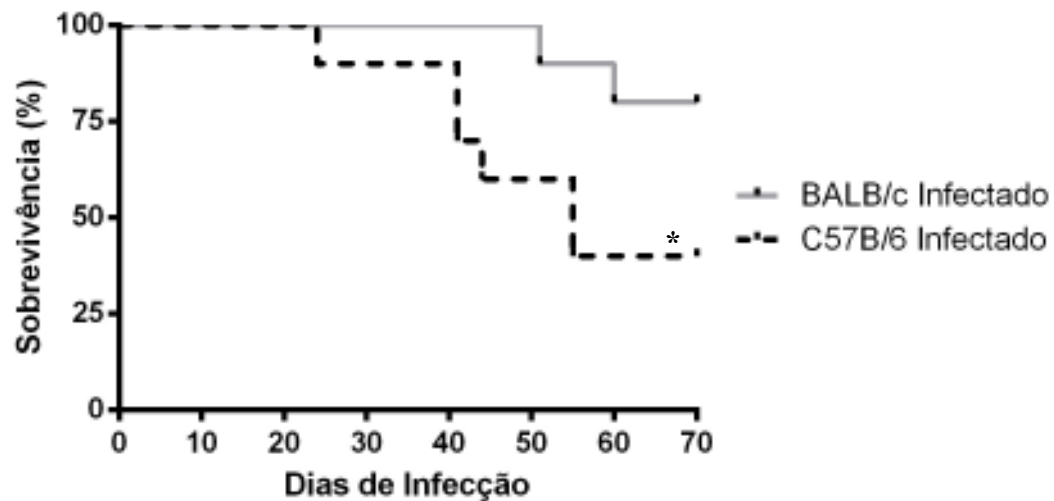


Figura 2. Curva de sobrevivência. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram infectados por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen e a mortalidade foi determinada nos dias indicados. n=10. Estatística: Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon: *p<0,05. Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.1.3. Número total de células do baço dos animais de diferentes grupos experimentais na fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção pelo *T. cruzi*.

Os resultados da figura 3 mostram que animais BALB/c apresentaram número total de células do baço maior que dos animais C57Bl/6 nos dias 20 e 30 da infecção aguda, sugerindo que os animais BALB/c apresentam maior proliferação de células esplênicas na fase aguda da infecção, quando comparados aos animais C57Bl/6 (Fig. 3A).

Quando comparamos o número de linfócitos T CD4+, observa-se que ocorre uma pequena diminuição destas células no baço de animais C57Bl/6 no 10º e 20º dias de infecção, comparado ao controle não infectado. Diferentemente, o número de células T CD4+ aumenta no 10º e 20º dias de infecção em animais BALB/c (Fig. 3B). No 30º de infecção o número de células T CD4+ nos animais C57Bl/6 aumenta. Porém, iguala-se ao número de células T CD4+ presente no animal controle não infectado. Por outro lado, o número de células T CD4+ aumenta significativamente nos animais BALB/c, no 30º dia de infecção, comparado ao seu controle não infectado (Fig. 3B).

Estes dados evidenciam que os animais susceptíveis a infecção (C57Bl/6) apresentam diminuição de células T CD4+ após a mesma (10 e 20 dias após a infecção), ocorrendo normalização no 30º dia de infecção. Em contrapartida, os animais resistentes apresentam expansão de células T CD4+ logo no início (10º dia) e que se mantêm ao 20º dia, aumentando significativamente no 30º dia.

Os linfócitos T CD8+ também apresentam alterações significativas quando comparamos os grupos susceptíveis e resistentes. Os animais C57Bl/6 apresentaram diminuição significativa no número de linfócitos T CD8+ no 10º de infecção, comparado ao controle não infectado. No 20º dia de infecção, houve um aumento discreto, porém, não significativo, comparado ao controle. E no 30º dia houve redução significativa quando os números foram comparados aos controles. Portanto, além da diminuição de células T CD4+, os animais susceptíveis também, apresentaram diminuição de linfócitos T CD8+ no início da infecção.

Quando analisamos a expansão destas células em um animal considerado resistente, observamos diferenças significativas no 20º e 30º de infecção. Neste ponto,

há um aumento estatisticamente significativo de linfócitos T CD8+ comparado ao controle não infectado, na proporção de 4x e 5,5x, respectivamente (Fig. 3C).

Estes dados mostram que a expansão celular evidenciada pelo número total de células esplênicas nos animais resistentes (BALB/c), ocorreu devido à expansão seletiva de linfócitos T CD4+ e CD8+, especialmente desta última.

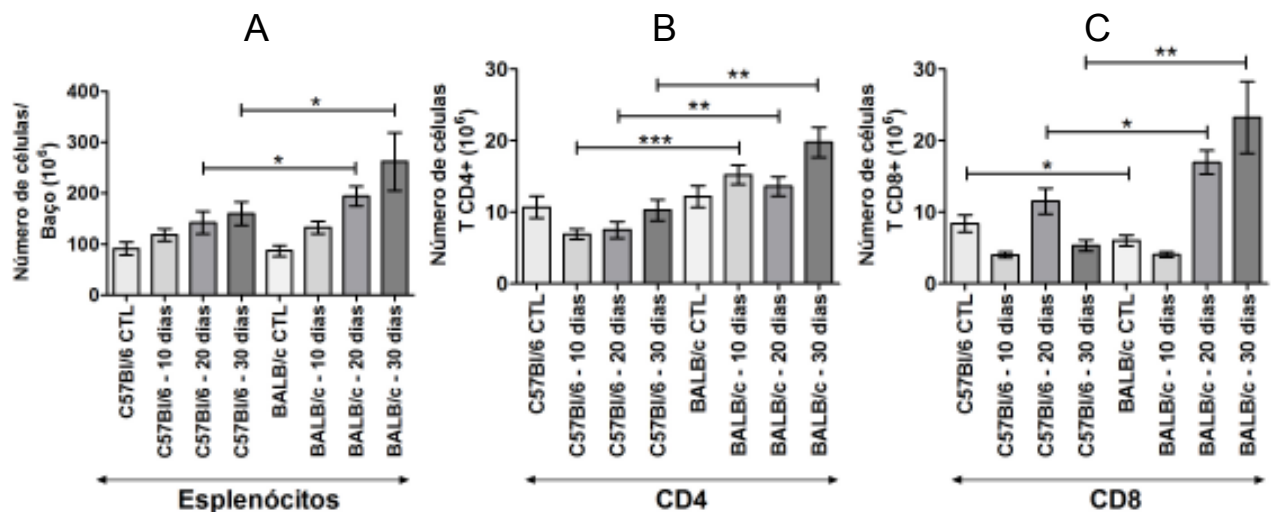


Figura 3. Número total das populações de células esplênicas (A), de linfócitos T CD4+ (B) e CD8+ (C) aos 10, 20 e 30 dias de infecção. Nas figuras estão representados os números totais de esplênocitos (A), diferenciais de linfócitos T CD4+ (B) e CD8+ (C), dos diferentes grupos experimentais: C57Bl/6 controle (CTL), C57Bl/6 infectado – 10 dias (C57Bl/6 – 10 dias), C57Bl/6 infectado – 20 dias (C57Bl/6 – 20 dias), C57Bl/6 infectado – 30 dias (C57Bl/6 – 30 dias), BALB/c controle (CTL), BALB/c infectado – 10 dias (BALB/c – 10 dias), BALB/c infectado – 20 dias (BALB/c – 20 dias) e BALB/c infectado – 30 dias (BALB/c – 30 dias). Animais por grupo experimental: 3. Análise estatística com teste Mann-Whitney *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,005$). A barra no gráfico se refere ao desvio padrão dos dados obtidos. Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2. Marcadores de superfície em linfócitos T esplênicos estudados por citometria de fluxo (FACS) durante a fase aguda da infecção (10, 20 e 30 dias).

6.2.1. Alterações quantitativas das populações de células T esplênicas CD4+ e CD8+ expressando CD44 e CD62L.

Neste tópico foram analisadas as quantidades de linfócitos T CD4+ e CD8+ presentes no baço dos diferentes grupos experimentais com expressão baixa e/ou negativa do marcador CD62L e expressão alta do marcador CD44, ou seja, células T CD4+CD44^{alto}CD62L^{baixo} e CD8+CD44^{alto}CD62L^{baixo} (Fig. 4A e 4B). Este fenótipo celular corresponde a células de memória efetora. Outra subpopulação celular analisada neste tópico foi a de memória central. O fenótipo desta subpopulação apresenta alta expressão de CD44 e de CD62L (Fig. 4C e 4D).

Quanto às células T CD4+CD44^{alto}CD62L^{baixo} observamos que o grupo de animais BALB/c apresenta um aumento significativo a partir do 10º dia de infecção, aumentando progressivamente no 20º e no 30º dias de infecção. Já os animais C57Bl/6 apresentam um discreto aumento desta população de células no 20º dia de infecção, mantendo os números sem alterações no 30º dia de infecção (Fig. 4A). Com relação às células T CD8+CD44^{alto}CD62L^{baixo} verificamos que tanto os animais C57Bl/6 e BALB/c não apresentam alteração nestas células no 10º dia de infecção. Adicionalmente, de maneira significativa, ocorre um aumento expressivo destas células nos animais BALB/c no 20º e 30º dias de infecção. Este aumento também ocorre nos animais C57Bl/6, porém somente no 20º dia de infecção, sendo que no 30º dia ocorre diminuição expressiva.

Quanto às células T de memória central, observamos que a repopulação desta subpopulação celular ocorre de maneira mais significativa nos animais BALB/c, quando comparados aos animais C57Bl/6. Na figura 4C e 4D, observamos que o número de células T CD8+ e CD4+ de memória central decai, significativamente, após a infecção nos animais C57Bl/6 (10º dia), ocorrendo aumento discreto no 20º dia, e se mantendo em baixos números no 30º dia de infecção, quando comparamos ao controle não infectado. Já nos animais BALB/c, verificamos que houve discreta diminuição de células

T CD4⁺ de memória central, porém, não significativa nos dias 10^o, 20^o e 30^o de infecção, quando comparamos ao controle (Fig. 4C). Verificamos ainda que o número de células T CD8⁺ de memória central decai significativamente no 10^o dia de infecção nos animais BALB/c, quando comparados aos controles não infectados. Entretanto, ocorre aumento significativo no 20^o dia comparado ao 10^o dia de infecção e um aumento ainda maior no 30^o dia, quando comparado ao 20^o dia de infecção (Fig. 4D).

Desta forma, as análises quantitativas de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e efectoras mostraram alterações significativas e expressivas nos diferentes perfis de resistência e susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*.

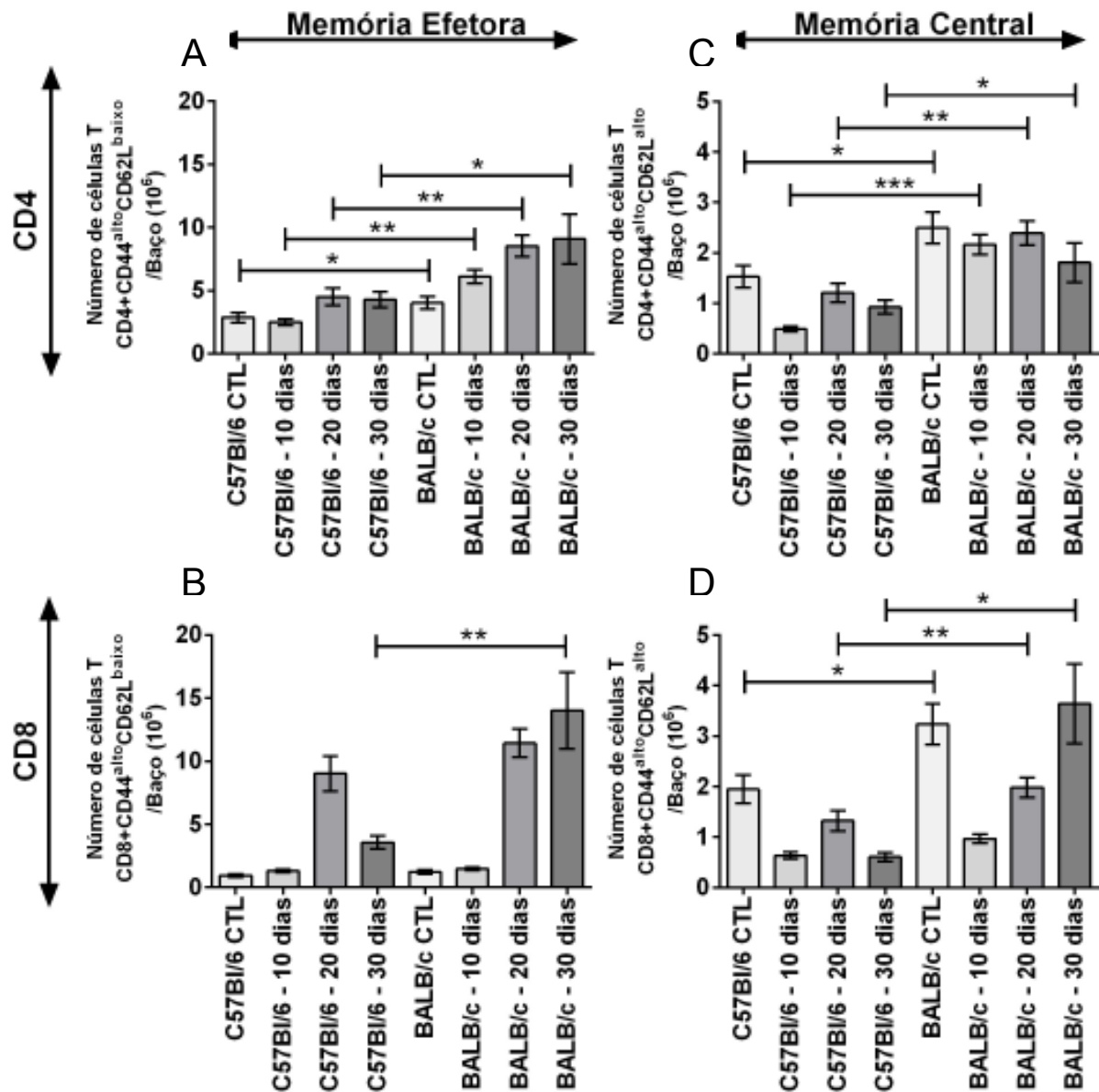


Figura 4. Análise de populações de células T esplênicas CD4+ e CD8+, que apresentam perfil fenotípico de memória efetora e de memória central, durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*: Nesta figura esta representada a quantidade numérica de células T CD4+CD44^{alto}CD62L^{baixo} (A), CD8+CD44^{alto}CD62L^{baixo} (B), CD4+CD44^{alto}CD62L^{alto} (C) e CD8+CD44^{alto}CD62L^{alto} (D) dos diferentes grupos experimentais: vide legenda figura 3. A barra refere-se ao desvio padrão dos dados. Animais por grupo: 3. Análise estatística com teste Mann-Whitney * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,005). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.2. Alterações quantitativas de esplenócitos CD4+ ou CD8+ produtoras de interferon- γ .

Na figura 5 observamos a quantificação da produção de IFN- γ em populações de células T CD4+ ou CD8+ do baço de animais na fase aguda da infecção (10, 20 e 30 dias). Verificamos que os animais C57Bl/6 apresentam um aumento significativo na produção de IFN- γ por células T CD4+ no 10º dia de infecção. No 20º dia de infecção a produção de IFN- γ é 6 vezes maior que no 10º dia. Este aumento continua de maneira progressiva, sendo que no 30º dia de infecção é ainda maior, quando comparado ao 20º dia.

Quanto aos animais BALB/c, também ocorre aumento na produção de IFN- γ por células T CD4+ no 10º dia de infecção, porém de maneira discreta. No 20º dia, o aumento é, proporcionalmente, 3 vezes maior que no 10º dia. No 30º dia de infecção, o aumento não é significativo em relação ao 20º dia.

Quando comparamos a produção de IFN- γ por células T CD4+ provenientes de animais C57Bl/6 e BALB/c, verificamos que ambos mostram um aumento na produção desta citocina a partir do 10º dia de infecção. Entretanto, comparativamente, o aumento é proporcionalmente maior nos animais C57Bl/6 (Fig. 5A). Na figura 5C é possível visualizar de maneira comparativa, entre grupos, a diferença de produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+.

As células T CD8+ também são importantes produtoras de IFN- γ . Entretanto esta produção é evidenciada somente a partir do 20º dia de infecção, pois no 10º dia detectamos um número reduzido de células T CD8+ IFN- γ +, para ambos os grupos, C57Bl/6 e BALB/c. No 20º dia de infecção, observamos aumento significativo de células T CD8+ IFN- γ + em ambos os grupos, quando comparados aos seus respectivos controles não infectados. Adicionalmente, houve diminuição de células T CD8+ IFN- γ + nos animais C57Bl/6 no 30º dia, comparado ao 20º dia de infecção. Em contrapartida, nos animais BALB/c há um aumento de 5 vezes na produção de IFN- γ pelas células T CD8+ no 30º dia, comparado ao 20º dia de infecção (Fig. 5B). Quando comparamos o número de células T CD8+ IFN- γ dos animais C57Bl/6 e BALB/c, verificamos que,

proporcionalmente, a produção no BALB/c é 14 vezes maior que no C57Bl/6. A figura 5D evidencia esta diferença de produção de IFN- γ por células T CD8+, entre os grupos experimentais durante a cinética de infecção.

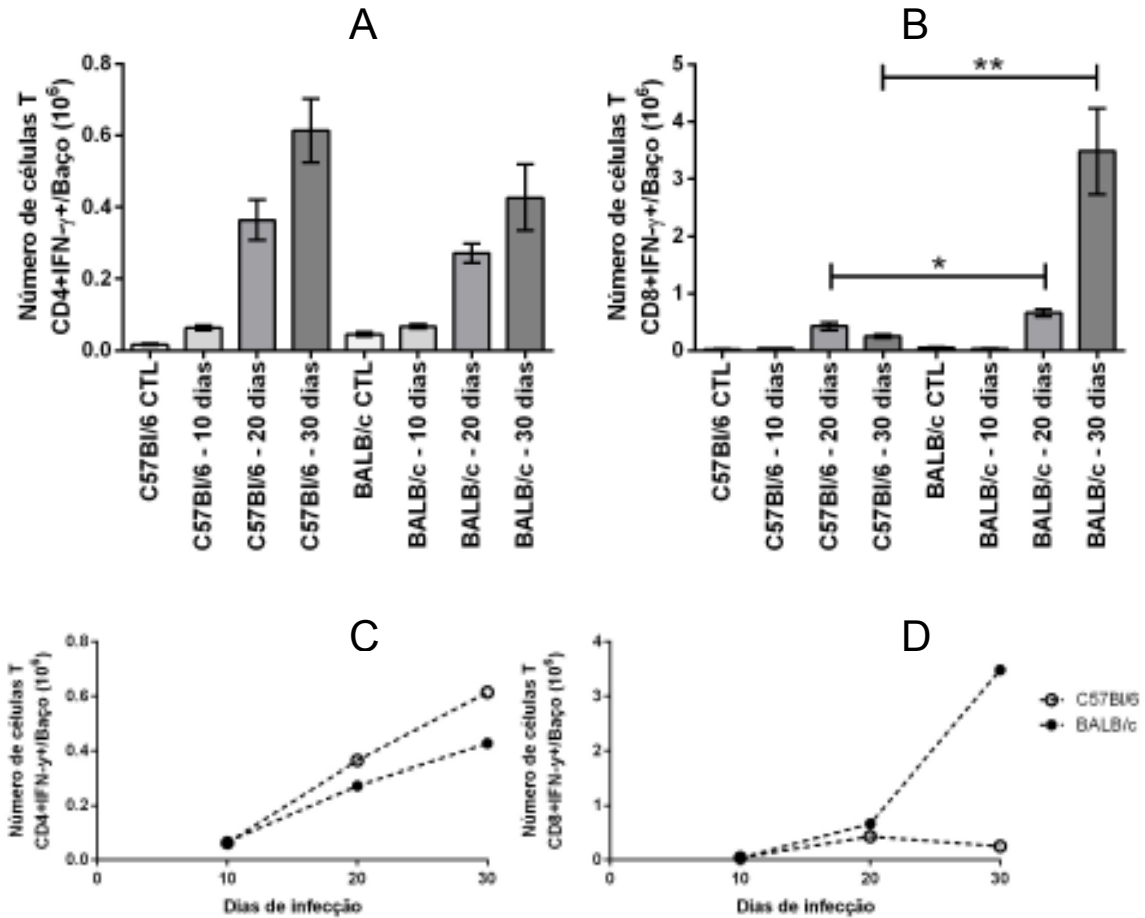


Figura 5. Quantificação de células T CD4+ IFN- γ + (A) e CD8+ IFN- γ + (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção. Nesta figura estão representados o número total e a cinética de células T CD4+ IFN- γ + (A-C) e CD8+ IFN- γ + (B-D) presentes no baço, dos diferentes grupos experimentais: vide Material e Métodos. n=3/grupo/por ponto experimental. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05), **(p<0,01) e ***(p<0,005). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.3. Quantificação da população de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de interleucina-10, na fase aguda da infecção.

Além da quantificação da produção de IFN- γ pelas células T esplênicas CD4+ e

CD8+, realizamos também estudos sobre a produção de IL-10 nestas populações linfocitárias.

Verificamos que não há alteração na produção de IL-10 por células T CD4+ provenientes de animais C57Bl/6 no 10º dia de infecção. Entretanto, no 20º dia ocorre um aumento significativo, comparado ao controle e ao 10º dia de infecção. No 30º dia ocorre diminuição significativa do número de células T CD4+ IL-10+ quando comparado ao 20º dia de infecção (Fig. 6A).

Os animais BALB/c apresentam aumento significativo de células T CD4+ IL-10+ no 10º dia de infecção, comparado ao controle, e há um aumento progressivo nos dias 20º e 30º de infecção, comparado ao 10º dia de infecção (Fig. 6A).

Assim, a análise dos resultados permite concluir que os animais BALB/c apresentam maior número de células T CD4+ produtoras de IL-10, no curso da infecção, quando comparados aos animais C57Bl/6 que apresentam aumento no 20º dia e diminuição acentuada no 30º dia de infecção. Na figura 6C observa-se de maneira mais evidente as diferenças entre os grupos experimentais.

Em relação à quantificação de células T CD8+ produtoras de IL-10, verifica-se que há número significativo destas células nos animais C57Bl/6, quando comparados aos controles, somente no 20º dia de infecção, sendo que este número decai no 30º dia de infecção, comparado ao 20º dia de infecção (Fig. 6B). Nos animais BALB/c há um discreto aumento no 20º dia, comparado ao controle e um significativo aumento no 30º dia, na proporção de 10 vezes ao encontrado no 20º dia (Fig. 6B).

Sendo assim, verifica-se que as células T CD4+ dos animais BALB/c apresentaram maior produção de IL-10, quando comparadas às mesmas células dos animais C57Bl/6, que apresentaram produção significativa somente no 20 dia de infecção. Adicionalmente, as células T esplênicas CD8+ dos animais C57Bl/6 apresentaram produção significativa desta citocina no 20º dia de infecção, diferentemente do animal BALB/c que apresenta produção tardia de IL-10, pois somente no 30º dia de infecção é que houve produção significativa desta citocina pelas células T CD8+. Tais diferenças podem ser visualizadas com maior evidência na figura 6D.

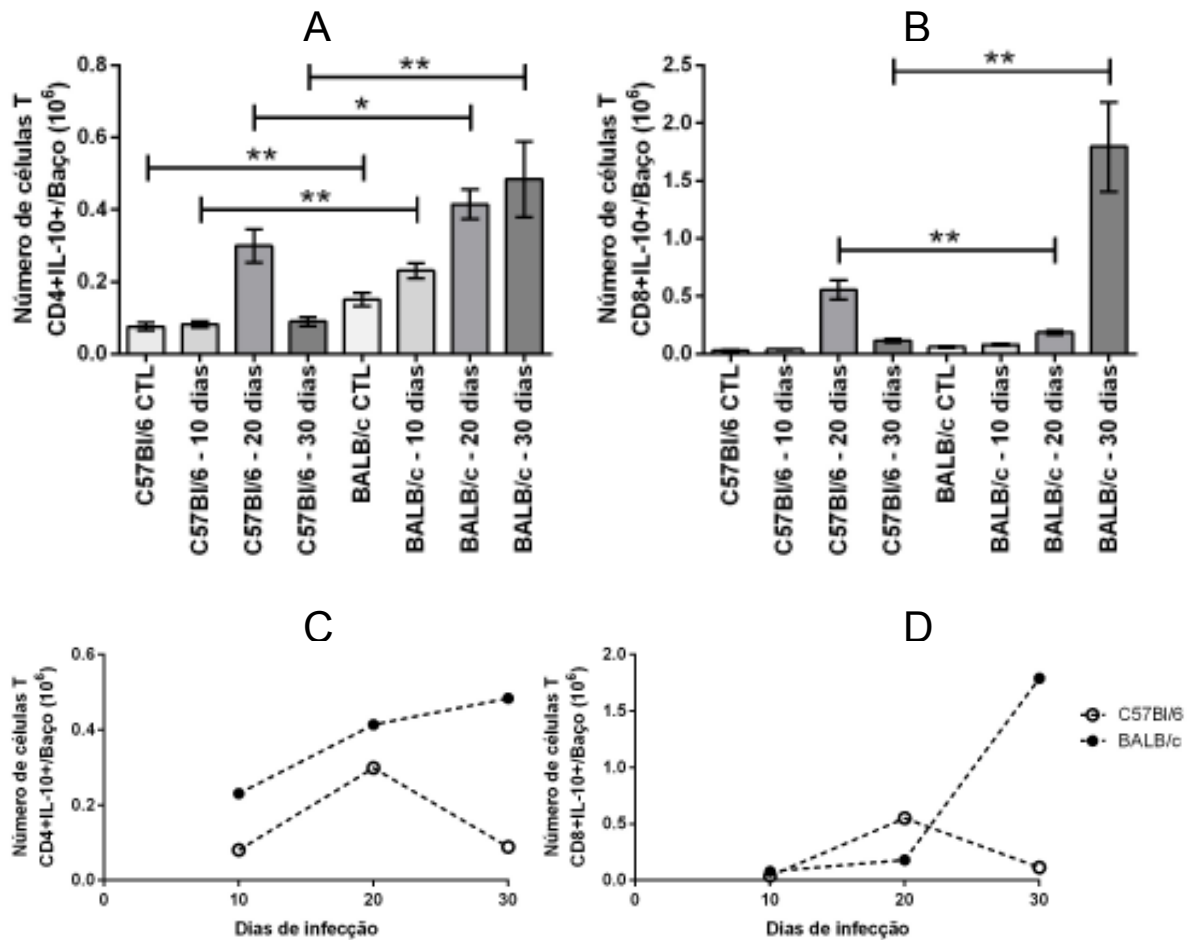


Figura 6. Quantificação de células T CD4+ IL-10+ (A) e CD8+ IL-10+ (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção. Nesta figura estão representados o número total e a cinética de células T CD4+ IL-10+ (A-C) e CD8+ IL-10+ (B-D) presentes no baço, dos diferentes grupos experimentais: vide Material e Métodos. n=3/grupo/por ponto. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05), **(p<0,01) e ***(p<0,005). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.4. Análise da produção de IL-10 e IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ do infiltrado inflamatório do músculo esquelético dos diferentes grupos experimentais na fase aguda da infecção.

A quantificação de citocina intracelular nas células do infiltrado inflamatório não pôde ser realizada individualmente, por animal, pois o rendimento numérico de células

mononucleares do tecido muscular esquelético é altamente variável e baixo. Desta forma, cada “Dot Plot” observado na figura 7 representa o total de células obtidas do infiltrado inflamatório do tecido esquelético de um total de 3 animais.

Através do gráfico na figura 7N e 7O, podemos observar comparativamente os dados ilustrados nos “Dots Plots” de células CD4+ e CD8+ quanto à marcação intracelular de IL-10 e IFN- γ .

Assim, observamos que ocorre um aumento gradual da produção de IFN- γ por células T CD4+ de animais C57Bl/6, no decorrer da infecção. Diferentemente, no BALB/c a percentagem dessas células diminui no 30º dia de infecção (Fig. 7N). As células T CD8+ do animal C57Bl/6 produziram esta citocina na frequência de 5% no 10º dia, percentagem esta que se manteve estável até o 30º dia de infecção. Nos animais BALB/c, houve um aumento de células T CD8+ IFN- γ + no 20º dia e diminuição no 30º dia de infecção.

Os gráficos mostram que os animais C57Bl/6, no 30º dia de infecção, apresentam um perfil inflamatório no músculo esquelético com maior percentagem de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- γ , quando comparados ao BALB/c.

Quanto ao perfil de produção de IL-10, observamos que os animais C57Bl/6 apresentam uma alta produção de IL-10 no 10º dia de infecção, tanto por células T CD4+ como por CD8+. Em ambas as populações celulares ocorre diminuição na produção de IL-10 no 20º dia e um novo aumento no 30º dia de infecção. Os animais BALB/c apresentaram baixa produção de IL-10 por linfócitos T CD4+ no 10º dia, havendo um aumento no 20º dia e diminuição no 30º dia. Com relação aos linfócitos T CD8+, ocorre o inverso, no 10º dia há alta produção de IL-10, que diminui no 20º dia e aumenta novamente no 30º dia de infecção (Fig. 7O).

Desta forma, além da maior produção de IFN- γ por células T CD4+ no infiltrado inflamatório do músculo esquelético de animais C57Bl/6, estes também apresentam maior produção de IL-10, quando comparados ao BALB/c. As células T CD8+ apresentaram maior produção de ambas as citocinas, no 10º e 30º dia de infecção.

Vale notar também que uma parte considerável das células produtoras de IFN- γ no infiltrado inflamatório do músculo esquelético em camundongos C57Bl/6 também produz IL-10.

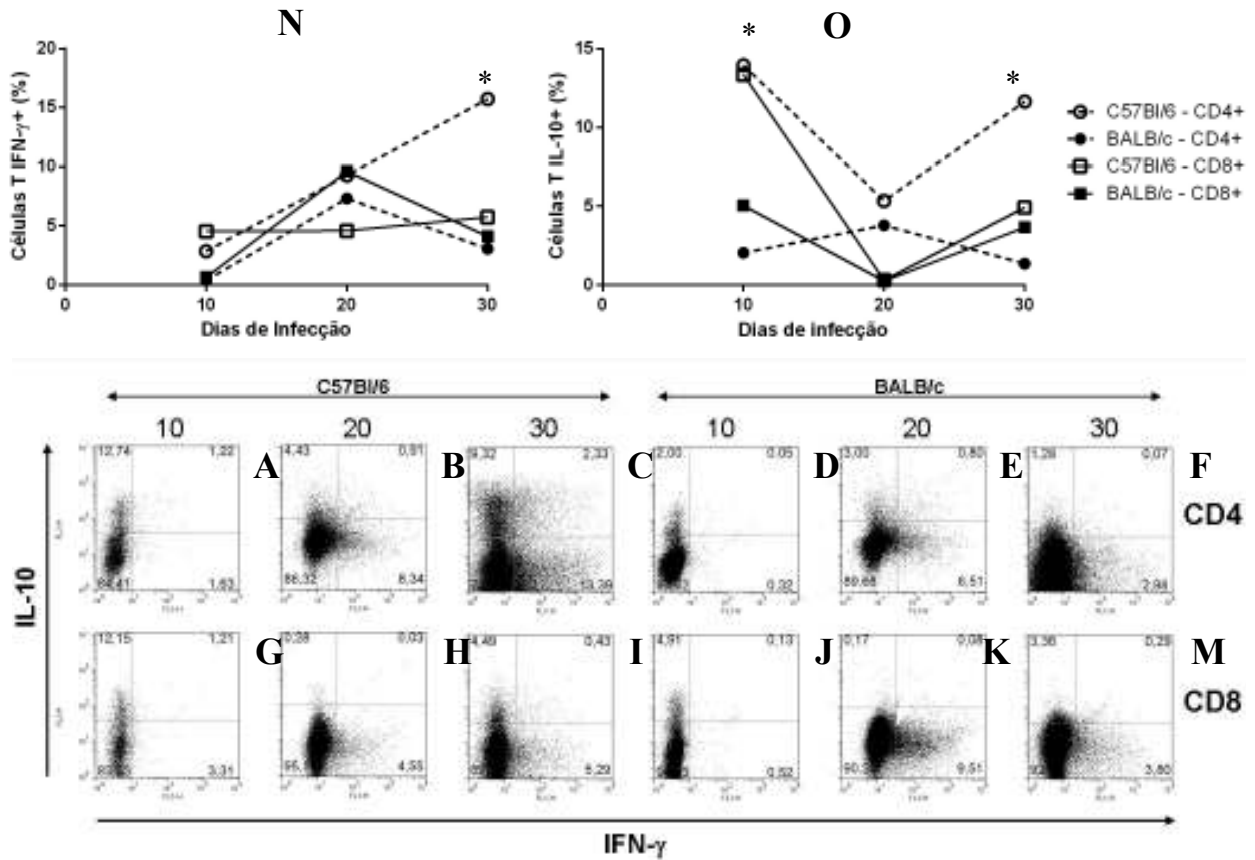


Figura 7. Ilustração gráfica da marcação intracelular de IL-10+ e IFN- γ em células T CD4+ e CD8+ do músculo esquelético, durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção. Nesta figura estão representadas graficamente (N-O) as percentagens de células CD4+ e CD8+ produtoras de IL-10 ou IFN- γ e por "Dot Plots" a marcação de IL-10 (eixo Y) e IFN- γ (eixo X) em células T CD4+ (A-F) e CD8+ (G-M) provenientes do infiltrado inflamatório do músculo esquelético, dos diferentes grupos experimentais. n=3/grupo/por ponto experimental. Análise estatística com teste Mann-Whitney *($p < 0,05$), **($p < 0,01$) e ***($p < 0,005$). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.5. Análise da produção de IL-10 e IFN- γ pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ do infiltrado inflamatório do músculo cardíaco dos diferentes grupos experimentais na fase aguda da infecção.

Os animais C57Bl/6 apresentaram percentagem semelhante de células T CD4+ IFN- γ + no 10º dia de infecção quando comparados aos camundongos BALB/c. No entanto, no 20º dia de infecção ocorre aumento desta frequência, sendo maior que nos animais BALB/c, permanecendo aumentada até o 30º dia de infecção (Fig. 8N). Com relação à frequência de células T CD8+ IFN- γ + observamos que as porcentagens no 10º dia são semelhantes em ambos os grupos, porém, ocorre aumento significativo no 20º dia nos animais C57Bl/6, em contraposição à diminuição no BALB/c, sendo semelhantes em ambos os grupos no 30º dia de infecção.

Assim, os dados abaixo permitem observar que os animais C57Bl/6 apresentam maior frequência de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- γ no infiltrado inflamatório do tecido muscular cardíaco (Fig. 8N).

Quanto à percentagem de células T produtoras de IL-10, observamos que no 10º dia há semelhanças na frequência de células T CD4+, produtoras desta citocina em ambos os grupos. No 20º dia de infecção, verificamos que há um aumento significativo de células T CD4+IL-10+ nos animais C57Bl/6, que decai muito no 30º dia, quando comparado ao BALB/c que apresenta diminuição desta célula no 20º dia e aumento considerável no 30º dia. A frequência de células T CD8+ IL-10+ é maior nos animais BALB/c no 10º dia e 30º dia de infecção, quando comparado ao animal C57Bl/6, não havendo diferenças no 20º dia (Fig. 8O).

Desta forma, células inflamatórias cardíacas dos animais C57Bl/6 apresentam alta frequência de células T CD4+ produtoras de IL-10 no 20º dia de infecção, enquanto que as dos animais BALB/c apresentam alta percentagem desta população celular no 30º dia de infecção. Quanto à população de células T CD8+ no coração, os animais BALB/c apresentam maior frequência de produção de IL-10, comparado ao C57Bl/6.

Semelhantemente às células T CD4+ do músculo esquelético as células CD4+ do coração dos animais C57Bl/6 foram as únicas a produzirem IL-10 e IFN- γ simultaneamente. Portanto, esta população foi encontrada apenas nessa linhagem de

camundongos.

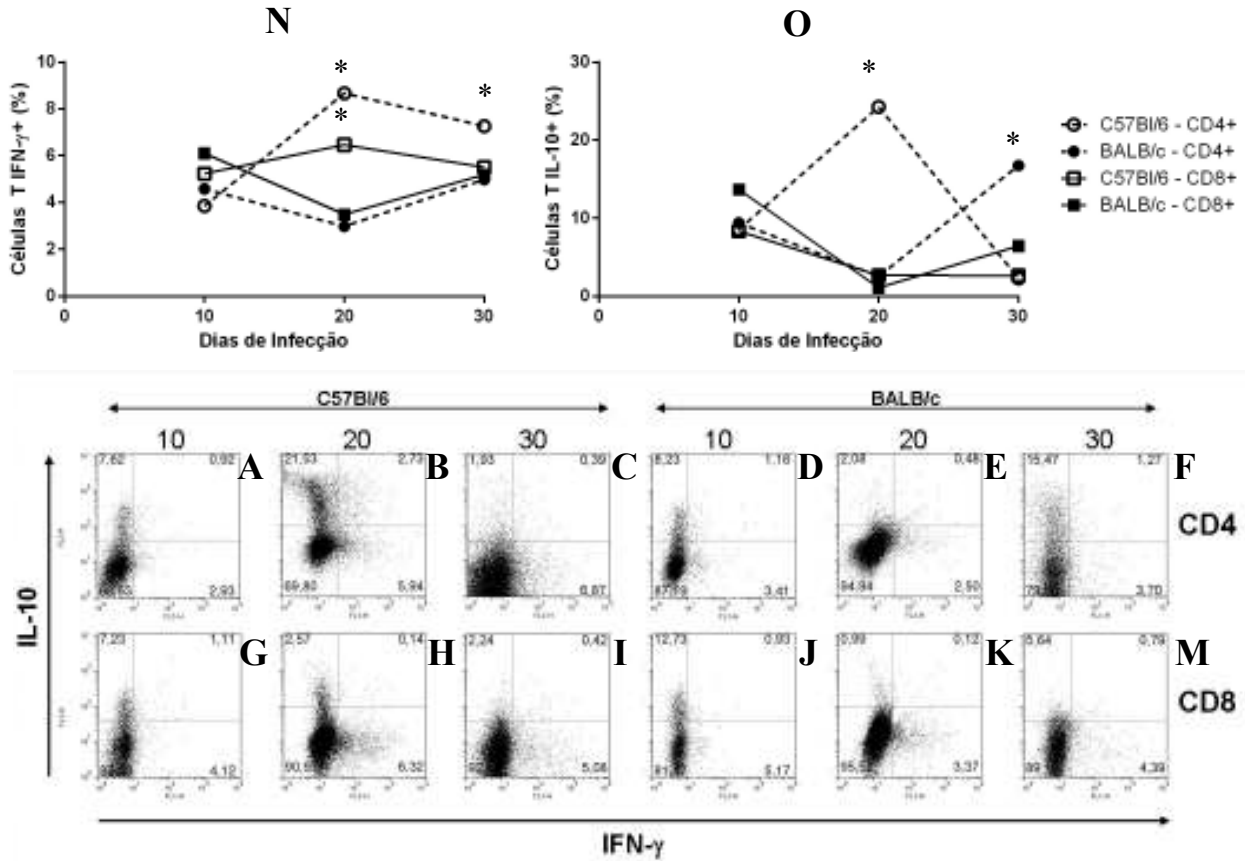


Figura 8. Ilustração gráfica da marcação intracelular de IL-10+ e IFN- γ em células T CD4+ e CD8+ do músculo cardíaco, durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção. Nesta figura estão representadas graficamente (N-O) as porcentagens de células CD4+ e CD8+ produtoras de IL-10 ou IFN- γ e por "Dot Plots" a marcação de IL-10 (eixo Y) e IFN- γ (eixo X) nas células T CD4+ (A-F) e CD8+ (G-M) presentes no infiltrado inflamatório do músculo cardíaco, dos diferentes grupos experimentais. n=3/grupo/por ponto experimental. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05), **(p<0,01) e ***(p<0,005). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.6. Alterações quantitativas das populações de células T esplênicas apresentando o fenótipo CD4+CD25+ ou CD4+CD25+Foxp3 durante a fase aguda da infecção.

As quantificações de células T CD4+CD25+ (Fig. 9A) e células T CD4+CD25+Foxp3+ esplênicas (Fig. 9B) foram efetuadas em diferentes dias após o início da infecção nas linhagens susceptível e resistente. Quanto à população de células T CD4+CD25+ observa-se que não houve alteração numérica significativa nos animais C57Bl/6 na cinética feita durante a infecção (10, 20 e 30 dias) comparando-se com seus controles não infectados (Fig. 9A). Entretanto, a infecção dos animais BALB/c resulta em aumento quantitativo significativo de células T CD4+CD25+ já no 10º dia de infecção, comparado ao controle não infectado. O número desta subpopulação se mantém no 20º dia de infecção e apresenta um aumento não significativo em relação ao anterior, no 30º dia de infecção.

Sobre o fator de transcrição Foxp3 em células T CD4+CD25+ verificou-se que houve uma diminuição significativa desta subpopulação no 30º dia de infecção de animais C57Bl/6 comparado ao respectivo controle não infectado. Em contraposição, há um aumento significativo desta subpopulação no 10º dia de infecção nos animais BALB/c, comparado ao respectivo controle não infectado (Fig. 9B).

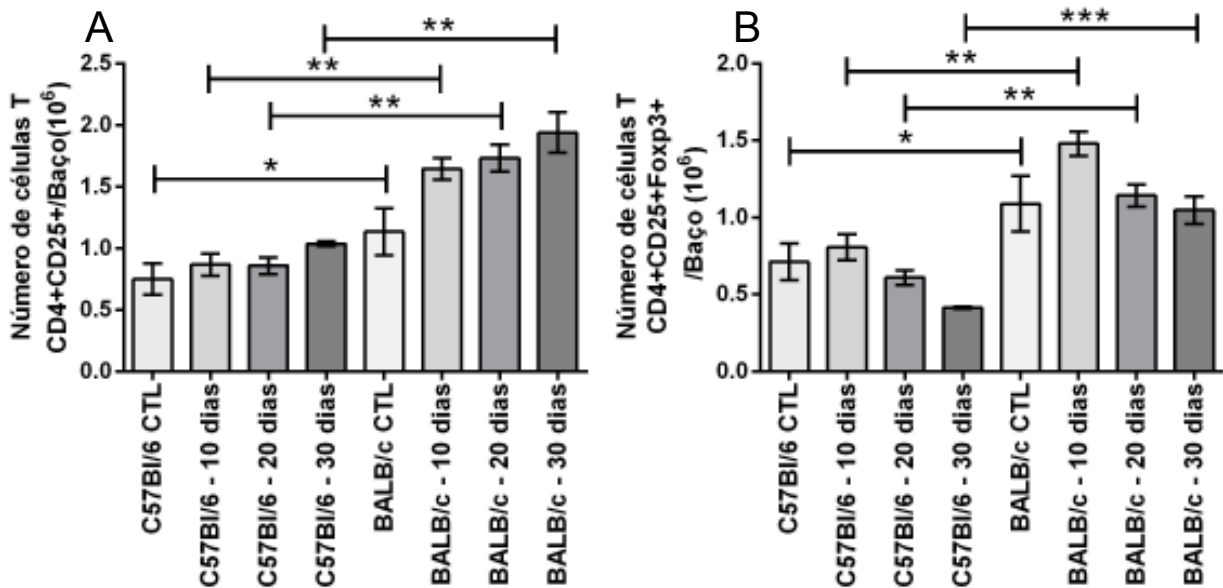


Figura 9. Quantificação de células T CD4+CD25+ (A) e CD4+CD25+Foxp3+ (B), durante a fase aguda (10, 20 e 30 dias) da infecção. Nesta figura estão representados o número total de células T esplênicas CD4+CD25+ (A), e o número total de células esplênicas T CD4+CD25+Foxp3+ (B), dos diferentes grupos experimentais. n=3/grupo/por ponto experimental. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05), **(p<0,01) e ***(p<0,005). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.2.6.1. Ilustração gráfica referente aos estudos de citometria de fluxo e marcadores de células T reguladoras CD4+CD25+ e Foxp3+ na fase aguda da infecção.

De modo a exemplificar os resultados da figura 9, a planilha de dados apresentada na figura 9.1 mostra as células T CD4+ quanto ao padrão e intensidade de expressão do marcador CD25+ (A até D). De modo ilustrativo, os dados da figura 9.1A, mostram que 1,71% do total de esplenócitos são células CD4+CD25+, nos animais C57Bl/6 normais. De maneira similar, observa-se em B, C e D esta população celular nos diferentes grupos utilizados. Desta forma, há 1,74% de células T CD4+CD25+ em animais C57Bl/6 com 7 dias de infecção. Adicionalmente, há 1,32% no 14º dia de infecção e 0,85% no 21º dia de infecção. Há, portanto, uma diminuição gradativa desta população celular no curso de infecção, em animais C57Bl/6.

Quando analisamos a expressão do fator de transcrição Foxp3 em células T CD4+CD25+, verifica-se que em animais controle não infectados há uma grande proporção de expressão de Foxp3 em tais células, totalizando 94,8%. Esta proporção decai progressivamente no decorrer da infecção, sendo 93% no 7º dia, 71% no 14º dia e 40% no 21º dia de infecção de animais C57Bl/6 (Fig. 9.1E a 9.1H). Este mesmo fenômeno também ocorre na população de células T CD4+CD25-, entretanto a proporção de células Foxp3+ é bem menor comparado à expressão deste fator de transcrição nas células CD25+ (Fig. 9.1I a 9.1L).

Assim, houve uma diminuição na proporção de células T CD4+CD25+ na população total de esplenócitos, no decorrer da infecção. Esta diminuição também ocorre nas células que expressam Foxp3 com uma queda de 2,35 vezes no 21º dia de infecção, comparado ao animal não infectado (Fig. 9.1E a 9.1H).

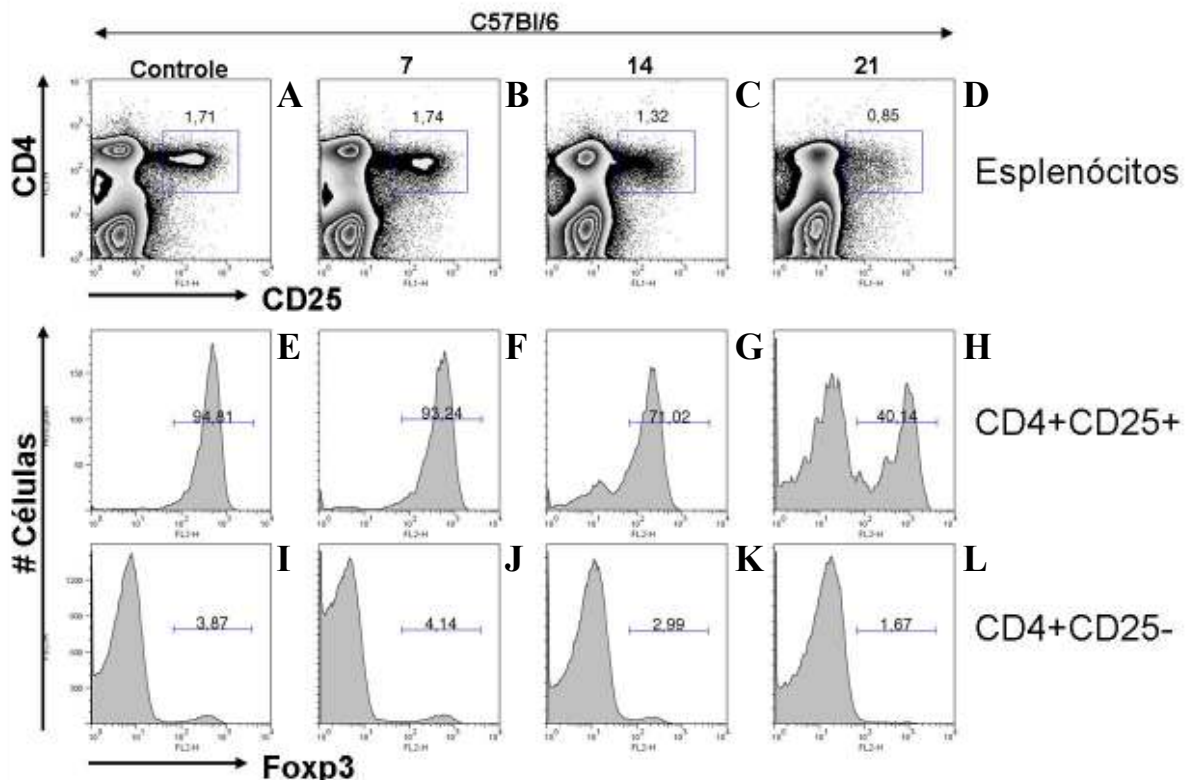


Figura 9.1. Análise por citometria de fluxo de células T CD4+ expressando marcadores CD25+ e Foxp3+ em animais C57Bl/6 durante a infecção aguda: Nos Dot Plots (A-D) os marcadores de superfície utilizados foram CD4+ (eixo X) e CD25+ (eixo Y) em esplenócitos totais com janela eletrônica em linfócitos. Os histogramas apresentam o marcador Foxp3+ (eixo x) e número de células (eixo y) com janela eletrônica em células T CD4+CD25+ (E-H) e CD4+CD25- (I-L). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

Em animais BALB/c houve um pequeno aumento de células CD4⁺CD25⁺ no 7^o dia de infecção, comparado ao controle não infectado (Fig. 9.2A e 9.2B). Entretanto, a frequência dessas células decaiu progressivamente, nos dias 14^o e 21^o de infecção (Fig. 9.2C e 9.2D). Verificamos também que 96% de células CD4⁺CD25⁺ apresentaram o marcador Foxp3 em animais controle não infectados. Nos animais BALB/c infectados houve uma discreta diminuição da porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ expressando Foxp3 no 7^o dia de infecção (90%), e uma significativa diminuição nos dias 14^o (66%) e 21^o (54%) de infecção.

Comparativamente, quando analisamos estas populações celulares nos animais C57Bl/6 e BALB/c, verificamos que o BALB/c apresenta significativo aumento de CD4⁺CD25⁺ sobre o total de esplenócitos e os animais C57Bl/6 não. Outro ponto que merece destaque é que a diminuição de Foxp3⁺ sobre o total de CD4⁺CD25⁺ nos animais C57Bl/6 foi de 2,35x em comparação aos animais BALB que foi de 1,7x, no 21^o dia de infecção em relação aos animais controle não infectados.

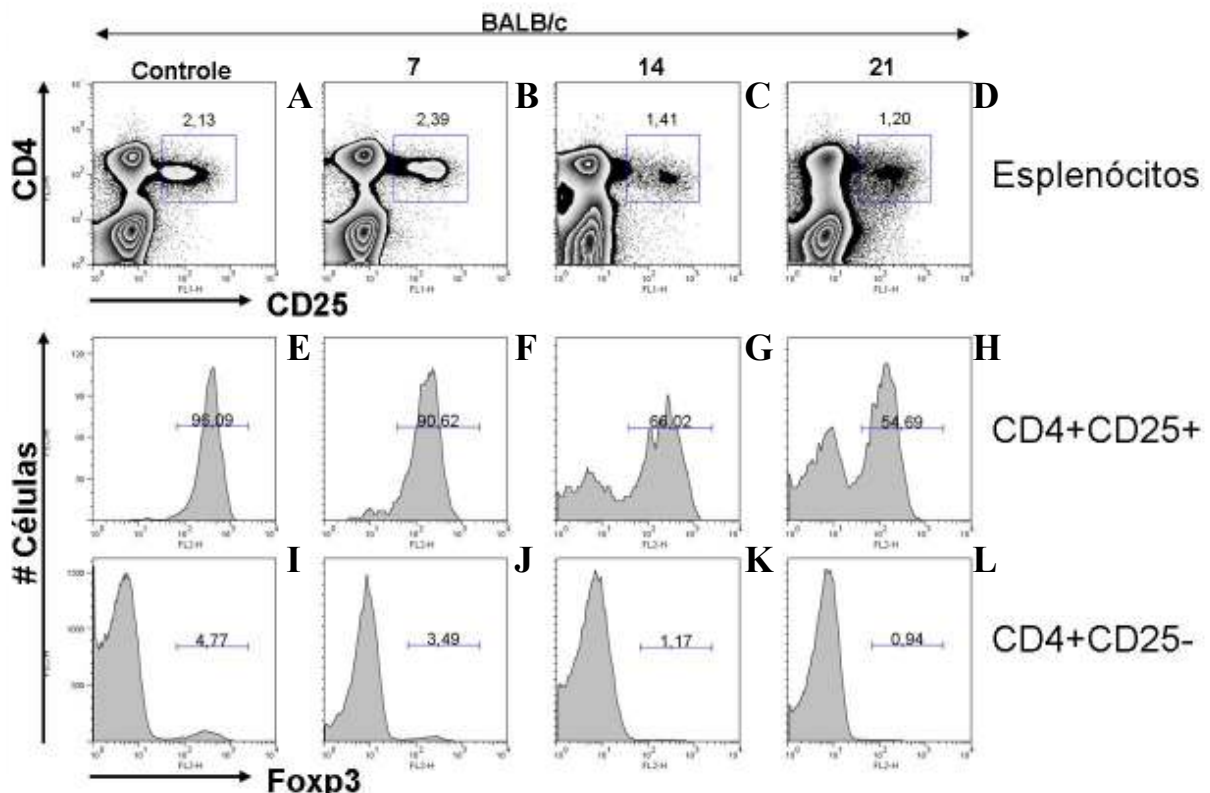


Figura 9.2. Análise por citometria de fluxo de células T CD4⁺ expressando marcadores CD25⁺ e FcγR3⁺ em animais BALB/c durante a infecção aguda: Nos Dot Plots (A-D) os marcadores de superfície utilizados foram CD4⁺ (eixo X) e CD25⁺ (eixo Y) em esplenócitos totais com janela eletrônica em linfócitos. Os histogramas apresentam o marcador FcγR3⁺ (eixo x) e número de células (eixo y) com “gate” eletrônica em células T CD4⁺CD25⁺ (E-H) e CD4⁺CD25⁻ (I-L). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3. Avaliação dos padrões de resistência à infecção pelo *T. cruzi* em animais C57Bl/6 submetidos à administração de anticorpos monoclonais que neutralizam a IL-2 *in vivo*.

6.3.1. Comparação dos níveis parasitêmicos de animais C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* e tratados ou não com anti-IL-2.

Para respondermos às questões propostas neste estudo, inicialmente, obtivemos os seguintes grupos experimentais: Grupo 1 - controle (não infectado); Grupo 2 - Infectado e tratado com Ig (imunoglobulina de rato); e Grupo 3 - Infectado e tratado com anticorpo monoclonal anti-IL-2 (anti-IL-2). Portanto, dois grupos de camundongos

C57Bl/6 foram infectados com 1000 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen. Um dos grupos foi tratado com anti-IL-2 (500ug/dia/animal) dos dias -1 dia (um dia anterior ao da infecção) até o 7º dia após a infecção, em dias intercalados. O outro grupo infectado foi tratado com Ig de rato no mesmo período de tratamento do grupo tratado com anti-IL-2. O procedimento experimental foi realizado no 4º e 21º dias após a infecção. Neste modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi* avaliamos inicialmente os padrões de resistência à infecção, como os níveis de tripomastigotas circulantes ou parasitemia (Fig. 10A) e a mortalidade (Fig. 10B).

O propósito do tratamento com anti-IL-2 foi o de diminuir quantitativamente a população de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+. O tratamento com anti-IL-2 (clone JES6-1A12) já foi descrito como sendo extremamente eficiente para este propósito, neutralizando eficientemente a IL-2, diminuindo consideravelmente a sua disponibilidade no microambiente e conseqüentemente diminuindo a população de células T Foxp3+ (BOYMAN et al., 2006).

Na figura 10, observamos que houve diferença significativa no pico parasitêmico (28º dia), onde o grupo infectado (Ig) apresentou maior parasitemia comparado ao grupo infectado+anti-IL2. É importante observar que entre o 20º e 30º dias de infecção, os níveis de parasitos circulantes no grupo infectado (Ig) foi maior que no infectado e tratado (anti-IL2), embora, somente um ponto (28º dia) foi estatisticamente significativo.

Quanto à mortalidade cumulativa, observamos (Fig. 1B) que os animais do grupo infectado (Ig) apresentaram mortalidade a partir do 24º dia, alcançando 100% no 40º dia de infecção. O grupo infectado e tratado (anti-IL-2) apresentou mortalidade a partir do 30º dia, sendo que no 40º dia apenas 60% dos animais não sobreviveram, e os 40% restantes apresentaram sobrevida prolongada (> que 100 dias).

Desta forma, verificamos comparativamente que os animais tratados com anti-IL-2 apresentaram um maior controle no número de formas tripomastigotas circulantes comparado ao grupo controle tratado com Ig. E este controle parasitêmico refletiu numa taxa de mortalidade inferior, onde os animais tratados com anti-IL-2 apresentaram mortalidade inicial tardia e maior sobrevida dos animais.

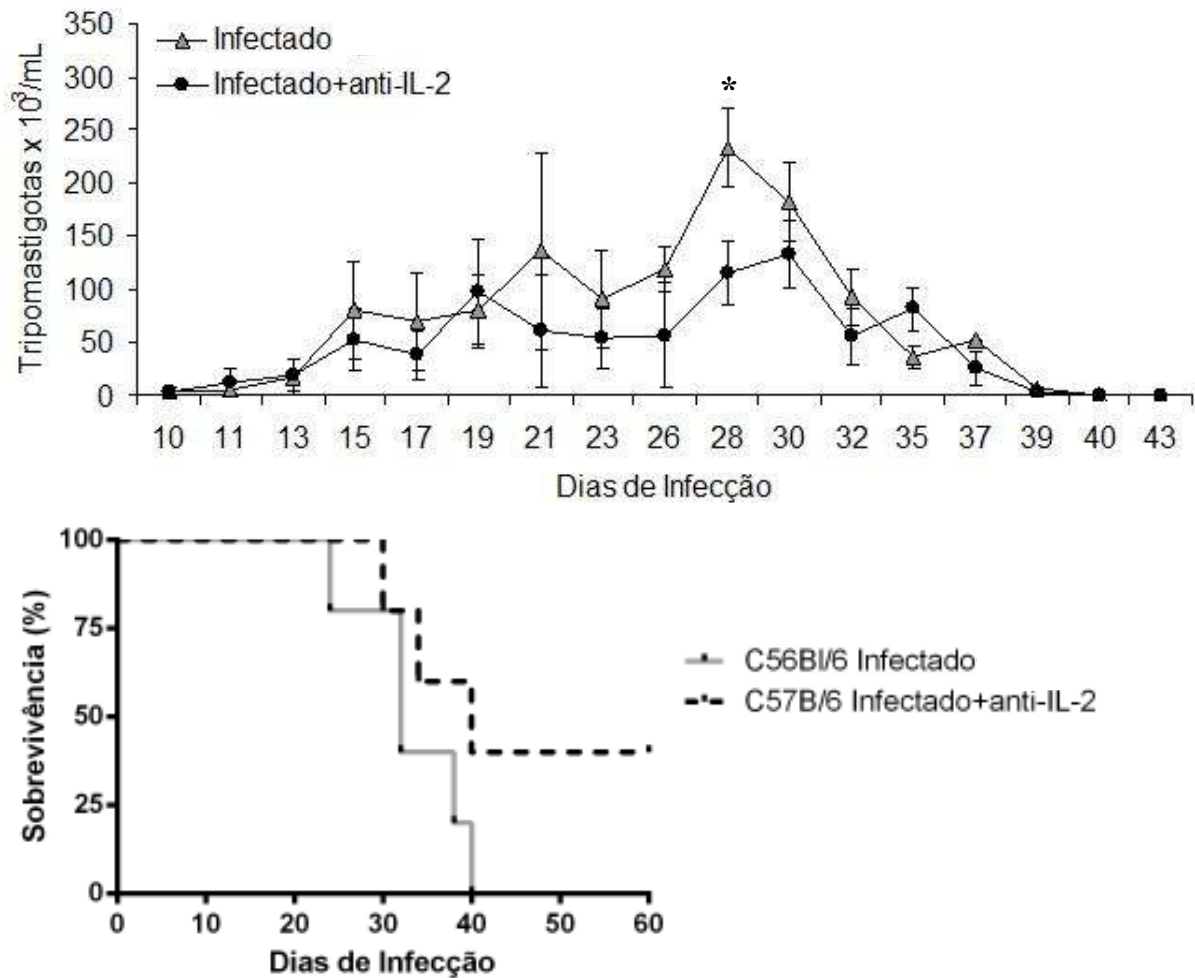


Figura 10. Números de parasitos circulantes (A) e a curva de sobrevivência (B). Dois grupos de camundongos C57Bl/6 foram infectados por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas da cepa Tulahuen. A parasitemia e a sobrevivência foram determinadas nos dias indicados. Grupo 1: infectado + Ig (Infectado) e grupo 2: infectado e tratado com anti-IL-2 (500ug/dia) (Infectado+anti-IL-2), em dias intercalados, do dia -1 (um dia anterior ao da infecção) ao 7º de infecção. n=10/grupo. Teste estatístico - Parasitemia: t student *($p < 0,05$), teste não paramétrico Mann-Whitney. Sobrevivência: teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon: * $p < 0,05$. Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3.2. Efeito do tratamento de animais C57Bl/6, com anticorpo monoclonal anti-IL-2 (clone JES6-1A12), na fase aguda da infecção por *T. cruzi*.

Um ponto importante nesse modelo experimental seria o de medir a eficácia da neutralização da IL-2. Para isso, estudamos a frequência de células T reguladoras.

Na figura 11A, verificamos que ocorre um aumento gradual de células T

esplênicas CD4+CD25+ do 4º dia (8,61%) até o 21º dia (11,17%) após a infecção, no grupo infectado (Ig) comparado ao grupo controle não infectado (6,91%). Esse aumento também é verificado em números absolutos (Figura 11C). O tratamento com anti-IL-2 não resultou em aumento (tanto em porcentagem – Fig. 11A como em números absolutos – Fig. 11C) de células T CD4+CD25+ no 4º dia (7,75%) ou no 21º dia (6,42%) após a infecção, quando comparado aos controles infectado (Ig). Quando comparamos os grupos infectados entre si, verificamos que há uma significativa redução de células T CD4+CD25+ no animal tratado com anti-IL-2 (6,42%), comparado ao Infectado (Ig) (11,17%), no 21º dia de infecção. Mostrando que a neutralização de IL-2 através do tratamento com anti-IL-2, foi eficiente como esperado, pois resultou na diminuição da população de células T CD4+CD25+.

Entretanto, uma vez ativadas, as células T CD4+ expressam o receptor para a citocina IL-2 (CD25). Portanto, utilizamos um marcador restrito à população de células T reguladoras, o fator de transcrição Foxp3. Na figura 11B, verificamos que 95,58% das células T CD4+CD25+, dos controles, apresentam Foxp3+. Após a infecção, no 4º dia, há uma ligeira diminuição para 92,66%, sendo mais pronunciada no 21º dia, com apenas 37,96% das células CD4+ apresentando Foxp3+. Quando analisamos esta população nos animais infectados (21º dia) e tratados com anti-IL-2, verifica-se que há 24,96% de células T CD4+CD25+Foxp3+, comparado aos 37,96% do animal infectado (Ig) (21º dia). Essa diminuição também ocorre nas células CD4+CD25- (Figura 11B). Essa diminuição também pode ser evidenciada quando analisamos a expressão de Foxp3 sobre o total de linfócitos T CD4+, onde há redução de 5,97% (infectado + Ig) para 2,93% (infectado + anti-IL-2) de células T CD4+Foxp3+ (Figura 11D).

Desta forma, verificamos que o tratamento com anti-IL-2 resultou na neutralização da citocina IL-2. Conseqüentemente, diminuição da disponibilidade desta no microambiente, o que resultou na diminuição da população de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+ que necessitam desta citocina para sua manutenção periférica.

6.3.3. Alterações na celularidade esplênica total e em subpopulações de linfócitos T, decorrente da diminuição de linfócitos T regulatórios nos animais tratados com anti-IL-2 e infectados com *T. cruzi*.

Durante a fase aguda (21º dia) da infecção experimental por *T. cruzi*, a celularidade total do baço aumenta em relação ao controle não infectado. O tratamento com anti-IL-2 resultou em aumento ainda maior da celularidade do baço, quando esta foi comparada aos números obtidos do grupo controle infectado (Ig). No 4º dia após a infecção não observamos diferenças no tamanho do baço quando comparamos os grupos (Figura 12A).

Na figura 12B, observamos que durante a infecção aguda de C57Bl/6 ocorre aumento do número de linfócitos T CD4+ e CD8+. Este aumento dos números absolutos de células T CD4+ e CD8+ nos animais infectados e tratados com anti-IL-2 foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle infectado (Ig).

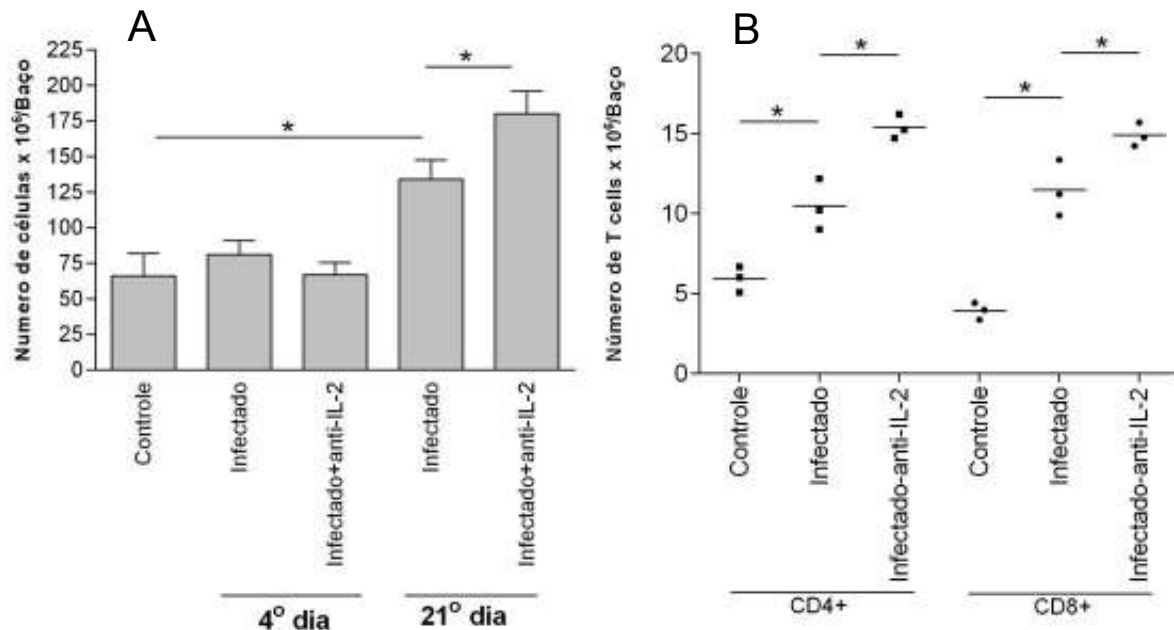


Figura 12. Número de células esplênicas totais, células T CD4+ ou CD8+ no 4º e 21º após a infecção. Nesta figura estão representados os números totais de células do baço (A) e o número total de linfócitos T esplênicos CD4+ e CD8+ (B). Grupos experimentais: C57Bl/6 controles (Controle), C57Bl/6 Infectado tratado com Ig (Infectado) e C57Bl/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2). n=3/por grupo. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3.4. Aumento da ativação celular nos animais tratados com anti-IL-2 e infectados com *T. cruzi*.

A molécula denominada CD69 é um marcador de ativação presente em linfócitos e células NK quando recentemente ativadas. Portanto, estudando-se a presença deste marcador é possível determinar se a célula foi ativada recentemente. Desta forma, observamos que ocorre um aumento numérico de linfócitos T CD4+CD69+ e CD8+CD69+ (Fig. 13A) nos animais infectados (Ig) comparado ao controle não infectado. Adicionalmente, quando o animal é tratado com anti-IL-2, observa-se um aumento ainda maior de células T CD4+CD69+ e um discreto aumento de células CD8+CD69+, comparado ao infectado (Ig). Este aumento numérico está mostrado na figura 13A e os gráficos (“Dot Plots” e histogramas) de citometria ilustram os resultados, mostrando (números relativos ou freqüências relativas ou porcentagens) de cada subpopulação, conforme indicado.

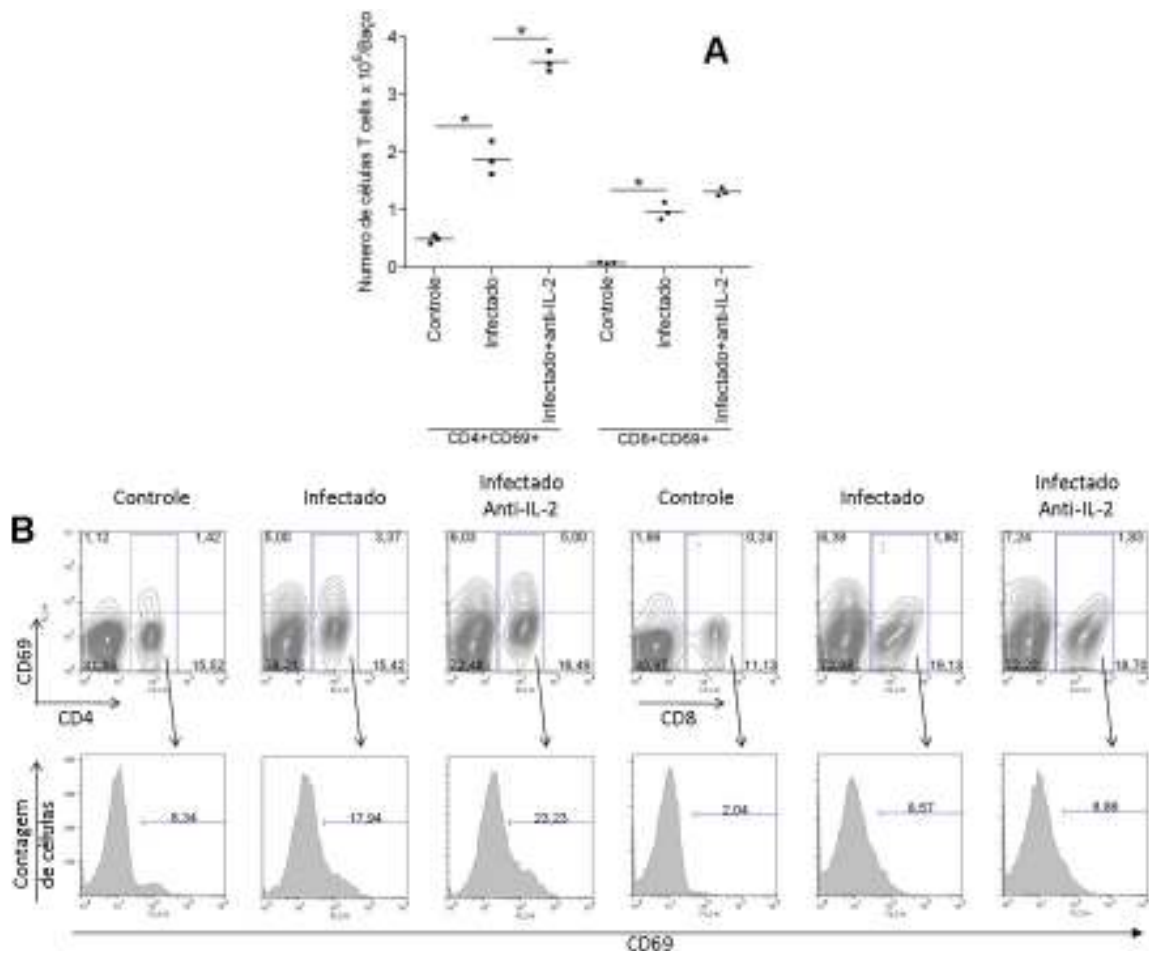


Figura 13. Números totais e a porcentagem de células T CD4+ e CD8+ apresentando fenótipo de ativação recente (CD69+) no 21º dia após a infecção. A figura A representa o número total de células T CD4+CD69+ e CD8+CD69+. Os gráficos e histogramas apresentados em B ilustram as proporções de cada subpopulação nesses estudos. Grupos experimentais: C57Bl/6 controles (Controle), C57Bl/6 Infectado tratado Ig (Infectado) e C57Bl/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2). n=3/por grupo. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3.5. Aumento da geração de linfócitos T de memória efetora ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$) e de memória central ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}$) durante a fase aguda (21º dia) da infecção de animais tratados com anti-IL-2.

Além do marcador de ativação CD69, utilizamos também outros marcadores de superfície que são utilizados para fenotipagem de células de memória efetoras e memória central como o CD44 e o CD62L. Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* observamos aumento do número absoluto (Fig. 14B) de linfócitos T $CD4+CD62L^{\text{baixo}}$ e $CD8+CD62L^{\text{baixo}}$, comparado ao animal controle não infectado. Da mesma maneira, ocorre aumento do número de células T $CD4+CD44^{\text{alto}}$ e $CD8+CD44^{\text{alto}}$ (Figura 14A) nos animais infectados comparados aos não infectados. O tratamento com anti-IL-2 resulta em aumento ainda maior do número de células T $CD44^{\text{alto}}$ (Fig. 14A) e de $CD62L^{\text{baixo}}$ (Fig. 14B).

As células T de memória central podem ser caracterizadas pelo fenótipo $CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}$ e os linfócitos T de memória efetora são $CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$. Verificamos que ocorre aumento numérico (Fig. 14C) das populações de linfócitos T $CD4+$ e $CD8+$ com os marcadores $CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$ nos animais infectados e tratados com anti-IL-2, comparado aos infectados e tratados com Ig (Fig. 14C e 14D). Com relação aos linfócitos T $CD4+$ e $CD8+$ de memória central, verifica-se que houve apenas um discreto aumento no grupo tratado com anti-IL-2, comparado ao grupo infectado (Ig) (Fig. 14C e 14D).

Desta forma, ocorre um aumento pronunciado de células de memória efetoras tanto $CD4+$ como $CD8+$, nos animais tratados com anti-IL-2.

Estas alterações podem ser observadas nos “Dot Plots” da figura 15, que ilustram as proporções celulares marcadas com anticorpos anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD4 (Fig. 15A e 15C) e anti-CD8 (Fig. 15B e 15D).

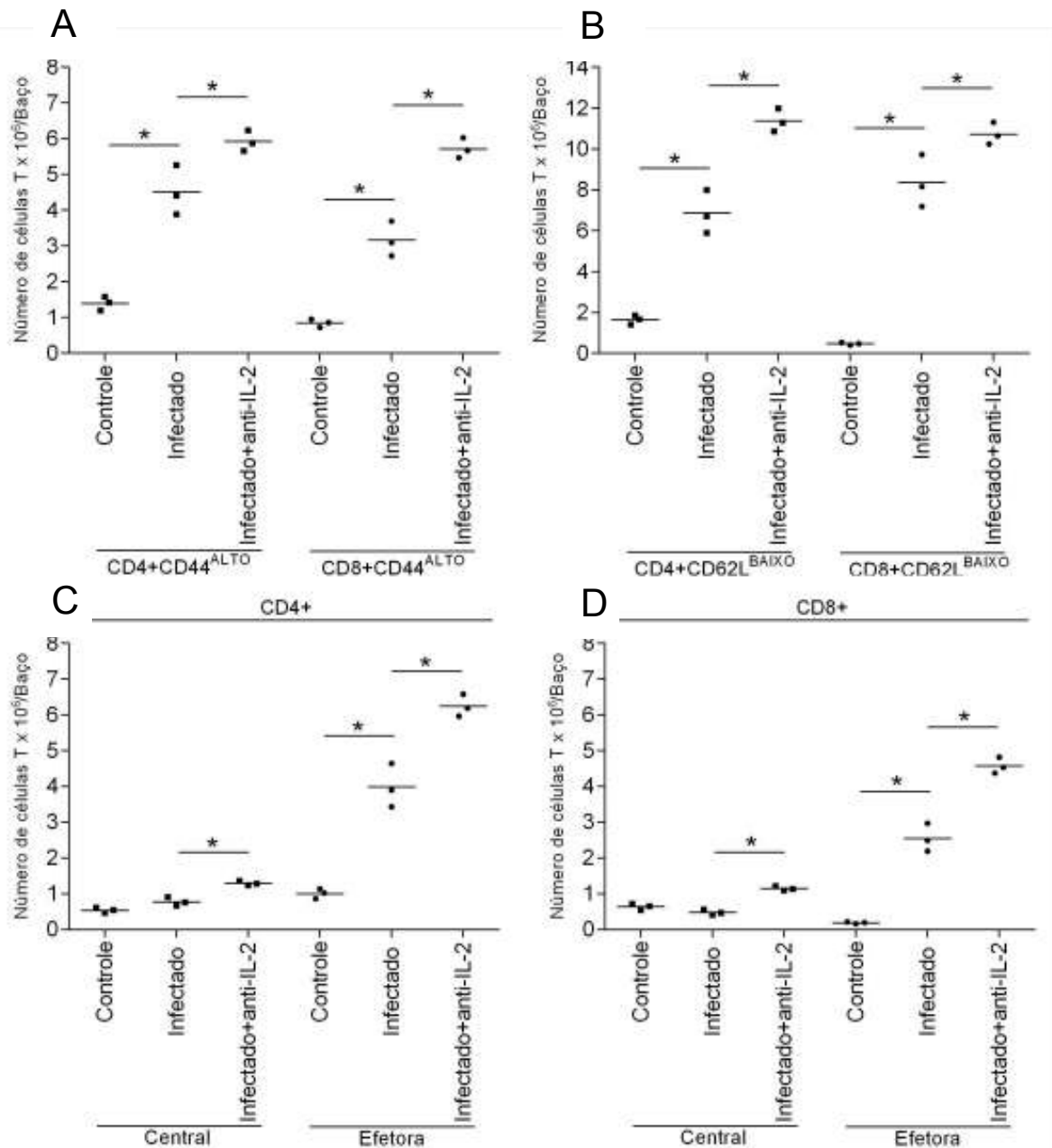


Figura 14. Quantificação de populações de linfócitos com marcadores de memória central (CD44^{alto}CD62L^{alto}) e efetora (CD44^{alto}CD62L^{baixo}), durante a fase aguda (21 dias) da infecção em animais C57BL/6 tratados ou não com anti-IL-2. Nesta figura está representado o número total de linfócitos T esplênicos CD4+ ou CD8+ com marcador CD44^{alto} (A) ou CD62L^{baixo} (B). Nas figuras C e D o número total de células T CD4+ (C) e CD8+ (D) de memória central e efetora nos diferentes grupos experimentais está mostrado. Grupos experimentais: C57BL/6 controles (Controle), C57BL/6 Infectado tratado Ig (Infectado) e C57BL/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2) Animais: n=3 por grupo. Análise estatística com teste Mann-Whitney *(p<0,05). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

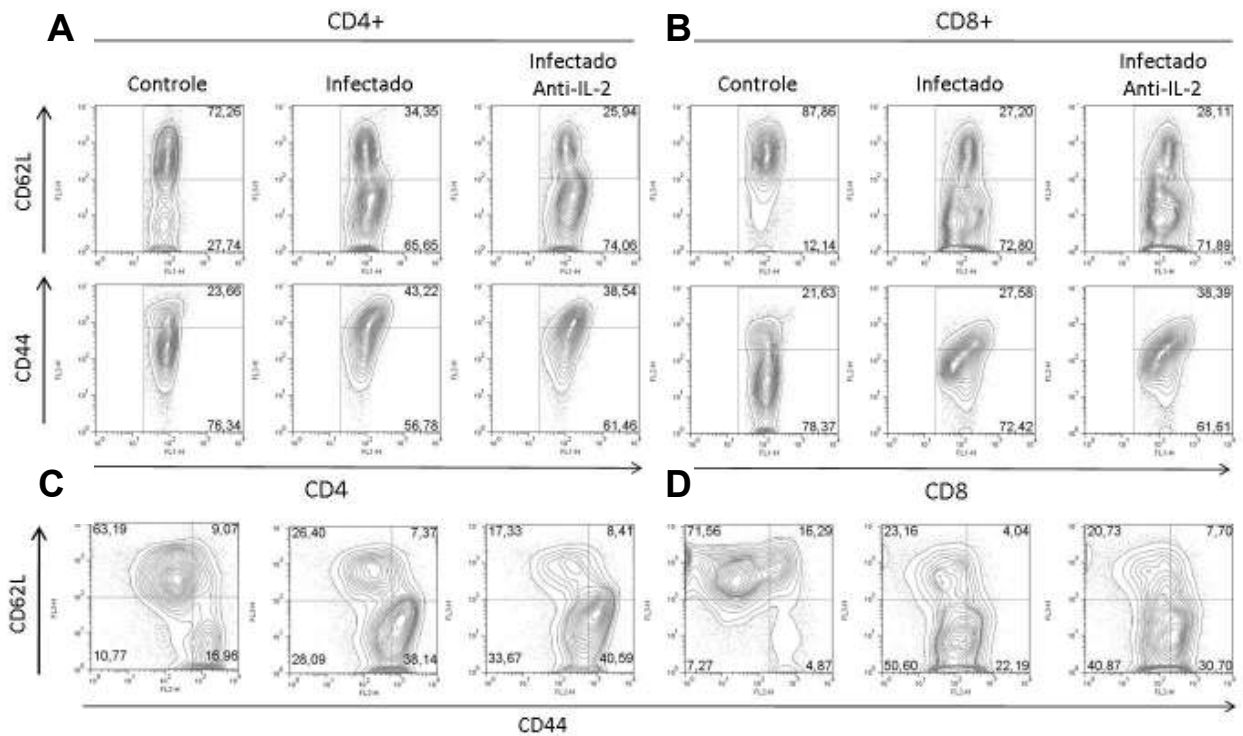


Figura 15. Quantificação de populações de linfócitos com marcadores de memória central ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}$) e efetora ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$), durante a fase aguda (21 dias) da infecção em animais C57BL/6 tratados ou não com anti-IL-2. Nesta figura está representada a porcentagem de linfócitos esplênicos CD4+ (A e C) e CD8+ (B e D) com relação aos marcadores CD44 ou CD62L (A). Em C (CD4+) e D (CD8+) são mostrados figuras de citometria, com as distribuições das diferentes populações de células T de memória nos diferentes grupos experimentais. n=3 por grupo. Grupos experimentais: C57BI/6 controles (Controle), C57BI/6 Infectado tratado Ig (Infectado) e C57BI/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3.6. Quantificação da produção de citocinas por linfócitos T esplênicos CD4+ e CD8+ de animais C57BL/6 infectados e tratados ou não com anti-IL-2.

Além da análise fenotípica das subpopulações de linfócitos T presentes no baço dos animais infectados e tratados ou não com anti-IL-2, realizamos a quantificação da produção de citocinas, utilizando marcação intracelular e análise por citometria de fluxo. Células T CD4+ de animais infectados e tratados com anti-IL-2 apresentaram discreto aumento na produção de IFN- γ (Fig. 16A e B), IL-10 (Fig. 16E e F) e TNF- α (Fig. 16I e J). Este aumento foi significativo para cada citocina estudada quando o número total de cada população foi comparado ao número total destas mesmas populações provenientes de animais infectados e tratados com imunoglobulinas de rato (Figura 16M).

Adicionalmente, os linfócitos T CD8+ apresentaram um grande aumento na produção de IFN- γ (Fig. 16C e D) e TNF- α (Fig. 16K e L) no grupo tratado com anti-IL-2, comparado aos controles infectados. Os números absolutos mostram que os animais tratados com anti-IL-2 apresentaram maior número de células T CD4+ e CD8+ com produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α comparados aos controles infectados (Ig) (Figura 16M).

Desta forma, os animais tratados com anti-IL-2 apresentaram maior produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, quando comparados aos controles infectados.

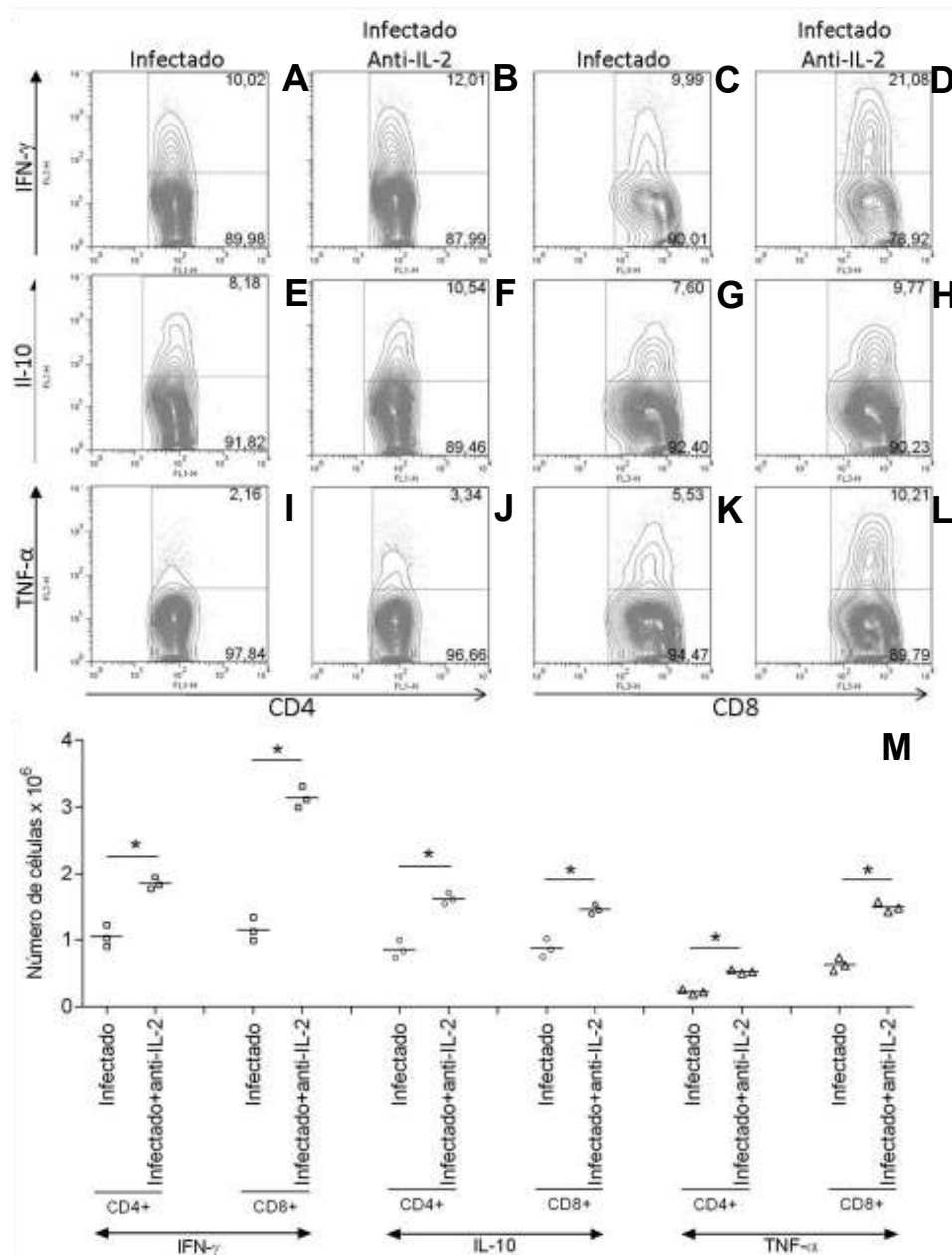


Figura 16. Número total de populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- γ , IL-10 e TNF- α , durante a fase aguda (21º dia) da infecção em animais C57BL/10 tratados ou não com anti-IL-2. Nesta figura está representado a percentagem de células esplênicas CD4+ e CD8+ produtoras de citocinas nos animais infectados e tratados com imunoglobulina policlonal de rato ou infectados e tratados com anticorpo monoclonal anti-IL2. A produção de IFN- γ (A-D), IL-10 (E-H), TNF- α (I-L) estão ilustradas. Os números absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IFN- γ , IL-10 e TNF- α estão mostrados na Figura M. Grupos experimentais: C57Bl/6 controles (Controle), C57Bl/6 Infectado tratado Ig (Infectado) e C57Bl/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2). n=3 por grupo. Análise estatística com teste Mann-Whitney *($p < 0,05$). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

6.3.7. Análise das populações de linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético e cardíaco de animais C57BL/6 infectados e tratados ou não com anti-IL-2.

Verificamos que um pequeno número de células T CD4⁺ Foxp3⁺ migram para o tecido muscular esquelético durante a fase aguda da infecção. Além da diminuição do número de células expressando Foxp3 em linfócitos T esplênicos, os animais tratados com anti-IL-2 e infectados também apresentaram diminuição de células T reguladoras nos linfócitos presentes no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético, quando comparados aos animais somente infectados (Figura 17 A). No tecido cardíaco a expressão de Foxp3 foi muito pequena nos animais infectados, sendo, portanto, difícil detectar alguma diferença nos animais tratados (dados não mostrados).

Ao contrário, quando analisamos o fenótipo dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quanto à presença de CD44^{alto}CD62L^{baixo} (memória efetora) e CD44^{alto}CD62L^{alto} (memória central), não observamos diferenças da frequência dessas células no músculo esquelético dos animais tratados comparado ao não tratado. No tecido cardíaco, houve diminuição dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central nos animais tratados comparados aos não tratados. Adicionalmente, houve aumento da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora no tecido cardíaco dos animais tratados (Figura 17B).

Qualitativamente, observamos que os linfócitos T CD8⁺ de memória efetora que infiltram o tecido cardíaco estariam produzindo maior quantidade de IL-10 e IFN- γ nos animais tratados, quando comparado ao grupo não tratado. Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ apresentaram aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ (Figura 17C). Na figura 17D, está mostrada a análise morfométrica, onde podemos observar que há um aumento, estatisticamente significativo, do infiltrado inflamatório no tecido muscular esquelético dos animais tratados com anti-IL-2.

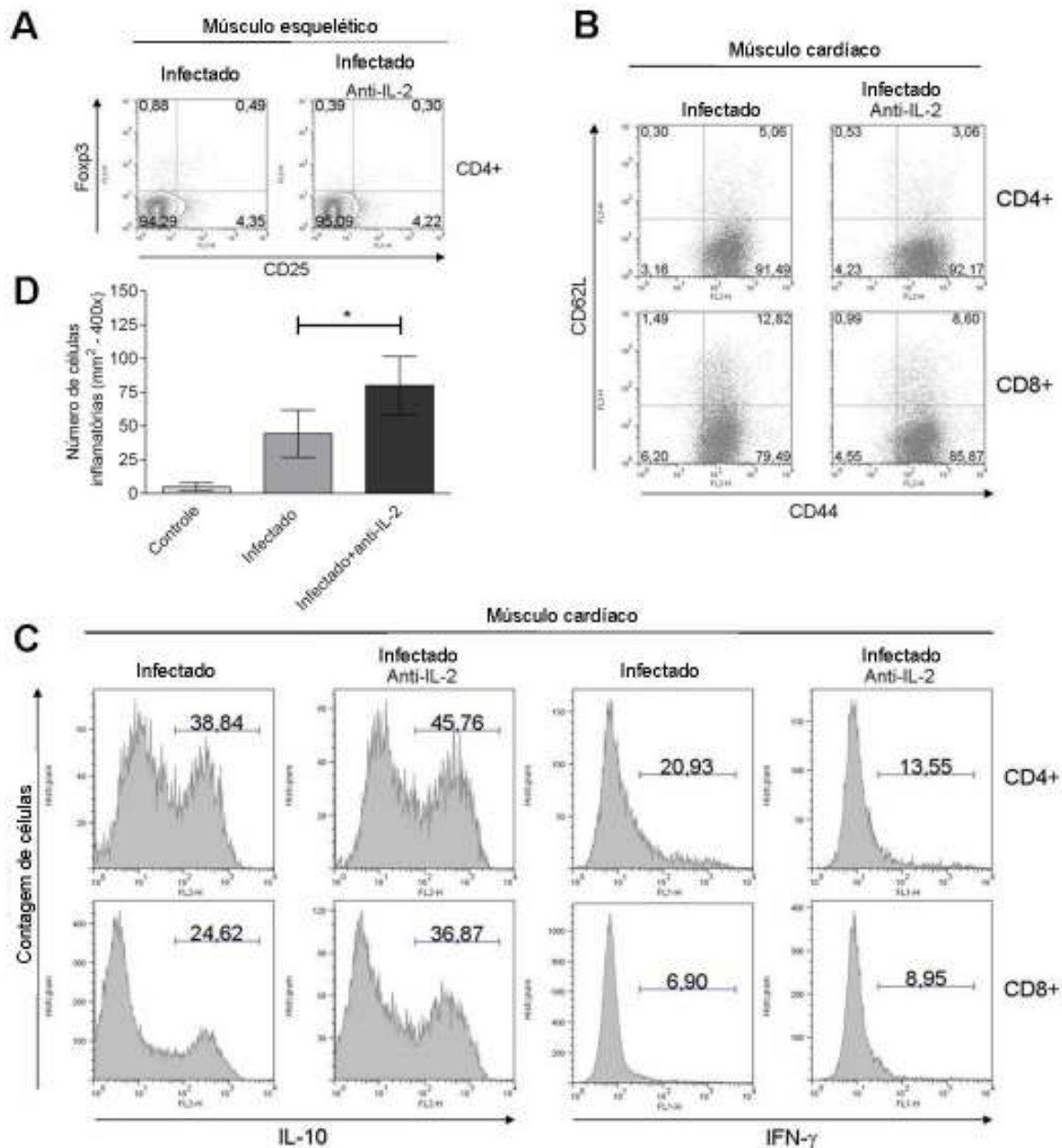


Figura 17. Análise morfométrica e qualitativa das populações de linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético e cardíaco, durante a fase aguda (21 dias) da infecção em animais C57BL/6 tratados ou não com anti-IL-2. Nesta figura está representada a porcentagem de células Foxp3⁺ no tecido muscular esquelético, a porcentagem de memória central e efetora no coração (B), produção de IL-10 e IFN- γ (C) no coração e morfometria do tecido muscular esquelético (D). Grupos experimentais: C57BL/6 Infectado tratado Ig (Infectado) e C57BL/6 infectados e tratados com anti-IL-2 (Infectado+anti-IL-2). n=3/por grupo. Análise estatística com teste Mann-Whitney * (p<0,05). Os dados mostrados são representativos de três repetições experimentais.

7. DISCUSSÃO

Atualmente, apesar da investigação extensiva, os mecanismos imunorregulatórios utilizados pelo hospedeiro para controlar a infecção pelo *T. cruzi* ainda não estão totalmente elucidados. As características quantitativas e qualitativas da maioria das subpopulações celulares que participam da resposta imune ao *T. cruzi*, têm sido muito investigadas. Porém, ainda não está claro quais os mecanismos imunorregulatórios que controlam a resposta imune e que podem, ou não, refletir na susceptibilidade à infecção ao *T. cruzi*. Desta forma, os questionamentos atuais, presentes na literatura recente, estão voltados para os mecanismos imunorregulatórios envolvidos na resposta imune e para a terapêutica. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar se as células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) estariam participando no processo imunorregulatório da resposta imune ao parasito, controlando a geração/manutenção de células efetoras, células de memória e o perfil de secreção de citocinas, durante a fase aguda da infecção pela cepa Tulahuen do *Trypanosoma cruzi*.

Na primeira etapa deste estudo realizamos uma investigação comparativa da resposta imunológica de animais resistentes (BALB/c) e susceptíveis (C57Bl/6) à infecção pela cepa Tulahuen. Para tal, analisamos alguns parâmetros indicadores de resistência à infecção, como a parasitemia, mortalidade, quantificação das populações linfocitárias e produção de citocinas. Estes resultados serão apresentados e discutidos a seguir.

No presente estudo foi investigado inicialmente a sobrevivência e o número de parasitos circulantes em animais BALB/c e C57Bl/6 infectados com a cepa Tulahuen do *T. cruzi*. A inoculação com 1000 formas tripomastigotas resultou em maior parasitemia nos animais C57Bl/6 no início da infecção até o 16º dia. Adicionalmente, no 26º dia há um pico parasitêmico significativamente maior nos animais BALB/c. Estudo de ROGGERO e colaboradores, em 2002, mostraram que não houve diferença na parasitemia entre os dois grupos de animais (BALB/c e C57Bl/6), quando foram inoculados com 100 formas tripomastigotas. Entretanto, CARDILLO e colaboradores (2001) já haviam demonstrado que o inóculo de 100 formas tripomastigotas resulta em

menor parasitemia e mortalidade nos animais C57Bl/6, comparado ao inóculo de 1000 formas. Sendo assim, nossos resultados corroboram com os dados de ROGGERO (2002), no que se refere à taxa de mortalidade, pois o grupo de animais C57Bl/6 apresentou maior mortalidade comparado aos animais BALB/c. Desta forma, pode-se dizer que neste modelo experimental, a linhagem BALB/c apresenta menor susceptibilidade ou maior resistência à infecção quando comparada à linhagem C57Bl/6. É importante destacar que as características de susceptibilidade e resistência dos animais citados acima, não se aplicam a todos os modelos de infecção por *T. cruzi*, pois há implicações quanto às diferenças genéticas do hospedeiro e da cepa do parasito utilizada. Tais combinações podem influenciar o resultado da infecção. Entretanto, a relação de resistência e susceptibilidade, dos animais BALB/c e C57Bl/6 também têm sido demonstrada em estudos que utilizaram outros modelos de infecção experimental. Por exemplo, a infecção por *Listeria monocitogenes* (CHEERS et al., 1988), *Leishmania sp* (HEINZEL et al., 1998) e *Mycobacterium avium* (APPELBERG et al., 1994), dentre outros.

Diversos estudos utilizando o modelo experimental de infecção por *T. cruzi* sugerem que a resposta imune do perfil de citocinas Th1 e a participação efetiva de ambas as subpopulações de células T CD4+ e CD8+, são importantes no controle da parasitemia (ALIBERTI et al., 1996; SILVA et al., 1998). Por outro lado, CARDILLO e colaboradores (2007) utilizando-se de um modelo de infecção, em animais deficientes de linfócitos B, infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, demonstraram que as células B são importantes na geração e manutenção de células T efectoras/memória, bem como na determinação do padrão funcional de citocinas secretadas pelas células T. O resultado desta redução quantitativa de linfócitos T efectoras/memória e de secreção de citocinas do padrão Th1 foi a maior susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi*.

Na tentativa de melhor elucidar os mecanismos relacionados a resistência e/ou susceptibilidade investigamos a dinâmica de formação e manutenção de alguns fenótipos relacionados à ativação de células T, bem como seus números absolutos. Nossos resultados mostram que os animais BALB/c apresentam maior expansão de células esplênicas totais, quando comparados aos animais C57Bl/6 durante a infecção

aguda. Houve uma considerável expansão de linfócitos T CD8+ nos animais resistentes da linhagem BALB/c. Este aumento foi de 4 vezes no 20º dia e 5,5 vezes no 30º dia de infecção, quando comparado ao grupo controle não infectado ($p < 0.01$ em ambos os casos). No mesmo período da infecção houve aumento discreto das células T CD4+, sugerindo que a resistência à infecção pelo protozoário intracelular *T. cruzi*, requer a participação efetiva das células T CD8+ na eliminação das células infectadas e possivelmente das células T CD4+ que de alguma forma poderiam induzir e/ou controlar a resposta imune. BEVAN e colaboradores (2004) demonstraram que a formação de células T CD8+ efetoras/memória na resposta primária não é dependente de células T CD4+. Porém, a manutenção da subpopulação de células T CD8+ de memória geradas, previamente, é dependente de células T CD4+ em dois modelos experimentais: 1- infecção por *Listeria monocytogenes* e 2- infecção pelo vírus LCMV. Pode-se afirmar, portanto, que mesmo que haja diferenças na predominância de células T CD8+ (SUN e TARLETON, 1998) sobre as células T CD4+ (RUSSO et al., 1988; ARAUJO et al., 1989; RIBEIRO DOS SANTOS et al., 2001) durante a infecção pelo *T. cruzi*, é necessária a presença de ambas as populações celulares para que haja uma resposta efetora apropriada, uma vez que ambas são importantes na resistência à infecção como previamente demonstrado. Adicionalmente, a análise dos animais susceptíveis da linhagem C57Bl/6, mostrou que não houve expansão considerável de células T CD4+ e CD8+ no curso da infecção aguda pelo *T. cruzi*.

Segundo CARDILLO e colaboradores (2002 e 2007) a formação e a manutenção de linfócitos T de memória efetora e central são importantes nos mecanismos de resistência à infecção aguda por *T. cruzi*. Desta forma, em nosso estudo realizamos a quantificação fenotípica das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, quanto aos marcadores CD44 e CD62L. As células T não ativadas ou virgens apresentam marcadores de superfície celular que as tornam fenotipicamente distintas das ativadas ou de memória. Assim, as células T virgens expressam altos níveis de CD45RB e CD62L e quantidades baixas ou intermediárias de CD44. Após a ativação celular, ocorre alteração na expressão destas moléculas, havendo diminuição dos níveis de CD45RB e CD62L e aumento da expressão de CD44. Sendo assim, a ativação das células T causa modulação negativa e/ou positiva de alguns de seus marcadores de membrana

(SPRENT, 1993; BRADLEY et al., 1991; SALUSTO et al., 1999; MACKAY et al., 1992). Segundo LANZAVECHIA e colaboradores (2004), através dos marcadores de superfície é possível identificar duas subpopulações funcionalmente distintas, como a seguir: 1- células T de memória efetoras ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$) e 2- células T de memória central ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}$). As células T de memória efetoras apresentam alta expressão de CD44 e baixa expressão de CD62L, enquanto que as células de memória central apresentam alta expressão de CD44 e de CD62L, diferentemente das células T virgens ou “naive”, que apresentam alta expressão de CD45Rb e CD62L e baixa expressão de CD44. Seria importante ressaltar que as células T de memória do tipo efetora podem migrar para os tecidos e, portanto, podem exercer suas atividades funcionais extra sistema linfóide, enquanto as células T de memória central formam um “pool” de reserva, contendo células de memória nos órgãos linfóides secundários.

Nossos resultados demonstram que os animais considerados resistentes à cepa Tulahuen, apresentaram expansão das células T $CD4+CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$ precocemente em relação à evolução da infecção. Ao contrario, os animais susceptíveis não apresentaram aumento nesta subpopulação durante a infecção aguda. Os animais BALB/c apresentaram significativo aumento da população de células T $CD8+CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$ a partir do 10º dia, mantido até o 30º dia de infecção. Já os animais C57Bl/6 apresentaram aumento significativo apenas no 20º dia, para em seguida, no 30º dia de infecção, apresentarem contração no tamanho desta subpopulação. Estes dados correlacionam-se com a parasitemia, pois o pico parasitêmico ocorreu entre o 20º e 30º dias de infecção e mostram que a linhagem BALB/c, que apresenta menor pico parasitêmico neste período, teve maior expansão das células T $CD4+$ e $CD8+$ com fenótipo $CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{baixo}}$, no 20º, mantendo os números até 30º dia, sugerindo fortemente que as células efetoras geradas nestes camundongos estejam de fato controlando a carga antigênica.

A análise das populações de células T esplênicas de memória central ($CD44^{\text{alto}}CD62L^{\text{alto}}$) revelou uma manutenção quantitativa das células T $CD4+$ nos camundongos resistentes que apresentaram um maior número dessas células durante toda a infecção aguda, quando comparados com a linhagem susceptível, que apresentaram uma pequena diminuição deste fenótipo celular. O mesmo tipo de estudo

para as células T CD8+ de memória central revelou uma contração inicial deste conjunto de células em ambas as linhagens. No entanto, esta subpopulação aumentou progressivamente nos animais resistentes, permanecendo diminuída durante toda a infecção aguda nos animais susceptíveis. Juntos, esses dados sugerem fortemente que na linhagem susceptível há uma maior dificuldade em se gerar e manter as populações de células T de memória central e efetora. Esta maior dificuldade poderia estar relacionada a mecanismos ativos de supressão (SAKAGUCHI et al., 2001) ou mesmo a falta de citocinas importantes para a sua geração/manutenção, como por exemplo, IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 (Revisto em SCHLUNS e LEFRANÇOIS, 2003).

Adicionalmente à celularidade, expansão e geração/manutenção de células de memória efectoras/central, outro parâmetro considerado relevante ao avaliarmos a resistência à infecção por *T. cruzi* é o perfil funcional dessas mesmas células, ou seja, a produção de citocinas. Diversos estudos têm demonstrado que o padrão Th1 de citocinas possui maior efetividade no controle de parasitos intracelulares, sendo o IFN- γ a principal citocina envolvida nos mecanismos de resistência a infecção (CARDILLO et al., 1996). No entanto, para impedir a exacerbação da resposta inflamatória, que pode resultar em maior lesão tecidual, há mecanismos imunorregulatórios que controlam a evolução da resposta imune. Dentre eles, há citocinas inibitórias, por exemplo, a IL-10 que pode inibir a produção de IFN- γ por células T, bem como diminuir a produção de óxido nítrico e TNF- α pelos macrófagos (MOORE et al., 1993; GAZZINELLI et al., 1992; SILVA et al., 1992). Além disso, a IL-10 induz queda da expressão de MHC classe II e de moléculas coestimulatórias em células dendríticas, prevenindo, desta forma, a maturação e ativação das células dendríticas (MOORE et al., 2001).

A importância da IL-10 nos mecanismos regulatórios é evidenciada em modelos animais, deficientes para esta citocina. Camundongos que não produzem IL-10, quando infectados pelo *T. cruzi*, apresentam baixa parasitemia e alta mortalidade (ABRAHAMSOHN et al., 1996; HUNTER et al., 1997). Estes últimos estudos sugerem que o equilíbrio das citocinas consideradas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ser a melhor maneira de se lidar com o aumento numérico do parasito na circulação sanguínea e nos tecidos, permitindo assim, aumentar a sobrevivência da relação hospedeiro/parasito. Desta forma, a infecção pelo *T. cruzi*, por ser uma infecção

persistente, implicaria em que ambos, parasito e hospedeiro desenvolvessem estratégias para co-existir, diferentemente de uma infecção na qual a expansão da resposta imune específica ao patógeno, geralmente, coincide com a erradicação da mesma. Há indicações recentes de que mesmo a IL-10, com toda a extensão atividade inibitória, poderia ser crucial para a resistência e sobrevivência de camundongos ao *T. cruzi* (ROFFÊ et al., 2012)

Em nosso modelo experimental, verificamos que os animais C57Bl/6 apresentaram aumento quantitativo de células T CD4+ produtoras de IFN- γ no baço que não foi diferente do aumento detectado para a linhagem resistente. O aumento de células T CD4+ produtoras de IFN- γ também ocorre no infiltrado inflamatório dos tecidos musculares esqueléticos e cardíacos em camundongos susceptíveis. Por outro lado, na linhagem resistente houve apenas um discreto aumento na proporção de células T CD4+ produtoras de IFN- γ nos tecidos musculares mencionados acima. Adicionalmente, as alterações quantitativas de células T CD4 produtoras de IFN- γ não são acompanhadas pelo aumento de células T CD8+ secretoras de IFN- γ no baço e nos tecidos dos animais da linhagem susceptível.

Os resultados aqui apresentados mostram ainda que os animais BALB/c apresentaram aumento significativo e progressivo de esplenócitos T CD4+ IFN- γ + e CD8+ IFN- γ +. No entanto, houve também, um aumento de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IL-10+ no baço. A produção de IL-10 por células T CD8+ foi mais tardia quando se comparou com células CD8+ esplênicas provenientes de animais susceptíveis. Somados, nossos resultados sugerem um papel fundamental da rápida geração de células CD8+ de memória, produtoras de IFN- γ no controle da parasitemia. A produção mais precoce de IL-10 por células CD8+ esteve associada a susceptibilidade, enquanto a produção mais tardia desta citocina foi relacionada ao controle da infecção e sobrevivência dos animais.

A interleucina-10 é uma das principais citocinas secretadas pelas células T reguladoras induzidas, chamadas originalmente de Tr1 (T reguladora 1), caracterizadas pela alta produção de IL-10 e ausência de Foxp3 (GROUX et al., 1997; WAKKACH et al., 2003). A IL-10 secretada pelas células T CD4+ de ambos os grupos experimentais, poderia estar exercendo um efeito imunomodulador no sentido de controlar a resposta

imune inflamatória. Entretanto, este efeito imunomodulador foi mais pronunciado nos animais BALB/c, resistentes. Nestes animais, houve aumento progressivo na quantidade células T CD4⁺ IL-10⁺ a partir do 10^o dia de infecção, diferentemente do animal C57B/6 que apresentou quantidade aumentada dessas células somente no 20^o dia de infecção e uma diminuição no 30^o dia. No entanto, a frequência de células produtoras de IL-10 nos tecidos dos camundongos susceptíveis foi sempre superior às encontradas na linhagem resistente, sendo uma parte dessa IL-10 foi proveniente de células que também secretaram IFN- γ . Estas células T que produzem IFN- γ e IL-10 concomitantemente, não foram detectadas em camundongos resistentes BALB/c e foram previamente associadas a atividade supressora em outro modelo de infecção parasitaria (ANDERSON et al., 2007). Dessa forma, a hipótese de que a IL-10 proveniente de células CD4⁺ seja uma importante citocina com atividade reguladora neste modelo fica em evidência.

Há uma segunda subpopulação de células T reguladoras induzidas que se diferenciam em microambiente rico em TGF- β e IL-2 e expressam Foxp3 (CHEN et al., 2003; FANTINI et al., 2004). As células T reguladoras induzidas diferem das células T reguladoras naturais pelo fato de serem geradas mediante apresentação de antígenos não próprios pelas células dendríticas, nos tecidos linfóides periféricos. Desta forma, as células Treg induzidas seriam reativas a antígenos não próprios, enquanto as Treg naturais são específicas a antígenos próprios. A produção de TGF- β já foi relacionada a susceptibilidade em modelo experimental semelhante, utilizando-se a cepa Tulahuen do *T. cruzi* (SILVA et al., 1991). Portanto, em teoria, haveria a possibilidade de que o TGF- β , juntamente com IL-2 pudesse estar atuando na indução de susceptibilidade, aumentando a geração de células Treg induzidas CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Na figura 9 podemos observar que os animais C57B/6 apresentaram diminuição de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ quando comparados aos animais resistentes da linhagem BALB/c. Estes achados, em conjunto, mostram que os animais resistentes possuem um maior número global de células T CD4⁺ reguladoras Foxp3⁺ e/ou secretoras de IL-10 quando comparados aos animais susceptíveis. No entanto, o número global de células reguladoras não reflete o número de células reguladoras específicas para a miríade de antígenos contida no parasito, havendo a possibilidade de que os animais susceptíveis

tenham uma frequência maior de células reguladoras específicas para o *T. cruzi* que os animais resistentes. Nesta estrutura de pensamento, podemos sugerir que possa haver um determinado limite onde, acima deste, exista uma eficiência global da resposta imune adaptativa tanto no seu ramo efetor como regulador, que possa controlar a carga antigênica rapidamente, gerando pouca patologia. Neste caso, esse limite seria alcançado pela rapidez na geração/manutenção de células T de memória e poderia envolver a qualidade da resposta imune inata prévia ou mesmo a atividade reguladora (funcional e/ou numérica) do sistema imune adaptativo, antes mesmo da própria infecção. Num outro extremo, quando este limite não é atingido rapidamente, pela deficiência de uma resposta inata adequada ou por excesso da atividade reguladora (funcional e/ou numérica) do sistema imune adaptativo, o organismo teria um atraso no desenvolvimento da resposta adaptativa e conseqüente aumento da carga antigênica, promovendo um tipo de efeito rebote com hiperativação tardia do sistema imune adaptativo, controle tardio da carga antigênica e patologia incompatível com a sobrevivência do hospedeiro.

Seguindo a linha de raciocínio acima, nós decidimos investigar se a diminuição quantitativa global e o bloqueio funcional parcial das células T reguladoras poderia de alguma forma alterar o padrão de susceptibilidade da linhagem C57BL/6 frente à infecção pela cepa Tulahuen do *T. cruzi* de modo similar ao encontrado na linhagem BALB/c. As células T reguladoras Foxp3⁺ expressam receptores triméricos de alta afinidade para a IL-2 (constituídos pelas cadeias β (CD122), γ (CD132) e α (CD25)) (SAKAGUCHI et al., 1995; TANIGUCHI et al., 1993). No entanto, as células T recém ativadas também expressam este tipo de receptor (ORTEGA et al., 1984). Há anticorpos monoclonais que podem depletar *in vivo* as células CD25⁺, mas, no entanto, também depletam células recém ativadas que tornar-se-ão efetoras. Este tipo de reagente tem sido utilizado em ensaios clínicos para promover a destruição de células efetoras em transplantação, e em doenças autoimunes como a esclerose múltipla (STROM e KELLEY, 1989; STROM et al., 2003). Por outro lado, diversos estudos têm sugerido que a citocina IL-2 estaria relacionada com diversas etapas da resposta imune como a expansão, contração, geração de memória imunológica e resposta secundária

(BOYMAN et al., 2010). Além disso, a citocina IL-2 estaria, também, relacionada com a geração e manutenção de células T regulatórias Foxp3+ .

No passado, para se descobrir a função e/ou atividade da IL-2, os genes da IL-2 e de duas subunidades de seu receptor (IL-2R) (IL-2R α (CD25) e IL-2R β (CD122), foram inativados e o fenótipo resultante não foi a imunodeficiência como previsto na época, mas um quadro de doença linfoproliferativa e autoimunidade (SADLACK et al., 1995; WILLERFORD et al., 1995). Mais tarde, verificou-se que estes mesmos animais (deficientes para o receptor da citocina IL-2) apresentam um número significativamente reduzido de linfócitos T reguladores naturais CD4+CD25+ (PAPIERNIK et al., 1998). Adicionalmente, a transferência de células T CD4+CD25+, para animais deficientes em IL-2, resultou na inibição da proliferação de linfócitos T IL-2^{-/-} (WOLF, 2001). Outros estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a IL-2 é pré-requisito para a ativação funcional e a manutenção homeostática dos linfócitos T reguladores (THORNTON et al., 2004; FURTADO et al., 2002; SAKAGUCHI et al., 2004). Embora, a IL-2 tenha sido descrita inicialmente como um fator de crescimento fundamental para células T CD8+, outros autores demonstraram o contrario. Por exemplo, em 2003, LEFRANÇOIS e colaboradores demonstraram que a proliferação inicial de células T CD8+ antígeno-específicas (recém ativadas) foi independente de IL-2.

Desta forma, a neutralização da citocina IL-2 pelo tratamento de camundongos infectados pelo *T. cruzi* com o anticorpo monoclonal anti-IL-2 (clone JES6-1A12), foi nossa opção para diminuir quantitativa e qualitativamente as células T reguladoras, alterando minimamente a atividade de células T efetoras. Dados anteriores de neutralização de IL-2 já haviam demonstrado que esta citocina é importante na geração e manutenção das células T Foxp3+, resultando em alterações imunorregulatórias e conseqüentemente em desenvolvimento de síndrome autoimune (SAKAGUCHI et al., 1995). A expressão de Foxp3 é atualmente considerada um dos marcadores mais específicos para células T regulatórias. Foxp3 é preferencialmente expresso em células T CD4+CD25+, e camundongos com deficiência de Foxp3 não apresentam células Treg funcionais (FONTENOT et al., 2003; HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003). Além das células T reguladoras naturais que se desenvolvem no timo, expressam Foxp3 e altos níveis de CD25 constitutivamente, as células T reguladoras induzidas são geradas a

partir de células T CD4⁺ Foxp3⁻ convencionais e também necessitam de IL-2 para sua diferenciação, expressão de Foxp3 e sobrevivência em tecidos linfóides periféricos (SCHALLENBERG et al., 2010; CHEN et al., 2011).

Sendo assim, em nosso modelo de infecção experimental, a neutralização da IL-2 foi seguida por uma acentuada diminuição das células T CD4⁺CD25⁺ no 21º dia de infecção e uma pequena, mas não significativa, diminuição já no 4º dia após a infecção. Ao utilizarmos o marcador Foxp3, para as células Treg, observamos redução significativa da expressão de Foxp3 pelas células T CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ no 21º dia de infecção. Portanto, nossos dados demonstram que o modelo de neutralização de IL-2 durante a infecção por *T. cruzi* resulta na diminuição de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ na periferia. Adicionalmente, verificamos que ocorre diminuição de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e a expressão de Foxp3 também no infiltrado inflamatório do tecido muscular esquelético dos animais depletados de IL-2. Vale ressaltar que o número relativo de células expressando Foxp3 nos tecidos musculares (cardíaco e estriado) de camundongos infectados e não tratados foi menor que 1% da população total de células CD4⁺. A diminuição na geração de células Foxp3⁺ devido à privação de IL-2 leva a atenuação de sua atividade reguladora. Assim, quais seriam as consequências da redução no número de linfócitos T reguladores na periferia do animal infectado com *T. cruzi*?

Segundo nosso modelo teórico, apresentado acima e baseado em dados de outros modelos experimentais, poderíamos hipotetizar que as células T reguladoras presentes na linhagem de camundongos susceptíveis, ampliadas durante a infecção, poderiam diminuir a geração de células T de memória, atrasando a resposta imune adaptativa, aumentando a carga antigênica, levando o hospedeiro a uma condição patológica incompatível com a sobrevivência. Por outro lado, sua ausência ou diminuição levaria a uma aceleração da resposta imune adaptativa, resultando em controle da carga antigênica e menor patologia, podendo levar à persistência da infecção e sobrevivência do hospedeiro (BOYMAN et al., 2012).

Os dados deste estudo apresentaram evidências de que os animais C57Bl/6 tratados com anti-IL-2 e infectados, desenvolveram resposta imune celular mais efetiva contra o parasito, em microambiente com reduzido número de células Treg, pois

apresentaram menor parasitemia e maior sobrevida. Por exemplo, foram detectadas diferenças significativas no pico parasitêmico (28º dia de infecção), onde o grupo de animais tratado com anticorpo anti-IL-2 apresentou melhor controle do número de parasitos. Os animais tratados com anti-IL-2 também apresentaram sobrevida prolongada em relação ao grupo não tratado e infectado. Adicionalmente, houve um aumento da celularidade total do baço nos animais tratados com anti-IL-2 e infectados, sugerindo uma situação semelhante àquela encontrada previamente, quando comparamos animais C57BL/6 e BALB/c.

Diversos estudos têm demonstrado a função imunorregulatória das Tregs, nos modelos de infecção, sobre os linfócitos T CD4+ efetores (BELKAID et al., 2002; SAKAGUCHI et al., 2004). Outros grupos demonstraram o mesmo efeito sobre a proliferação e produção de citocinas de células T CD8+ (DIECKMANN et al., 2005; PICCIRILLO et al., 2001). Em nosso modelo experimental observamos um aumento das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e também um aumento das populações de linfócitos com marcador de ativação recente CD69+ em animais com diminuição de Treg. Esse aumento quantitativo de linfócitos T CD4+ e CD8+ esplênicos resulta em um aumento na celularidade total do baço e, está associado ao controle da parasitemia e aumento da sobrevida dos animais. De maior significado foi o aumento encontrado no número de linfócitos CD4+ ou CD8+ expressando marcadores de memória central e efetora. Novamente, neste caso, a situação encontrada para os animais susceptíveis, quando tratados com anti-IL-2 foi similar à situação encontrada nos animais resistentes da linhagem BALB/c. Deste modo fica claro que a IL-2 tem um papel fundamental na homeostasia de linfócitos T nos animais normais e infectados. No caso descrito aqui, a diminuição de células Treg pelo bloqueio da IL-2 afetou a ativação tanto de células T CD4+ como de células CD8+. Nesse sentido, foi demonstrado *in vitro* que as células Treg suprimem a ativação de células T CD8+ (PICCIRILLO et al., 2001). Mais tarde, mostrou-se que as células Treg estariam regulando as células T CD8+ e até mesmo as células T CD4+ convencionais através da competição pela citocina IL-2, mostrando que, diferentemente de estudos iniciais, as células T CD8+ sofrem influencia da IL-2. As células Treg apresentam alta expressão de CD25 (receptor de IL-2) que por sua vez consomem a IL-2 do microambiente, secretado principalmente por células T CD4+ e

secundariamente por CD8⁺ e células dendríticas (PANDIYAN et al., 2007; MCNALLY et al., 2011). Dados experimentais têm demonstrado que as células T CD8⁺ realizam expansão e diferenciação em células citotóxicas efetoras em microambiente com altos níveis de IL-2, interferon tipo I e IFN- γ , mas neste caso, não desenvolvimento de memória imunológica. Em contrapartida, um microambiente com baixos níveis de IL-2 durante a resposta imune primária pode favorecer a diferenciação em células de memória (HARTY et al., 2008; PIPKIN et al., 2010). Assim, através de experimentos *in vitro*, verifica-se que as células Treg podem regular a proliferação celular da resposta primária dos linfócitos T CD8⁺. Para verificar se há algum outro mecanismo de regulação exercida pelas células Treg, além da competição por IL-2, foi realizado o bloqueio do receptor CD25 e as células Tregs foram adicionadas em culturas *in vitro*. Este bloqueio resultou na restauração da proliferação dos linfócitos T CD8⁺ mediante estímulo. Assim, TAOUFIK e colaboradores (2012), mostraram que as células Treg exercem imunorregulação inibitória sobre a resposta imune primária de células T CD8⁺, através da competição por IL-2. Este mesmo autor sugere que as células Treg são importantes na geração de células T CD8⁺ de memória, também pela competição por IL-2, uma vez que altos níveis de IL-2 não favorecem a diferenciação em células T CD8⁺ de memória.

Em nosso estudo, quando avaliamos as populações de linfócitos T de memória central ou efetora, verificamos um aumento numérico, estatisticamente significativo, das subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD44^{alto}CD62L^{baixo} e CD8⁺CD44^{alto}CD62L^{baixo} nos animais com diminuição de Treg, comparado ao animal infectado e não tratado com anti-IL-2. Desta maneira, nossos resultados corroboram os estudos de TAOUFIK e colaboradores (2012) e sugerem ainda que as células Treg estariam regulando a resposta imune primária, devido ao aumento da população de células T CD69⁺, e a geração de memória central e efetora das populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no modelo de infecção por *T. cruzi*. Outros exemplos deste tipo de controle podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, MITTRÜCKER (2002) demonstrou *in vivo*, durante a infecção por *Listeria monocytogenes* que as células Treg estariam controlando a resposta de linfócitos T CD8⁺ de memória durante a resposta secundária. Por outro lado, BANDEIRA (2001) demonstrou que uma subpopulação de linfócitos T

CD4+CD25+, estaria regulando eficientemente o tamanho do compartimento de células T CD4+ efetoras/memória através do mecanismo envolvendo a produção de IL-10.

A diminuição da população de células Treg também se reflete na produção de citocinas pelas células T. Houve aumento significativo de linfócitos T CD4+ efetores, produzindo IFN- γ no baço de animais tratados com anti-IL-2, e de maneira interessante, uma diminuição na porcentagem destas células no tecido cardíaco. Uma possível explicação para este fato poderia estar relacionada à expressão de moléculas coestimulatórias em subgrupos de células linfóides. Por exemplo, a molécula coestimulatória OX40 e seu ligante (OX40L) são expressos somente após ativação (DELESPESE et al., 1997; CROFT et al., 1998), participando diretamente da diferenciação de células T CD4+ produtoras de IFN- γ , na ausência de CD28 e CD40. Em 2007, PARKER, demonstrou que a ligação via OX40-OX40L na ausência de sinais via IL-2R (CD25) resulta em diminuição de células T CD4+ efetoras e produtoras de IFN- γ . Em nosso modelo, provavelmente, a diminuição dos níveis de IL-2 para a sinalização via receptor de IL-2 (como o CD25), resultou em deficiência na geração de células T CD4+ produtoras de IFN- γ no sítio inflamatório do tecido cardíaco.

Quanto aos linfócitos T CD8+, pudemos demonstrar um aumento significativo de maneira quantitativa e qualitativa nos animais depletados de IL-2. Esta população aumentou no baço e tecido cardíaco dos animais tratados. Adicionalmente, houve uma maior frequência destas células produzindo IL-10, TNF- α e IFN- γ no baço e de IFN- γ e IL-10 no tecido cardíaco. O aumento de linfócitos T CD8+ no tecido cardíaco poderia ser explicado pelo fato de que a migração de linfócitos T CD8+ para o tecido cardíaco envolve CCR1 e CCR5. No nosso caso, o aumento de células T esplênicas produtoras de TNF- α estariam diretamente relacionadas com o aumento de células T CD8+ CCR5+ circulantes e nos tecidos inflamados, pois animais tratados com anti-TNF- α e infectados com *T. cruzi* apresentaram diminuição na ativação e na expressão de CCR5 em linfócitos T CD8+ circulantes e na miocardite (LANNES-VIEIRA et al., 2008). Esse aumento dos linfócitos T CD8+ produtores de TNF- α e IFN- γ , no baço, e IFN- γ no músculo cardíaco, resultou em maior resistência à infecção ao *T. cruzi*, pois os animais apresentaram maior sobrevivência, quando comparados aos não tratados com anti-IL-2. Ademais, houve um aumento das populações de células T CD8+ e CD4+ produtoras de

IL-10, tanto no baço como no tecido cardíaco, corroborando, portanto, com a hipótese de que as células T estariam realizando controle imunorregulatório através da liberação de IL-10, mesmo que este contexto esteja relacionado com uma diminuição da população de células T Foxp3+. O aumento das populações de células T produtoras de citocinas, principalmente células T CD8+, pode ser evidenciado pelo aumento de células T CD8+ CD44^{alto}CD62L^{baixo} no tecido cardíaco. A quantificação do infiltrado inflamatório mononuclear no músculo esquelético de animais tratados com anti-IL-2 e outro fato relevante que corrobora com nossa hipótese, mostrando um pequeno aumento do número de células mononucleares inflamatórias que acompanha a diminuição das células Tregs, evidenciando um provável aumento na lesão tecidual inflamatória, mas ainda compatível com uma maior sobrevivência dos animais. Estes dados evidenciam fortemente, que a diminuição da população de células Treg no contexto da infecção por *T. cruzi* resultou em aumento da proliferação e ativação linfocitária no órgão linfóide e no tecido.

Alguns estudos (MOSMANN et al., 2001; SINGH et al., 2004) têm demonstrado que as células T auxiliares produzem a citocina IL-2 rapidamente, mas por pouco tempo. Células esplênicas em cultura com estímulo de TCR e anti-CD28 apresentaram grande produção de IL-2 nas primeiras 24 horas com diminuição progressiva em 48 e 72 horas. A adição de anti-IL-2 nesta cultura no sentido de neutralizar a citocina IL-2, não causou diminuição na produção de IL-2. Esses dados juntamente com outros resultados deste mesmo autor, sugerem coletivamente que a IL-2 limita a si mesma, diretamente via inibição negativa, e não através do efeito sobre as Treg. Outro fator que inibe diretamente a produção de IL-2 é a polarização em Th1 e/ou Th2 (HUNTER et al., 2007). Desse modo, no “primeiro” contato com o *T. cruzi* estaria ocorrendo produção de IL-2, já que esta citocina é uma das primeiras a ser produzida por um linfócito quando ativada (TCR + moléculas coestimulatórias). De fato, há um pico de produção de IL-2 no quarto dia de infecção com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* em camundongos C57BL/6 (dados não mostrados). Essa produção deve ser suficiente para a expansão das células Treg, pois, além do aumento dos níveis de IL-2 que causa a inibição de sua própria produção, ocorre aumento de citocinas do padrão Th1 e/ou Th2 resultante de uma resposta imune inata/primária frente ao *T. cruzi*. Em nosso modelo experimental a

depleção de IL-2 (anti-IL-2) e infecção por *T. cruzi* resultou numa diminuição significativa de linfócitos T CD4+CD25+Foxp3+ devida à neutralização da IL-2 e hipoteticamente pela polarização da resposta. Interessantemente, foi demonstrado recentemente que as citocinas específicas (IFN- γ e IL-12 para Th1; IL-4 para Th2) e mais especificamente os fatores de transcrição (T-bet para Th1; GATA-3 para Th2), podem inibir a diferenciação em linfócitos T reguladores induzidos (QIN et al., 2007). Portanto, sugerimos que em um contexto de resposta imune pró-inflamatória e com neutralização parcial da citocina IL-2, a quantidade de IL-2 disponível no microambiente é pequena, porém não ausente. Esta inferência é corroborada pelo fato de haver diminuição significativa da população de células Treg no 21º dia de infecção, porém não a sua completa depleção. Isto possivelmente deve-se ao esquema de tratamento com anti-IL-2 que foi realizado em dias alternados até o 15º dia de infecção. Desta forma, no nosso modelo experimental não houve depleção completa da citocina IL-2, apenas a diminuição de sua disponibilidade no microambiente, sugerindo, portanto, que o efeito autócrino da IL-2 possa ocorrer, pois as células produtoras de IL-2 são as células T CD4+ “naive” em ativação, células T CD8+ em ativação e células dendríticas maduras. Por outro lado, o efeito parácrino é deficiente, afetando a população de células Treg que não produz IL-2, e necessita da IL-2 produzida por outras células citadas anteriormente.

Portanto, a partir de nossos resultados podemos concluir que as células Treg possivelmente estariam participando nos mecanismos de resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Pois os animais susceptíveis à infecção (C57Bl/6) apresentaram diminuição mais pronunciada de células T CD4+CD25+Foxp3+ no 20º dia de infecção, quando comparado ao animal resistente (BALB/c). Esta diferença parece refletir no tamanho da população de células T CD8+ de memória, que é maior no BALB/c, uma vez que a geração desta subpopulação se dá em microambiente com baixos níveis de IL-2, ou seja, a maior quantidade de Treg no BALB/c favoreceria o consumo da IL-2. Para investigarmos, especificamente, o papel das células Tregs, realizamos a neutralização da citocina IL-2 em nosso modelo experimental de infecção, e esta resultou em diminuição significativa de células T CD4+CD25+Foxp3+. Verificamos, portanto, que a IL-2 é uma citocina importante na geração e manutenção de linfócitos T regulatórios durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Esta diminuição de linfócitos T

regulatórios resultou no aumento da população periférica de linfócitos T CD4+ e CD8+ com fenótipo de ativação celular, memória efetora e central. Além do aumento numérico, detectamos também, aumento na atividade efetora, através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias das células T CD4+ e CD8+ efectoras no baço e tecido cardíaco. Este contexto de menor susceptibilidade a infecção observado nos animais C57Bl/6 tratados com anti-IL-2, se assemelha ao contexto de resistência à infecção dos animais BALB/c. Uma vez que houve aumento de ambas as subpopulações linfocitárias, a produção de IFN- γ e IL-10 pelas mesmas, no órgão linfóide e no tecido e, finalmente, maior sobrevida do animal. Sugerindo por sua vez que as células Treg estariam participando ativamente na regulação da resposta imune celular durante a fase aguda de infecção ao *T. cruzi*.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram, de acordo com o objetivo geral e específico que:

- Os animais C57Bl/6 apresentaram maior susceptibilidade à infecção pela cepa Tulahuen de *T. cruzi*, comparado ao animal BALB/c, evidenciado pela maior parasitemia e mortalidade.
- A resistência à infecção apresentada pelos animais BALB/c comparado ao C57Bl/6 foi associada a uma maior expansão/geração de linfócitos T CD4+ e CD8+ com fenótipo de ativação recente (CD69), memória efetora (CD44^{alto}CD62L^{baixo}) e memória central (CD44^{alto}CD62L^{baixo}) na fase aguda da infecção.
- O perfil de susceptibilidade dos animais C57Bl/6 foi associado a uma grande produção de IFN- γ e baixa de IL-10 por células T CD4+. Enquanto que o perfil de resistência do BALB/c foi correlacionado a uma grande produção de IFN- γ e IL-10 por células T CD8+ e alta produção de IL-10 por células T CD4+ no baço.
- A neutralização da citocina IL-2 durante a infecção por *T. cruzi* (cepa Tulahuen) resultou na diminuição significativa da população de células T CD4+CD25+Foxp3+ na periferia de animais C57Bl/6, durante a fase aguda da infecção.
- A diminuição da população de células Treg na periferia de animais C57Bl/6 infectados resultou na maior expansão de células T CD4+ e CD8+, inclusive com perfil de ativação recente (marcador CD69).
- Os animais tratados com anti-IL-2 apresentaram aumento significativo nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ com fenótipo de memória efetora e central, corroborando com a menor parasitemia e mortalidade, comparado ao somente infectado. Evidenciando possível participação das células Treg na geração e manutenção de tais subpopulações através da liberação ou competição por citocinas.

- Além de alterações quantitativas, as células Treg, possivelmente, estariam modulando as funções efetoras de subpopulações de linfócitos T. Ademais, animais tratados com anti-IL-2 apresentaram significativo aumento na produção de citocinas Th1 por ambas as populações linfocitárias, mas principalmente por células T CD8+, no baço e tecido cardíaco.

Deste modo, em nosso estudo é possível sugerir que as células T CD4+CD25+Foxp3+ estariam participando dos mecanismos imunorregulatórios durante a fase aguda da infecção pela cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*-IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired-immunity to infection. **Exp Parasitol.** 84:231–44, 1996.

ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B. JR.; TAINTOR, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J. Immunol.**, **144**(7):2725-9, 1990.

ANDERSON, C.F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.J.; SACKS, D. CD4(+)CD25(-) Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med.** 19;204(2):285-97, 2007.

ANNACKER, O.; PIMENTA-ARAÚJO, R.; BURLIN-DEFRANOUX, O.; BARBOSA, T.C.; CUMANO, A.; BANDEIRA, A. CD25 CD4 T Cells Regulate the Expansion of Peripheral CD4 T Cells Through the Production of IL-10 **The Journal of Immunology.** 166: 3008–3018, 2001.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, **64**(6):1961-7, 1996.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun** 64: 1961–67, 1996.

ALMEIDA, A.R.; LEGRAND, N.; PAPIERNIK, M.; AND FREITAS, A.A. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. **J. Immunol.** 169:4850–4860, 2002.

ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M.; WEATHERLY, D.B.; ALBAREDA, M.C.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; OLIVERA, C.; TARLETON, R.L.; LAUCELLA, S.A. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8 T cells in chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 2: 288-297, 2008.

APPELBERG, R.; CASTRO, A.G.; PEDROSA, J.; SILVA, R.A.; ORME, I.M.; MINOPRIO, P. Role of gamma interferon and tumour necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. **Infect Immun.** 62:3962–71, 1994.

ARAÚJO, F.G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. **Infect. Immun.**, **57**(7):2246-8, 1989.

ARSTILA, T.P.; CASROUGE, A.; BARON, V.; EVEN, J.; KANELLOPOULOS, J.; KOURILSKY, P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. **Science**, **286**(5441):958-61, 1999.

AZUARA, V.; LEMBEZAT, M.P.; PEREIRA, P. The homogeneity of the TCRdelta repertoire expressed by the Thy-1dull gammadelta T cell population is due to cellular selection. **Eur. J. Immunol.**, **28**(11):3456-67, 1998.

AZUARA, V.; LEVRAUD, J.P.; LEMBEZAT, M.P.; PEREIRA, P. A novel subset of adult gamma delta thymocytes that secretes a distinct pattern of cytokines and expresses a very restricted T cell receptor repertoire. **Eur. J. Immunol.**, **27**(2):544-53, 1997.

BALLAS, Z.K.; TURNER, J.M.; TURNER, D.A.; GOETZMAN, E.A.; KEMP, J.D. A patient with simultaneous absence of "classical" natural killer cells (CD3-, CD16+, and NKH1+) and expansion of CD3+, CD4-, CD8-, NKH1+ subset. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **85**(2):453-9, 1990.

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

BELKAID, Y.; ROUSE, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.** 6, 353-360, 2005,

BENDELAC A, RIVERA MN, PARK SH, ROARK JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. **Annu. Rev. Immunol.** **15**:535-62, 1997.

BERKE, G. The CTL's kiss of death. **Cell**, **81**(1):9-12, 1995.

BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol. Today.** **15**(1):22-8, 1999.

BOYMAN, O.; CHO, J. H.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 in memory CD8 cell differentiation. **Adv. Exp. Med. Biol.** 28-41, 2010.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nat Rev Immunol.** 17;12(3):180-90, 2012.

BOYMAN, O.; KOVAR, M.; RUBINSTEIN, M.P.; SURH, C.D.; SPRENT, J. Selective Stimulation of T Cell Subsets with Antibody-Cytokine Immune Complexes. **Science**. 1924-1927, 2006.

BRADLEY, L.M.; DUNCAN, D.D.; TONKONOGY, S.; SWAIN, S.L. Characterization of antigen-specific CD4+ effector T cells *in vivo*. immunization results in a transient population of MEL-14-, CD45RB- helper cells that secretes interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, and interferon gamma. **J Exp Med.** 174 (3):547-59, 1991.

BRODSKY C, PATRICIO J, OLIVEIRA R, LOBO L, ARNHOLDT A, MENDONCA-PREVIATO L, et al. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect Immun* 2002; 70: 3736-3743.

BRUNKOW, M.E.; JEFFERY, E.W.; HJERRILD, K.A.; PAEPER, B.; CLARK, L.B.; RAMSDELL, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat. Genet.** 27, 68–73, 2001.

BRYAN, M.A.; GUYACH, S.E.; NORRIS. Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice. **PLoS Negl Trop Dis.** 4, 7, 733-739, 2010.

BYSTRY, R.S.; ALUVIHARE, V.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **Nat Immunol.** 2(12):1126-32, 2001,

CARDELL, S.; TANGRI, S.; CHAN, S.; KRONENBERG, M.; BENOIST, C.; MATHIS, D. CD1-restricted CD4₊ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. **J. Exp. Med.** 182:993–1004, 1995.

CARDILLO, F., J.C. VOLTARELLI, S.G. REED, AND J.S. SILVA. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.** 64(1):128-34, 1996.

CARDILLO, F.; FALCÃO, R.P.; ROSSI, M.A.; MENGEL, J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol.** 23(10):2597-605, 1993.

CARDILLO, F., F.Q. CUNHA, W.M. TAMASHIRO, M. RUSSO, S.B. GARCIA, AND J. MENGEL. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.** 55(1):96-104, 2002.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L.S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology.** 122(4):584-95, 2007.

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. The role of the thymus in modulating gammadelta T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Int Immunol.** 10(2):107-16, 1998.

CARDILLO, F.; NOMIZO, A.; POSTÓL, E.; MENGEL, J. NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during *Trypanosoma cruzi* infection. **Med Sci Monit.** 10(8):BR259-67, 2004.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.; COUTINHO, A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. **Infect Immun.** 75: 1545-1555, 2007.

CASROUGE, A.; BEAUDOING, E.; DALLE, S.; PANNETIER, C.; KANELLOPOULOS, J.; KOURILSKY, P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. **J. Immunol.**, **164**(11):5782-7, 2000.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **Eur J Immunol.** 30, 6:1538-43. Jun., 2000.

CESTARI, I.; EVANS-OSES, I.; SCHLAPBACH, L.J.; RAMIREZ, M.I. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology.** 53, 328– 334, 2013.

CESTARI, I.; KRARUP, A.; SIM, R.B.; INAL, J.M.; RAMIREZ, M.I. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Immunology.** 47, 2, 426–437, 2009.

CHAMBERS, C.A.; KUHNS, M.S.; EGEN, J.G.; ALLISON, J.P. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. **Annu Rev Immunol.** 19:565-94, 2001.

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

CHEERS, C.; HAIGH, A.M.; KELSO, A.; METCALF, D.; STANLEY, E.R.; YOUNG, A.M. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte macrophage, and multi-CSFs. **Infect Immun.** 56:247–51, 1988.

CHEN, H.; PAUL, W.E. A population of CD62L^{low} Nk1.1 CD4 T cells that resembles NK1.1⁺ CD4⁺ T cells. **Eur. J. Immunol.** 28:3172–3182, 1998.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25⁻ naive T cells to CD4+CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.** 198:1875–1886, 2003.

CHEN, Q.; KIM, Y. C.; LAURENCE, A.; PUNKOSDY, G. A.; SHEVACH, E. M. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-β-induced Foxp3 T cells *in vivo*. **J. Immunol.** 186, 6329–6337, 2011.

CHOI, B. S.; MARTINEZ-FALERO, I.C.; CORSET, C.; MUNDER, M.; MODOLELL, M.; KROPF, P. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. **J. Leukoc. Biol.** 85: 268–277, 2009.

CORTNY, A.; MURRAY, S.E.; WEINBERG, A.D.; PARKER, D.C. OX40-Mediated Differentiation to Effector Function Requires IL-2 Receptor Signaling but Not CD28, CD40, IL-12R₂, or T-bet1 **The Journal of Immunology**. 178: 7694–7702, 2007.

CUERVO, H.; GUERRERO, N.A.; CARBAJOSA, S.; FRESNO, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**. 187:2656-2665, 2011.

CUMMINGS, K.L and TARLETON, R.L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, **72**(7):4081-9, 2004.

DARRASSE-JEZE, G.; DEROUBAIX, S.; MOUQUET, H.; VICTORA, G.D.; EISENREICH, T.; et al. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells *in vivo*. **J. Exp. Med**. 206:1853–62, 2009.

D'CRUZ, L.M.; KLEIN, L. Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. **Nat. Immunol**. 6:1152–1159, 2005.

DE GOËR DE HERVE, M.G.; JAAFOURA, S.; VALLEE, M.; TAOUFIK, Y. FoxP3⁺ regulatory CD4⁺ T cells control the generation of functional CD8⁺ memory. **Nat Commun**. 3:986, 2012.

DE LAROSA, M.; RUTZ, S.; DORNINGER, H.; SCHEFFOLD, A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. **Eur.J. Immunol**. 34, 2480–2488, 2004.

DELLABONA, P.; PADOVAN, E.; CASORATI, G.; BROCKHAUS, M.; LANZAVECCHIA, A. An invariant V_α24-J_αQ/V β11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4⁺ T cells. **J Exp Med**. 1;180(3):1171-6, 1994.

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; DOTTERWEICH, S.; SCHULER, G. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells suppress antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells but induce a suppressive phenotype only in CD4⁺ T cells. **Immunology**. 115:305–314, 2005.

DIELI, F.; TANIGUCHI, M.; KRONENBERG, M.; IONA, E.; OREFICI, G.; SALERNO, A. An anti-inflammatory role for V₁₄ NK T cells in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-infected mice. **J. Immunol**. 171:1961–1968, 2003.

D'IMPERIO LIMA, M.R.; 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±356, 1986

DOS SANTOS RR, ROSSI MA, LAUS JL, SILVA JS, SAVINO W, MENGEL J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **175**(1):29-39, 1992.

D'SOUZA, W.N.; LEFRANÇOIS, L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. **J Immunol.** 171(11):5727-35, 2003.

DUTHIE MS, KAHN M, WHITE M, KAPUR RP, KAHN SJ. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** **73**(1):181-92, 2005.

DUTHIE, M. S.; WLEKLINSKI-LEE, M.; SMITH, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; KAHN, S. J. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. **Infect. Immun.** 70:36, 2002.

DUTHIE, M.S.; KAHN, S.J. NK cell activation and protection occur independently of natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection **International Immunology.** 17, 5, 607–613, 2009.

DUTHIE, M.S.; KAHN, M.; WHITE, M.; KAHN, S.J. Both CD1d Antigen Presentation and Interleukin-12 Are Required To Activate Natural Killer T Cells during *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection And Immunity,** 1890–1894, 2005.

EBERL, G.; LEES, R.; SMILEY, S.T.; TANIGUCHI, M.; GRUSBY, M.J.; MACDONALD, H.R. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. **J Immunol.** 1;162(11):6410-9, 1999.

ELKINS, K.L.; BOSIO, C.M.; RHINEHART-JONES, T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. **Infect. Immun.,** **67**(11):6002-7, 1999.

EMOTO, M.; MIYAMOTO, M.; EMOTO, Y.; YOSHIZAWA, I.; KAUFMANN, H. Highly biased type 1 immune responses in mice deficient in LFA-1 in *Listeria monocytogenes* infection are caused by elevated IL-12 production by granulocytes. **J. Immunol.** 171:3970–3976, 2003.

FAGARASAN, S.; HONJO, T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. **Science.** 290: 89–92, 2000.

FANTINI, M.C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; GALLE, P.R.; NEURATH, M.F. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J. Immunol.** 172:5149–5153, 2004.

FAUNCE, D. E.; STEIN-STREILEIN, J. NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8⁺ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. **J. Immunol.** 169:31–38, 2002.

FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; FERREIRA, A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. **Molecular Immunology.** 40, 17, 1279–1291, 2004.

FLEMING, T. J.; FLEMING, M. L.; MALEK, T. R., Selective expression of Ly- 6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. **J. Immunol.** 151: 2399–2408, 1993.

FLESCH, I.E. and KAUFMANN, S.H. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. **Infect. Immun.,** 59(9):3213-8, 1991.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 4, 330–336, 2003.

FONTENOT, J.D.; RASMUSSEN, J.P.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nat. Immunol.** 6:1142–1151, 2005.

FURTADO, G.C.; CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; KUTCHUKHIDZE, N.; LAFAILLE, J.J. Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function. **J. Exp. Med.** 196:851–857, 2002.

GAMBINERI, E.; TORGERSON, T.R.; OCHS, H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Curr Opin Rheumatol.** 15(4):430-5, 2003,

GARZON E, BORGES MC, CORDEIRO-DA-SILVA A, NACIFE V, MEIRELLES MN, GUILVARD E, et al. *Trypanosoma cruzi* carrying targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. **Immunol Lett.** 89: 67-80, 2003.

GATELY, M.K.; WARRIER, R.R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D.M.; FAHERTY, D.A.; CONNAUGHTON, S.E.; ANDERSON, T.D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD, B.R.; MURPHY, M. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma *in vivo*. **Int. Immunol.,** 6(1):157-67, 1994.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.,** 148(6):1792-6, 1992a

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.** **22**(10):2501-6, 1992b

GAZZINELLI, R.T.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **149**(1):175-80, 1992c.

GODFREY, D.I.; HAMMOND, K.J.; POULTON, L.D.; SMYTH, M.J.; BAXTER, A.G. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunol. Today**, **21**(11):573-83, 2000.

GRAMAGLIA, I.; WEINBERG, A.D.; LEMON, M.; CROFT, M. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. **J. Immunol.** **161**: 6510–6517, 1998.

GRAS, M.P.; LAABI, Y.; LINARES-CRUZ, G.; RIGAUT, J.P.; BROUET, J.C.; et al. BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. **Int Immunol.** **7**:1093–106, 1995.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J. Immunol.**, **145**(12):4290-7, 1990.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; RONCAROLO, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific responses and prevents colitis. **Nature** . **389**:737–742, 1997.

GROSS, J.A.; JOHNSTON, J.; MUDRI, S.; ENSELMAN, R.; DILLON, S.R.; et al. TAC1 and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**. **404**: 995–999, 2000.

GUMLEY, T. P.; MCKENZIE, I. F.; SANDRIN, M. S., Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. **Immunol. Cell Biol.** **73**: 277–296, 1995.

GUMPERZ, J. E.; MIYAKE, S.; YAMAMURA, T.; BRENNER, M.B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **J. Exp. Med.** **195**:625–636, 2002.

HANSEN, D.S.; et al. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. **Eur J Immunol** **33**:2588–2598, 2003.

HARDING, F.A.; MCARTHUR, J.G.; GROSS, J.A.; RAULET, D.H.; ALLISON, J.P. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. **Nature**, **356**(6370):607-9, 1992.

HARTY, J. T.; BADOVINAC, V. P. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. **Nat. Rev. Immunol.** 8, 107–119, 2008.

HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; HUJER, A.M. Underproduction of interleukin- 12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. **Cell Immunol.** 184:129–42, 1998.

HESSE M, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol.** 172:3157–3166, 2004.

HISAEDA, H.; et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nat Med.** 10:29–30, 2004.

HOERAUF, A.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Co-transfer of B cells converts resistance into susceptibility in T cell-reconstituted, *Leishmania major*-resistant C.B-17 scid mice by a non-cognate mechanism. **Int. Immunol.**, 8(10):1569-75, 1996.

HOFF R., Killing *in vitro* of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge *in vivo*. **J. Exp. Med.** 1;142(2):299-311, 1975.

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

HSIEH, C. S.; LIANG, Y.; TYZNIK, A.J.; RUDENSKY, A.Y. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. **Immunity.** 21: 267–277, 2004.

HUNTER, C.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.**, 64(7):2381-6, 1996.

HUNTER, C.A. ; ELLIS NEYES, L.A. ; SLIFER, T. ; et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 158:3311–6, 1997.

IKARASHI, Y.; MIKAMI, R.; BENDELAC, A.; TERME, M.; CHAPUT, N.; TERADA, M.; ZITVOGEL, L. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition. Critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon production. **J. Exp. Med.** 194:1179–1186, 2001.

JENKINS, M.K. and SCHWARTZ, R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. **J. Exp. Med.**, 165(2):302-19, 1987.

JI, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol .** 174:7147–7153, 2004.

JOINER, K.; HIENY, S.; KIRCHHOFF, L.V.; SHER, A. gp72, the 72 kilodalton glycoprotein, is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J Exp Med.** 161: 1196–1212, 1985.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol.** 30:531-64, 2012.

KAGI, D. and HENGARTNER, H. Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. **Curr. Opin. Immunol.,** 8(4):472-7, 1996.

KALLED, S. L.; AMBROSE, C.; HSU, Y. M. BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders. **Expert Opin. Ther.Targets.** 7: 115–123, 2003.

KANNEGANTI, T.D.; LAMKANFI, M.; NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity.** 27: 549-559, 2007.

KAWAKAMI, K., Y. KINJO, K. UEZU, S. YARA, K. MIYAGI, Y. KOGUCHI, T. NAKAYAMA, M. TANIGUCHI, AND A. SAITO. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V₁₄ NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. **J. Immunol.** 167:6525– 6532, 2001.

KAWAKAMI, K., N. YAMAMOTO, Y. KINJO, K. MIYAGI, C. NAKASONE, K. UEZU, T. KINJO, T. NAKAYAMA, M. TANIGUCHI, AND A. SAITO. Critical role of V₁₄ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Eur. J. Immunol.** 33:3322–3330, 2003.

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

KIRCHNER, H.; MUCHMORE, A.V.; CHUSED, T.M.; HOLDEN, H.T.; HERBERMAN, R.B. Inhibition of proliferation of lymphoma cells and T lymphocytes by suppressor cells from spleens of tumor-bearing mice. **J Immunol.** 114(1 Pt 1):206-10, 1975.

KIERSZENBAUM F, PIENKOWSKI MM. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** 24(1):117-20, 1979.

KOBRYNSKI, L.J.; SOUSA, A.O.; NAHMIAS, A.J.; LEE, F.K. Cutting edge: Antibody production to pneumococcal polysaccharides requires CD1 molecules and CD8_T cells. **J Immunol** 174:1787–1790, 2005.

KOEBERLE, J. Control in the pharmaceutical industry. **Farmaco. (Prat)** 23 (3):103-29, 1968.

KOO GC, PEPPARD JR, MARK WH. Natural killer cells generated from bone marrow culture. **J. Immunol.** 132(5):2300-4, 1984.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory_T_cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun.** 75(2):861-9, 2007.

KRAKAUER, R.S.; STROBER, W.; WALDMANN, T.A. Hypogammaglobulinemia in experimental myeloma: the role of suppressor factors from mononuclear phagocytes. **J Immunol.** 118(4):1385-90, 1977.

KROLL-PALHARES, K.; SILVÉRIO, J.C.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES-VIEIRA, J. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 103(4): 375-385, 2008.

KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nat Rev Immunol.** 2(8):557-68, 2002.

KUMAR, S. and TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, 20(5):207-16, 1998.

KUPFER, A.; SWAIN, S.L.; SINGER, S.J. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. **J. Exp. Med.**, 165(6):1565-80, 1987.

KURSAR, M.; BONHAGEN, K.; FENSTERLE, J.; KÖHLER, A.; HURWITZ, R.; KAMRADT, T.; KAUFMANN, S.H.; MITTRÜCKER, H.W. Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. **J Exp Med.** 16;196(12):1585-92, 2002.

KURT-JONES EA, LIANO D, HAYGLASS KA, BENACERRAF B, SY MS, ABBAS AK. The role of antigen-presenting B cells in T cell priming *in vivo*. Studies of B cell-deficient mice. **J. Immunol.** 140(11):3773-8, 1988.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Parasite Immunol.**, 9(1):21-30, 1987.

LANG, M.L.; GLATMAN-FREEDMAN, A. Do CD1-restricted T cells contribute to antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*? **Infect Immun** 74:803– 809, 2006.

LANGHORNE, J.; CROSS, C.; SEIXAS, E.; LI, C.; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 95(4):1730-4, 1998.

LANZAVECCHIA, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature**, 11-314(6011):537-9, 1985.

LEADBETTER, E.A.; BRIGL, M.; ILLARIONOV, P.; COHEN, N.; PILLAI, S.; BRENNER, M.B. NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells **PNAS**. 105, 24, 8339–8344, 2008.

LEE, H.M.; BAUTISTA, J.L.; HSIEH, C.S. Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells. **Adv Immunol**. 112:25-71, 2011.

LEE, J.C.; HAYMAN, E.; PEGRAM, H.J.; et al. *In vivo* inhibition of human CD19-targeted effector T cells by natural T regulatory cells in a xenotransplant murine model of B cell malignancy. **Cancer Research**. 71, 8, 2871–2881, 2011.

LEEF, M.; ELKINS, K.L.; BARBIC, J.; SHAHIN, R.D. Protective immunity to *Bordetella pertussis* requires both B cells and CD4(+) T cells for key functions other than specific antibody production. **J. Exp. Med.**, 191(11):1841-52, 2000.

LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D.; PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells *in vivo* and *in vitro*: IL-2 and IL-4 are required for *in vitro* generation of IL-4-producing cells. **J. Exp. Med.** 172(3):921-9, 1990.

LEITE-DE-MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M.; SAVINO W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, 77(1):95-8, 1992.

LEITE DE MORAES, M.C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; LÉBOULENGER, F.; SAVINO, W.; DARDENNE, M.; LÉPAULT, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. **Scand. J. Immunol.**, 33(3):267-75, 1991.

LEON, J.S.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. **J Immunol**. 171: 4271–4277, 2003.

LEPLETIER, A.; CARVALHO, V.F.; MORROT, A.; SAVINO, W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1262, 45–50, 2012.

LEVITSKY, H.I.; GOLUMBEEK, P.T.; PARDOLL, D.M. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. **J. Immunol.**, 146(4):1113-7, 1991.

LIMA-MARTINS, M.V.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol**. 7(4):367-76, 1985.

LOKE, P.; ALLISON, J.P. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. **Arthritis Res Ther**. 6, 5:208-14, 2004.

MACKAY, F.; WOODCOCK, S.A.; LAWTON, P.; AMBROSE, C.; BAETSCHER, M.; et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. **J Exp Med.** 190: 1697–1710, 1999.

MACKAY, C.R.; MARSTON, W.L.; DUDLER, L.; SPERTINI, O.; TEDDER, T.F.; HEIN, W.R. Tissue-specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. **Eur J Immunol.** 22:887–95, 1992.

MALEK, T.R.; YU, A.; VINCEK, V.; SCIBELLI, P.; KONG, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. **Immunity.** 17:167–178, 2002.

MALEK, T. R. The biology of interleukin-2. **Annu. Rev. Immunol.** 26, 453–479, 2008.

MALOY, K.J.; SALAUN, L.; CAHILL, R.; POWRIE, F. CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. **Journal of Experimental Medicine.** 197, 1, 111–119, 2003.

MARIANO, F.S.; GUTIERREZ, F.R.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.** 10(7):825-33, 2008.

MARIE, J.C.; LETTERIO, J.J.; GAVIN, M.; RUDENSKY, A.Y. TGFbeta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **J. Exp. Med.** 201:1061–1067, 2005.

MARTIN, D.L.; TARLETON, R. CD8⁺ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog.** 2: 77-80, 2006.

MARTIN DL, TARLETON RL. Antigen-Specific T Cells Maintain an Effector Memory Phenotype during Persistent *Trypanosoma cruzi* Infection. **J. Immunol.** 1;174(3):1594-601, 2005.

MASTROENI, P.; SIMMONS, C.; FOWLER, R.; HORMAECHE, C.E.; DOUGAN G. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and show impaired Th1 T-cell responses to Salmonella antigens. **Infect. Immun.,** 68(1):46-53, 2000.

MCCABE, R.E.; REMINGTON, J.S.; ARAUJO, F.G. *In vivo* and *in vitro* effects of cyclosporin A on *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** 34(5):861-5, 1985.

MCCORMACK, J. M.; LEENEN, P. J.; WALKER, W. S., Macrophage progenitors from mouse bone marrow and spleen differ in their expression of the Ly-6C differentiation antigen. **J. Immunol.** 151: 6389–6398, 1993.

MCKAY, F.; SCHNEIDER, P.; RENNERT, P.; BROWNING, J. BAFF and APRIL: a Tutorial on B cell survival. **Annu. Rev. Immunol.** 21:231–264, 2003.

- MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol.** 173:1224–1231, 2004.
- MCLENNAN, I.C.M. ; et al. The changing preference of T and B cells for partners Tdependent antibody responses develop. **Immunol Rev.** 156:53–66, 1997.
- MCNALLY, A.; HILL, G. R.; SPARWASSER, T.; THOMAS, R.; STEPTOE, R. J. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** . 108, 7529–7534, 2011.
- MELCHERS, F. Actions of BAFF in B cell maturation and its effects on the development of autoimmune disease. **Ann Rheum Dis.** 62, Suppl 2, 2003.
- MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*-milk transmission of infection and immunity from mother to young. **Parasitology.** 65(1):1-9, 1972.
- MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology.** 4, 10, 762–774, 2004.
- MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol.** 64: 475-482, 1978.
- MINIGO, G.; WOODBERRY, T.; PIERA, T.K.; et al. Parasite dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. **PLoS Pathogens.** 5, 4, 2009.
- MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends in Molecular Medicine.** 13, 3, 108–116, 2007.
- MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; TAKEDATSU, H.; BLUMBERG, R.S.; BHAN, A.K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity,** 16(2):219-30, 2002.
- MOND, J. J.; VOS, Q.; LEES, A.; SNAPPER, C. M., T cell independent antigens. **Curr. Opin. Immunol.** 7: 349–354, 1995
- MONTES, C.L.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E.V.; MUCCI, J.; ZUNIGA, E.I.; CAMPETELLA, O.; GRUPPI, A. A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. **Eur J Immunol.** 36(6):1474-85, 2006.
- MONTOYA, J.G.; HUFFMAN, H.B.; REMINGTON, J.S. Evaluation of the immunoglobulin G avidity test for diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy,” **Journal of Clinical Microbiology.** 42, 10, 4627–4631, 2004.

MOORE, P.A.; BELVEDERE, O.; LAFLEUR, D.W.; FENG, P. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Science**. 285:260–3, 1999.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R. D.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**. 19, 683–765, 2001.

MOORE, K.W.; O’GARRA, A.; MALEFYT, R.W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**. 11:165–90, 1993.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.D.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**. 19, 683–765, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.**, 136(7):2348-57, 1986.

MOTA, I. and UMEKITA, L.F. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. **Immunol. Lett.**, 21(3):223-5, 1989.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**. 317, 5835:256-60, 2007.

MUCIDA, D.; KUTCHUKHIDZE, N.; ERAZO, A.; RUSSO, M.; LAFAILLE, J.J.; CUROTTO DE LAFAILLE, M.A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J Clin Invest**. 115, 7:1923-33, Jul., 2005

NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F.S.; BURLEIGH, B.A.; TANOWITZ, H.B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**. 14, 5, 634–643, 2012.

NAKAMURA, T.; SONODA, K.H.; FAUNCE, D.E.; GUMPERZ, J.; YAMAMURA, T.; MIYAKE, S.; STEIN-STREILEIN, J. CD4₊ NKT cells, but not conventional CD4₊ T cells, are required to generate efferent CD8₊ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. **J. Immunol**. 171:1266–1271, 2003.

NARDELLI, B.; BELVEDERE, O.; ROSCHKE, V.; MOORE, P.A.; OLSEN, H.S.; MIGONE, T.S. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. **Blood**. 97:198–204, 2001.

NATHAN, D.F.; NOGUEIRA, N.; JUANCHANICH, C.; ELLIS, C.J.; COHN, Z.^a Activation of macrophage *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxide release and the killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** 149:1056, 1979.

NGO, VN, CORNALL, RJ, CYSTER, JG. Splenic T zone development is B cell dependent. **J. Exp. Med.**, 194(11):1649-60, 2001.

NOGUEIRA N, BIANCO C, COHN Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** 142(1):224-9, 1975.

NOGUEIRA N, ELLIS J, CHAPLAN S, COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** 51(3):325-34, 1981.

NOMIZO, A.; POSTOL, E.; DE ALENCAR, R.; CARDILLO, F.; MENGEL, J. Natural killer T cells are required for the development of a superantigen-driven T helper type 2 immune response in mice. **Immunology.** 116(2):233-44, 2005.

NOMIZO, A.; CARDILLO, F.; POSTÓL, E.; DE CARVALHO, L.P.; MENGEL, J. V gamma 1 gammadelta T cells regulate type-1/type-2 immune responses and participate in the resistance to infection and development of heart inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected BALB/c mice. **Microbes Infect.** 8(3):880-8, 2006.

O'BRIEN, R.L.; YIN, X.; HUBER, S.A.; IKUTA, K.; BORN, W.K. Depletion of a $\gamma\delta$ T cell subset can increase host resistance to a bacterial infection. **J Immunol.** 165:6472–9, 2000.

OCHSENBEIN, A.F.; ZINKERNAGEL, R.M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. **Immunol Today.** 21, 12:624-30, Dec., 2000.

OHSHIMA, Y.; TANAKA, Y.; TOZAWA, H.; TAKAHASHI, Y.; MALISZEWSKI, C.; DELESPESE, G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. **J. Immunol.** 159: 3838–3848, 1997.

ORTEGA, R.G.; ROBB, R.J.; SHEVACH, E.M.; MALEK, T.R. The murine IL-2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. **J. Immunol.** 133:1970, 1984.

PANDIYAN, P.; ZHENG, L.; ISHIHARA, S.; REED, J.; LENARDO, M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. **Nat. Immunol.** 8, 1353–1362, 2007.

PAPIERNIK, M.; DE MORAES, M.L.; PONTOUX, C.; VASSEUR, F.; PENIT, C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **Int. Immunol.** 10:371–378, 1998.

PEARCE, EJ, SHER, A. Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.**, 73(1):110-6, 1991.

PERANZONI, E.; ZILIO, S.; MARIGO, I.; DOLCETTI, L.; ZANOVELLO, P.; et al. Myeloid derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. **Curr Opin Immunol.** 22: 238–244, 2010.

PETRAY, PB, ROTTENBERG, ME, BERTOT, G, CORRAL, RS, DIAZ, A, ORN, A, GRINSTEIN, S. Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, **35**(1):77-80, 1993.

PICCIRILLO, C. A.; SHEVACH, E.M. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. **J. Immunol.** 167: 1137–1140, 2001.

PIPKIN, M. E. ; et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. **Immunity** 32, 79–90, 2010.

PONCINI, C.V.; SOTO, C.D.; BATALLA, E.; SOLANA, M.E.; GONZALEZ-CAPPA, S.M. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells *in vitro*. **Infect Immun.** 76: 2633-2641, 2008.

PORCELLI, SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. **Adv. Immunol.**, **59**:1-98, 1995.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., **CARDILLO**, F. Increased inflammatory responses in skeletal muscle of gene knockout B cell deficient mice during early chronic *T. cruzi* infection. **Scand. J. Immunol**, **54**(1), 2001b.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S., NOMIZO, A. AND **CARDILLO**, F. Protection against *T. cruzi* infection does not require B cells. **Scand. J. Immunol.** **54** (1), 2001a.

POSTOL, E., MENGEL, J., AROEIRA, L.S. AND **CARDILLO**, F. Cytokine production and inflammatory responses in skeletal muscles of □MT C57BL/6 mice during *T. cruzi* infection. **Inflammation Research.** **50**:149-S230, 2001c.

POSTÓL, E.; MEYER, A.; CARDILLO, F.; DE ALENCAR, R.; PESSINA, D.; NIHEI, J.; MARIANO, M.; MENGEL, J. Long-term administration of IgG2a anti-NK1.1 monoclonal antibody ameliorates lupus-like disease in NZB/W mice in spite of an early worsening induced by an IgG2a-dependent BAFF/BLyS production. **Immunology.** 125(2):184-96, 2008.

QIN, S.; COBBOLD, S.P.; POPE, H.; ELLIOTT, J.; KIOUSSIS, D.; DAVIES, J.; WALDMANN, H. "Infectious" transplantation tolerance. **Science.** 12,259(5097):974-7, 1993.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R, MENGEL, JO, POSTOL, E, SOARES, RA, FERREIRA-FERNANDEZ, E, SOARES, MB, PONTES-DE-CARVALHO, LC. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** **23**(2):93-101, 2001.

ROARK, J. H.; PARK, S.H.; JAYAWARDENA, J.; KAVITA, U.; SHANNON, M.; BENDELAC, A. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. **J. Immunol.** 160:3121–3127, 1998.

ROBERSON EL, HANSON WL. *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. **Exp. Parasitol.** 34(2):168-80, 1973.

ROFFÊ, E; ROTHFUCHS, A.G.; SANTIAGO, H.C.; MARINO, A.P.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L.R.; MURPHY, P.M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 15;188(2):649-60, 2012.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin Exp Immunol.** 128:421–428, 2002.

ROMAGNOLI, P.; DOOLEY, J.; MALISSEN, B.; VAN MEERWIJK, J.P.M. The thymic niche does not limit development of the naturally diverse population of mouse regulatory T lymphocytes. **J. Immunol.** 189:3831-3837, 2012.

ROMAGNOLI, P.; HUDRISIER, D.; VAN MEERWIJK, J.P.M. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J. Immunol.** 168: 1644–1648, 2002.

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

ROTTENBERG, ME, BAKHIET, M, OLSSON, T, KRISTENSSON, K, MAK, T, WIGZELL, H, ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.** 61(12):5129-33, 1993.

ROTTENBERG, ME, RIARTE, A, SPORRONG, L, ALTCHER, J, PETRAY, P, RUIZ, AM, WIGZELL, H, ORN, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol. Lett.**, 45(1-2):53-60, 1995.

RUDENSKY, A.Y.; CAMPBELL, D. J. *In vivo* sites and cellular mechanisms of Treg cell-mediated suppression. **J. Exp.Med.** 203, 489–492, 2006.

RUSSO, M, STAROBINAS, N, MINOPRIO, P, COUTINHO, A, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, 139(3):225-36, 1988.

SAD, S, KAGI, D, MOSMANN, TR. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. **J. Exp. Med.**, **184**(4):1543-7, 1996.

SADLACK, B.; LOHLER, J.; SCHORLE, H.; KLEBB, G.; HABER, H. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. **Eur. J. Immunol.** 25:3053–59, 1995.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunological Reviews.** 182, 18–32, 2001.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.** 22:531–562, 2004.

SAKAGUCHI, S.; TODA, M.; ASANO, M.; ITOH, M.; SAKAGUCHI, N. T cell mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. **J Autoimmun.** 9(2):211-20, 1996.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI. Regulatory T cells :how do they suppress immuneresponses? **Int. Immunol.** 21, 1105–1111, 2009.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.** 155, 3:1151-64, 1995.

SALES, P.A. JR.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R.V.; VIEIRA, V.; ARANTES, R.M.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R.T. The regulatory_CD4+CD25+_T_cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.** 10(6):680-8, 2008.

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.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature.** 401:708–12, 1999.

SAOUDI , A.; SEDDON, B.; HEATH, V.; FOWELL, D.; MASON, D. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. **Immunol Rev.** 149:195-216, 1996.

- SAVINO, W, LEITE-DE-MORAES, MC, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M, DARDENNE, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Immunol.**, **19**(9):1727-33, 1989.
- SCHALLENBERG, S.; TSAI, P. Y.; RIEWALDT, J.; KRETSCHMER, K. Identification of an immediate Foxp3-precursor to Foxp3-regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. **J. Exp. Med.** 207, 1393–1407, 2010.
- SCHIEMANN, B.; GOMMERMAN, J.L.; VORA, K.; CACHERO, T.G.; SHULGA-MORSKAYA, S.; DOBLES, M. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. **Science**. 293:2111–14, 2001.
- SCHMUNIS, G.A.; CAPPA, S.M.; TRAVERSA, O.C.; JANOVSKY, J.F. The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **65**(1):89-94, 1971.
- SCHNARE, M.; BARTON, G.M.; HOLT, A.C.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat Immunol.** 2: 947-950, 2001.
- SCHNEIDER, P.; et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. **J Exp Med.** 189:1747–1756, 1999.
- SCHOLZ, J.L.; CROWLEY, J.E.; TOMAYKO, M.M.; STEINEL, N.; O'NEILL, P.J. et al. BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 105: 15517–15522, 2008.
- SCHORLE, H.; HOLTSCHKE, T.; HUNIG, T.; SCHIMPL, A.; HORAK, I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. **Nature.** 352, 621–624, 1991.
- SCHLUNS, K.S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nat Rev Immunol.** 3:269-279, 2003.
- SCOTT, M.T. and MOYES, L. ⁷⁵Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. **Clin. Exp. Immunol.**, **48**(3):754-7, 1982.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L.; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol. Rev.**, **112**:161-82, 1989.
- SHEVACH, E.M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity** 30, 636–645, 2009.

SHIMIZU, H.; T. MATSUGUCHI, Y.; FUKUDA, I.; NAKANO, T.; HAYAKAWA, O.; TAKEUCHI, S.; AKIRA, M.; UMEMURA, T.; YOSHIKAI, Y. Toll-like receptor 2 contributes to liver injury by Salmonella infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice. **Gastroenterology** 123:1265–1277, 2002.

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PADUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res.** 31: 111–15, 1998.

SILVA, J.S.; MORRISEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Méd.** 175:169–74, 1992.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. 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(12):4862-7, 1995.

SILVA, J.S.; ALIBERTI, J.C.; MARTINS, G.A.; SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PÁDUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res.** 31(1):111-5, 1998.

SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med.** 1;174(3):539-45, 1991.

SINGH, B.; READ, S.; ASSEMAN, C.; MALMSTROM, V.; MOTTET, C.; STEPHENS, L.A.; STEPANKOVA, R.; TLASKALOVA, H.; POWRIE, F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunol. Rev.** 182, 190–200, 2001.

SOJKA, D.K.; BRUNIQUEL, D.; SCHWARTZ, R.H.; SINGH, N.J. IL-2 secretion by CD4+ T cells *in vivo* is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. **J. Immunol.** 172:6136–6143, 2004.

SONODA, K. H.; EXLEY, M.; SNAPPER, S.; BALK, S.P.; STEIN-STREILEIN, J. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. **J. Exp. Med.** 190:1215–1226, 1999.

SPINELLA, S.; LIEGARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp Parasitol** 74:46±56, 1992.

SPINELLA, S. and LIEGEARD, P. Hontebeyrie-Joskowicz M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp. Parasitol.,** 74(1):46-56, 1992.

SPRENT, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, 5(3):433-8, 1993.

SPRENT J, SURH CD. Generation and maintenance of memory T cells. **Curr. Opin. Immunol** 13(2):248-54., 2001

SPRENT J. Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells. **Microbes. Infect.** 5(3):227-31, 2003.

SRIVASTAVA, M.K.; ZHU1, L.; STRIETER, R.; DUBINETT, S.; SHARMA, S. Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer . 7, 7: 124-134, 2012.

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

STROBL, H.; KNAPP, W. TGF- β 1 regulation of dendritic cells. **Microbes and Infection.** 1, 15, 1283–1290, 1999.

STROM, T.B.; KELLEY, V.E. Toward more selective therapies to block undesired immune responses. **Kidney Int.** 35(4):1026-33, 1989.

SUN, J.C.; WILLIAMS, M.A.; BEVAN, M.J. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. **Nat Immunol.** 5(9):927-33, 2004.

SUN J, TARLETON RL. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 48(2):161-9, 1998.

SURH, C.D.; LEE, D.S.; FUNG-LEUNG, W.P.; KARLSSON, L.; SPRENT, J. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cells. **Immunity**, 7(2):209-19, 1997.

SUZUKI, H.; KUNDIG, T.M.; FURLONGER, C.; WAKEHAM, A.; TIMMS, E.; MATSUYAMA, T.; SCHMITS, R.; MAK, T.W. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. **Science** 268, 1472–1476, 1995.

SZALAY, G.; LADEL, C.H.; BLUM, C.;KRONENBERG, M.; KAUFMANN, S.H. Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF- β 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice. **J. Immunol.** 62:6955–6958, 1999

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunol.**, 145(11):3796-806, 1990.

TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N.; ITOH, M.; IWATA, M.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic /suppressive state. **Int.Immunol.** 10, 1969–1980, 1998.

TAKEHARA HA, PERINI A, DA SILVA MH, MOTA I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp. Parasitol.** 52(1):137-46, 1981.

TAKEHARA, H.A.; DA SILVA, A.M.; BRODSKY, C.I.; MOTA, I. A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. **Immunol. Lett.**, 23(2):81-5, 1989.

TALIAFERRO, W.H.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, 96(3):199-226, 1955.

TANIGUCHI, M.; NAKAYAMA, T. Recognition and function of Valpha14 NKT cells. **Semin Immunol.** 12(6):543-50, 2000.

TANIGUCHI, T.; MINAMI, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. **Cell** 73, 5–8, 1993.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 144(2):717-24, 1990.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, 356(6367):338-40, 1992.

TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.**, 62(5):1820-9, 1994.

TERABE, M.; MATSUI, S.; PARK, J.M.; CHEN, W.; LEDBETTER, S.; PAUL, W.E.; BERZOFKY, J.A. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. **J. Exp. Med.** 198:1741–1752, 2003.

THOMPSON, J.S.; SCHNEIDER, P.; KALLED, S.L.; WANG, L.; LEFEVRE, E.A.; CACHERO, T.G. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. **J Exp Med.** 192:129–35, 2000.

THORNTON, A.M.; DONOVAN, E.E.; PICCIRILLO, C.A.; SHEVACH, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the *in vitro* activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. **J. Immunol.** 172:6519–6523, 2004.

THORNTON, A.M.; SHEVACH, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.** 188, 287–296, 1998.

TODRYK, S.M.; BEJON, P.; MWANGI, T.; et al. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4+ CD25high T cells with susceptibility in Kenyans. **PLoS ONE.** 3, 4, 2008.

TOUGH D.F. Deciphering the relationship between central and effector memory CD8+ T cells. **Trends Immunol.** 24(8):404-7, 2003.

TEIXEIRA AR, SANTOS-BUCH CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. **Immunology.** 28(3):401-10, 1975.

TRISCHMANN, T.M. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. **J. Immunol.,** 130(4):1953-7, 1983.

TRISCHMANN, T.M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Parasite Immunol.,** 6(6):561-70, 1984.

UNDERHILL, D.M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. **Immunol Rev.** 219: 75-87, 2007.

VILLARINO, A.V.; TATO, C.M.; O'SHEA, J.J.; HUNTER, C.A. Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals **J Exp Med.** 204, 1, 65–71, 2001.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M., ALVAREZ, M.G.. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med** 144: 724–734, 2006.

VOGT, J.; ALBA SOTO, C.D.; MINCZ, M.P.; MIRKIN, G.A. Impaired *Trypanosoma cruzi*-specific IFN-gamma secretion by T cells bearing the BV9 T-cell receptor is associated with local IL-10 production in non-lymphoid tissues of chronically infected mice. **Microbes Infect.** 10: 781-790, 2008.

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J.-P.; COTTREZ, F.; GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity.** 18:605–617, 2003.

WALKER, L.S.; CHODOS, A.; EGGENA, M.; DOOMS, H.; ABBAS, A.K. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells *in vivo*. **J. Exp. Med.** 198:249–258, 2003.

WANG, X.; MOSMANN, T. *In vivo* priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)- γ , and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN- γ -secreting cells. **J. Exp. Med.** 194:1069–1080, 2001.

WEI, J.; DURAMAD, O.; PERNG, O.A.; QIN, F.X.F. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3⁺ regulatory T cells **PNAS**. 104, 46: 458-462, 2007.

WEISS, A.; FITCH, F.W. Macrophages suppress CTL generation in rat mixed leukocyte cultures. **J Immunol.** 119(2):510-6, 1977.

WHITMIRE, J.K.; ASANO, M.S.; KAECH, S.M.; SARKAR, S.; HANNUM, L.G.; SHLOMCHIK, M.J.; AHMED, R. Requirement of B cells for generating CD4⁺ T_{cell} memory. **J Immunol.** 15;182(4):1868-76, 2009.

WILLERFORD, D.M.; CHEN, J.; FERRY, J.A.; DAVIDSON, L.; MA, A.; ALT, F.W. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. **Immunity**. 3:521–30, 1995.

WOLF, M.; SCHIMPL, A.; HUNIG, T. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. **Eur. J. Immunol.** 31:1637–1645, 2001.

XU, S.; LAM, K.P. B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. **Mol Cell Biol.** 21:4067–74, 2001.

YANG, X. and BRUNHAM, R.C. Gene knockout B cell-deficient mice demonstrate that B cells play an important role in the initiation of T cell responses to *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis) lung infection. **J. Immunol.**, 161(3):1439-46, 1998.

YANG, Y.; UENO, A.; BAO, M.; WANG, A.; PORCELLI, S.; YOON, J.W. Control of NKT cell differentiation by tissue-specific microenvironments. **J. Immunol.** 171:5913–5920, 2003.

YAGITA, H.; GRUPPI, A.; ZUÑIGA, E.; MOTRAN, C.C.; MONTES, C.L.; Ligand-Mediated Fratricide Lymphocytes Susceptible to Fas/Fas Renders Parasite-Specific IgG + B *Trypanosoma cruzi* Infection Selectively. **J Immunol.** 168:3965-3973, 2000.

YAN, M.; MARSTERS, S.A.; GREWAL, I.S.; WANG, H.; ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. **Nat Immunol.** 1:37–41, 2000.

YOSHIDA, N.; ARAGUTH, M.F. Trypanolytic activity and antibodies to metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in non-Chagasic human sera. **Parasite Immunol.** 9: 389–393, 1987.

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

ZHENG, X.X.; SANCHEZ-FUEYO, A.; DOMENIG, C.; STROM, T.B. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. **Immunol Rev.** 196:75-84, 2003.