

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADEMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Adriene Siqueira de Melo

**Avaliação da síntese de citocinas em  
pacientes chagásicos após estímulo  
com os antígenos recombinantes CRA e  
FRA de *Trypanosoma cruzi***

RECIFE

2011

ADRIENE SIQUEIRA DE MELO

**Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

**Dissertação** apresentada ao **Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública** do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de **mestre em Ciências**.

**Orientadora:** Dra. Yara de Miranda Gomes

**Co-orientadora:** Dra. Cássia Docena

Recife

2011

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

M528a Melo, Adriene Siqueira de.

Avaliação da Síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* / Adriene Siqueira de Melo. — Recife: A. S. de Melo, 2011.

73 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientador: Yara de Miranda Gomes.

1. Doença de Chagas. 2. Citocinas. 3. Expressão Gênica. 4. Antígenos. I. Título.

CDU 616.937

---

ADRIENE SIQUEIRA DE MELO

**Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo  
com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

**Dissertação** apresentada ao **Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública** do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de **mestre em Ciências**.

Aprovada em: 24/02/2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Yara de Miranda Gomes  
Orientadora  
Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz-PE

---

Dr. Fábio Lopes de Melo  
Examinador Interno  
Departamento de Parasitologia do CPqAM/Fiocruz-PE

---

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena  
Examinador Externo  
Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz-PE

Aos meus pais, **Jairo** e **Norma**, pelo amor incondicional.

Ao meu esposo, **Túlio** e meu filho **Caio**.

Por todo o carinho, apoio e incentivo durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida.

Aos meus pais, irmã e familiares pelo amor e carinho, pela amizade e companheirismo, pela união e cumplicidade, por todos os dias de convívio em nossas vidas.

Ao meu esposo Túlio pelo amor, carinho, incentivo, paciência e companheirismo. Agradeço a Deus por tê-lo colocado em meu caminho. Que Deus continue abençoando nossa união.

Ao meu filho Caio, presente de Deus na minha vida, pois sem ele minha existência não teria sentido.

À minha orientadora, Yara Gomes, por ter acreditado em mim, pela dedicação e amizade, pelo seu profissionalismo.

À minha co-orientadora, Cássia Docena, pelos ensinamentos e sugestões que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À todos os amigos do Aggeu Magalhães, que estiveram presentes nesta caminhada, tornando meus dias de trabalho mais prazerosos e descontraídos.

À todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o bom andamento e conclusão deste trabalho.

*“Não deixe que a saudade sufoque,  
que a rotina acomode, que o medo  
impeça de tentar. Desconfie do destino  
e acredite em você. Gaste mais horas  
realizando que sonhando, fazendo que  
planejando,  
vivendo que esperando, porque  
embora quem quase morre esteja vivo,  
quem quase vive já morreu.”*

*Luis Fernando Verissimo*

MELO, Adriene Siqueira de. **Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

## RESUMO

Entre diversos aspectos relacionados à doença de Chagas, o mecanismo de evolução clínica de indivíduos portadores da forma indeterminada em direção às formas clínicas sintomáticas ainda não se encontra esclarecido. Sabe-se, que a resposta imunológica do hospedeiro que é direcionada ao parasita, exerce um papel central no desenvolvimento da patologia. Assim, nos propomos a avaliar a relação entre a produção de citocinas após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *Trypanosoma cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Foram selecionados 19 indivíduos portadores da forma cardíaca (FC), sendo 10 portadores da forma cardíaca severa (FCS) e 9 portadores da forma cardíaca leve (FCL); e 17 indivíduos portadores da forma indeterminada (FI), todos provenientes do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. As células mononucleares do sangue periférico destes indivíduos foram submetidas à cultura na presença de CRA ou FRA por 3 dias e a expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, por estas células, foi avaliada através da detecção de seu RNA mensageiro por PCR Quantitativa em Tempo Real. Apesar de não ter sido observada diferenças significativas na produção destas citocinas entre as formas clínicas estudadas, observamos que a maioria dos portadores da FI apresentou elevados níveis de expressão gênica para IFN-  $\gamma$ , enquanto que os portadores da FCL apresentaram elevados níveis de expressão gênica para IL-10. Assim, mesmo sem a diferenciação de um perfil de expressão entre as formas clínicas crônicas, a avaliação de outras citocinas em um número maior de pacientes é necessária para se estabelecer o padrão inflamatório ou anti-inflamatório nestes grupos de indivíduos estudados.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Citocinas, Expressão Gênica, Antígenos Recombinantes.



MELO, Adriene Siqueira de. **Evaluation of cytokine synthesis in chagasic patients after stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi***. 2011. Dissertation (Master in Public Health) – Research Center Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, 2011.

## ABSTRACT

Among several aspects related to Chagas disease, the mechanism through patients with the indeterminate form progress toward the symptomatic clinical forms has not been elucidated. It is known that the host immune response directed to the parasite, plays a central role in the pathology development. Thus, we propose to evaluate the relationship between the production of cytokines after in vitro stimulation with recombinant antigens CRA (Cytoplasmatic Repetitive Antigen) and FRA (Flagellar Repetitive Antigen) of *Trypanosoma cruzi* and the clinical forms of chronic Chagas disease. Were selected 19 patients with the cardiac form (FC): 10 with severe heart shape (FCS) and 9 presenting mild heart shape (FCL), and 17 individuals with the indeterminate form (FI), all of them selected in the Chagas' disease Ambulatory of Oswaldo Cruz University Hospital at University of Pernambuco. The patients' peripheral blood mononuclear cells were submitted to culture in the presence of CRA or FRA during three days. The gene expression for the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 was evaluated by its messenger RNA detection using Quantitative Real Time PCR. Although no significant differences were observed in the production of these cytokines among the clinical forms studied, we found that majority patients with the FI showed high levels of IFN- $\gamma$  gene expression, while patients with the FCL showed high levels of IL-10 gene expression. So even without a differential expression profile among the chronic clinical forms, the evaluation of another cytokines in a larger number of patients is needed to establish an inflammatory or anti-inflammatory standard in these groups of individuals.

**Keywords:** Chagas' disease, Cytokines, Gene Expression, Recombinant Antigens

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Modelo esquemático do mecanismo de imunorregulação na doença de Chagas crônica.....	23
<b>Figura 2</b>	Perfil eletroforético de RNA obtido de amostras de cultura de PBMC de indivíduos selecionados para o estudo.....	43
<b>Figura 3</b>	Amplificação dos genes alvos e do controle endógeno utilizando-se amostra de gDNA.....	44
<b>Figura 4</b>	Amplificação dos genes alvos e do controle endógeno utilizando-se amostra de cDNA.....	44
<b>Figura 5</b>	Alinhamento das sequências de <i>primers</i> e sonda para o gene de IFN- $\gamma$ .....	45
<b>Figura 6</b>	Alinhamento das sequências de <i>primers</i> e sonda para o gene de $\beta$ -actina.....	45
<b>Figura 7</b>	Alinhamento das sequências de <i>primers</i> e sonda para o gene de IL-10.....	46
<b>Figura 8</b>	Perfil eletroforético dos amplicons dos genes-alvo e do controle endógeno.....	46
<b>Figura 9</b>	Curvas Padrão para obtenção dos valores de eficiência.....	47
<b>Figura 10</b>	Expressão gênica para IFN- $\gamma$ , por indivíduos portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Rcs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	48
<b>Figura 11</b>	Expressão gênica para IFN- $\gamma$ , por indivíduos portadores das formas FI e FC, após diferentes estímulos.....	49
<b>Figura 12</b>	Expressão gênica para IFN- $\gamma$ , por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, com relação à mediana de expressão.....	49
<b>Figura 13</b>	Expressão gênica para IL-10, por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Rcs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	50
<b>Figura 14</b>	Expressão gênica para IL-10, por indivíduos portadores das formas FI e FC, após diferentes estímulos.....	51
<b>Figura 15</b>	Expressão gênica para IL-10, por portadores das formas FI,	

FCL, FCS e por indivíduos NI, com relação à mediana de expressão.....	52
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ag-Rec</b>	Antígenos recombinantes
<b>AL</b>	Anticorpos líticos
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Bcl2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>CCL2</b>	C-C Chemokine ligand 2
<b>CCR5</b>	C-C Chemokine receptor 5
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CpqAM</b>	Centro de Pesquisa Aggeu magalhães
<b>CRA</b>	<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>
<b>CRM</b>	Conselho Regional de Medicina
<b>CT</b>	<i>Threshold cycles</i>
<b>CXCR4</b>	C-X-C Chemokine receptor 4
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>Dnase</b>	Desoxirribonuclease
<b>DOU</b>	Diário Oficial da União
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>ESTs</b>	<i>Expressed Sequence Tags</i>
<b>FC</b>	Forma cardíaca
<b>FCL</b>	Forma cardíaca leve
<b>FCS</b>	Forma cardíaca severa
<b>FI</b>	Forma indeterminada
<b>FRA</b>	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>gDNA</b>	DNA genômico
<b>HUOC</b>	Hospital Universitário Osvaldo Cruz
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina

<b>INSS</b>	Instituto Nacional de Seguro Social
<b>Kda</b>	kilo Daltons
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>M</b>	Molar
<b>µM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NI</b>	Não infectado
<b>NKT</b>	Células T Natural Killer
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBMC</b>	Células Mononucleares do Sangue Periférico
<b>PBS</b>	Solução Salina tamponada com fosfato
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RF</b>	RNase <i>free</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RPMI</b>	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento beta e transformação
<b>Th1</b>	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 2
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>UPE</b>	Universidade de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da doença de Chagas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Aspectos imunopatológicos da doença de Chagas crônica</b> ....	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Antígenos Recombinantes de <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>População do estudo</b> .....	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Considerações Éticas</b> .....	<b>29</b>
<b>5.4</b>	<b>Coleta de Sangue</b> .....	<b>30</b>
<b>5.5</b>	<b>Sorologia para Infecção pelo <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>30</b>
<b>5.6</b>	<b>Separação e cultivo de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)</b> .....	<b>31</b>
<b>5.7</b>	<b>Extração e quantificação do RNA Celular</b> .....	<b>31</b>
<b>5.8</b>	<b>Eletroforese do RNA total</b> .....	<b>32</b>
<b>5.9</b>	<b>Tratamento do RNA total com DNase</b> .....	<b>33</b>
<b>5.10</b>	<b>Reação de Transcrição Reversa</b> .....	<b>34</b>
<b>5.11</b>	<b>PCR em Tempo Real</b> .....	<b>34</b>
<b>5.11.1</b>	<i>Condições gerais</i> .....	<b>34</b>
<b>5.11.2</b>	<i>Especificidade dos primers e sondas</i> .....	<b>36</b>
<b>5.11.3</b>	<i>Eficiência dos primers e sondas</i> .....	<b>36</b>
<b>5.11.4</b>	<i>Realização da análise pelo <math>\Delta\Delta CT</math> comparativo</i> .....	<b>37</b>
<b>5.12</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Avaliação do perfil protéico dos antígenos recombinantes</b> .....	<b>39</b>

6.2	Avaliação da sorologia da população do estudo .....	39
6.3	Integridade e pureza do RNA extraído .....	39
6.4	Especificidade dos <i>primers</i> e sondas .....	40
6.5	Eficiência dos <i>primers</i> e sondas .....	44
6.6	Avaliação da expressão gênica para IFN- $\gamma$ após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	45
6.7	Comparação da expressão gênica para IFN- $\gamma$ após diferentes estímulos antigênicos .....	45
6.8	Avaliação da frequência de altos e baixos padrões de expressão gênica para IFN- $\gamma$ após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	46
6.9	Avaliação da expressão gênica para IL-10 após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	47
6.10	Comparação da expressão gênica para IL-10 após diferentes estímulos antigênicos.....	48
6.11	Avaliação da frequência de altos e baixos padrões de expressão gênica para IL-10 após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	48
7	DISCUSSÃO .....	50
7.1	Avaliação da expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....	50
7.2	Avaliação da frequência de altos padrões de expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 após estímulo <i>in vitro</i> com CRA e FRA.....	52
8	CONCLUSÃO .....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente .....	67
	Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o voluntário controle .....	68
	Apêndice C – Artigo Publicado.....	69

<b>Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CPqAM/Fiocruz/PE.....</b>	<b>73</b>
---	-----------



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da doença de Chagas

Conhecida também por tripanossomíase americana, a doença de Chagas possui caráter sistêmico e evolução crônica, tendo por agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, encontra-se distribuída por toda a América Latina, onde sua prevalência é estimada em 15-16 milhões de casos e onde existem cerca de 75-90 milhões de pessoas sob o risco de contrair a infecção (COURA; DIAS, 2009).

A transmissão clássica da doença ocorre através do contato da pele lesionada com tripomastigotas metacíclicos presentes em excretas de insetos vetores contaminados. Contudo, transplantes de órgãos e as vias transfusional, congênita e oral também constituem formas para a sua transmissão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Clinicamente a doença é caracterizada por uma fase aguda seguida de uma fase crônica. A fase aguda, que pode durar de um a três meses após a infecção, é caracterizada por uma intensa parasitemia. Esta fase pode ser sintomática ou assintomática e inicia-se após o período de incubação que varia de quatro a dez dias quando a transmissão é vetorial (CHAGAS, 1916). Geralmente, quando sintomática, o indivíduo pode apresentar febre, mal-estar, anorexia e cefaléia. Os sinais de porta de entrada do parasito (sinal de Romaña e chagoma de inoculação) e manifestações sistêmicas (hepatomegalia, esplenomegalia, edema, alterações nervosas, comprometimento cardíaco) também podem estar presentes (HUGGINS, 1996). Porém, na maioria dos indivíduos, a fase aguda é imperceptível devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas.

A fase crônica da doença inicia-se cerca de dois a quatro meses após o final da fase aguda. Este período é marcado pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados níveis de anticorpos. Estudos realizados em zona endêmica mostram que cerca de 20-30% dos indivíduos infectados desenvolvem, nesta fase, a cardiomiopatia chagásica, que representa a maior causa de falência congestiva do coração na América Latina, acometendo mais de 3 milhões de pessoas

(PETHERICK, 2010). Outros 8-10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma digestiva, que é caracterizada por lesões teciduais de intensidade variável na rede neuronal mioentérica, o que origina diversos graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e do cólon. Contudo, o indivíduo chagásico pode permanecer por um longo período de latência clínica, denominado de forma indeterminada caracterizado pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas. Estima-se que cerca de 50% dos indivíduos infectados se encontrem no estágio indeterminado da doença (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

Para a determinação das formas clínicas, o eletrocardiograma e as radiografias do tórax e do abdômen são os exames realizados. Contudo, esses métodos, além de terem uma sensibilidade limitada, só detectam as formas moderadas e graves, sem detectar as alterações primárias da doença, além de não fornecerem seu prognóstico (OLIVEIRA JR et al., 1996).

O diagnóstico etiológico na fase aguda da infecção pode ser facilmente realizado utilizando-se métodos parasitológicos convencionais diretos (esfregaços, gota espessa, exame a fresco e método de Strout) ou indiretos (xenodiagnóstico e hemocultura). Na fase crônica, devido a uma baixa parasitemia o diagnóstico laboratorial é realizado preferentemente empregando métodos sorológicos (GOMES, 1997).

Os métodos sorológicos atualmente mais empregados para o diagnóstico da infecção crônica da doença de Chagas bem como para triagem de doadores em bancos de sangue são a hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2004), para um diagnóstico sorológico confiável é necessário obter resultados concordantes em pelo menos dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes. Porém, na triagem da doença de Chagas em bancos de sangue é recomendada a utilização de apenas um teste sorológico, sendo este um ELISA de alta sensibilidade (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2004).

A terapêutica utilizada na doença de Chagas é feita basicamente pelo uso de um dos medicamentos: o nifurtimox ou o benzonidazol que, além de serem parcialmente eficazes apenas na fase aguda (CANÇADO, 1985), devido ao potencial de cura parasitológica depender do tipo de cepa albergada, são muito tóxicos (ANDRADE; MAGALHÃES; PONTES, 1985). Desta forma, um estudo randômico

vem sendo realizado com indivíduos portadores de cardiopatia chagásica em diversos países, com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento com benzonidazol. Além disso, vêm sendo realizadas pesquisas objetivando a identificação de novos fármacos, como o Posaconazole (Merck & Co., Inc.) e o E12-24 (Eisai, Japão) tendo como iniciadas as fases I e II, respectivamente, dos testes laboratoriais (CLAYTON, 2010).

## 1.2 Aspectos imunopatológicos da doença de Chagas crônica

Entre diversos aspectos relacionados à doença de Chagas, a evolução clínica de indivíduos portadores da forma indeterminada em direção às demais formas clínicas sintomáticas, representa um dos mais intrigantes. Ainda não se encontra esclarecido o mecanismo pelo qual indivíduos portadores assintomáticos, após 10 a 20 anos, passam a apresentar sintomatologia relacionada ao coração e/ou ao sistema digestivo (GUTIERREZ et al., 2009).

Sabe-se que tanto fatores relacionados ao parasita quanto ao hospedeiro podem influenciar de maneira decisiva essa evolução clínica (DUTRA, 2009). Dentre as características do hospedeiro, a ausência de manifestações clínicas em indivíduos portadores da forma indeterminada estaria relacionada à capacidade destes em controlar a resposta imune que é dirigida ao parasita, o que não ocorreria em indivíduos portadores de formas sintomáticas, que apesar de manter uma resposta eficaz ao parasita, esta resultaria em um processo inflamatório exacerbado com consequentes efeitos deletérios para os tecidos (SATHLER-AVELAR et al., 2009).

Com o objetivo de contribuir na elucidação do mecanismo imunológico envolvido neste dano tissular, trabalhos publicados sobre o papel da imunidade na doença de Chagas documentam a existência de uma resposta imune específica contra *T. cruzi*. Com relação à resposta imune humoral, anticorpos reativos que podem mediar a lise de formas tripomastigotas foram encontrados no soro de pacientes crônicos. Esses anticorpos foram denominados “anticorpos líticos” (AL). Estudos mostraram níveis mais elevados de AL no soro de pacientes com a forma indeterminada em relação aos indivíduos portadores da forma cardíaca, sugerindo

um papel protetor para esses anticorpos (KRETTLI; BRENER, 1982; MONTALVÃO, et al., 2010). Por outro lado, o estudo de outras classes de anticorpos, sugere sua participação na patogenia da doença, uma vez que foram encontrados anticorpos reativos contra diversas estruturas do hospedeiro em indivíduos chagásicos crônicos (GIRONES et al., 2005; LEVITUS et al., 1991).

Com relação à resposta celular, trabalhos pioneiros mostraram que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores das formas indeterminada ou cardíaca são capazes de proliferar quando expostas, *in vitro*, a antígenos do parasita e a componentes do hospedeiro (BARROS-MAZON et al., 2004; DUTRA et al., 1997; DUTRA et al., 2000). Além de proliferarem em resposta a esses estímulos, PBMC de pacientes chagásicos, especialmente células T CD4+ e monócitos, produziram uma grande quantidade de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (SOUZA et al., 2004). Assim, acredita-se que essas células sejam fundamentais em orquestrar a resposta imune nos pacientes chagásicos, influenciando a evolução clínica destes. Por isso, diversas investigações têm sido realizadas com o objetivo de se caracterizar, fenotípica e funcionalmente, diferentes populações celulares e assim compreender seu papel no estabelecimento de respostas protetoras ou patogênicas frente à infecção com *T. cruzi*.

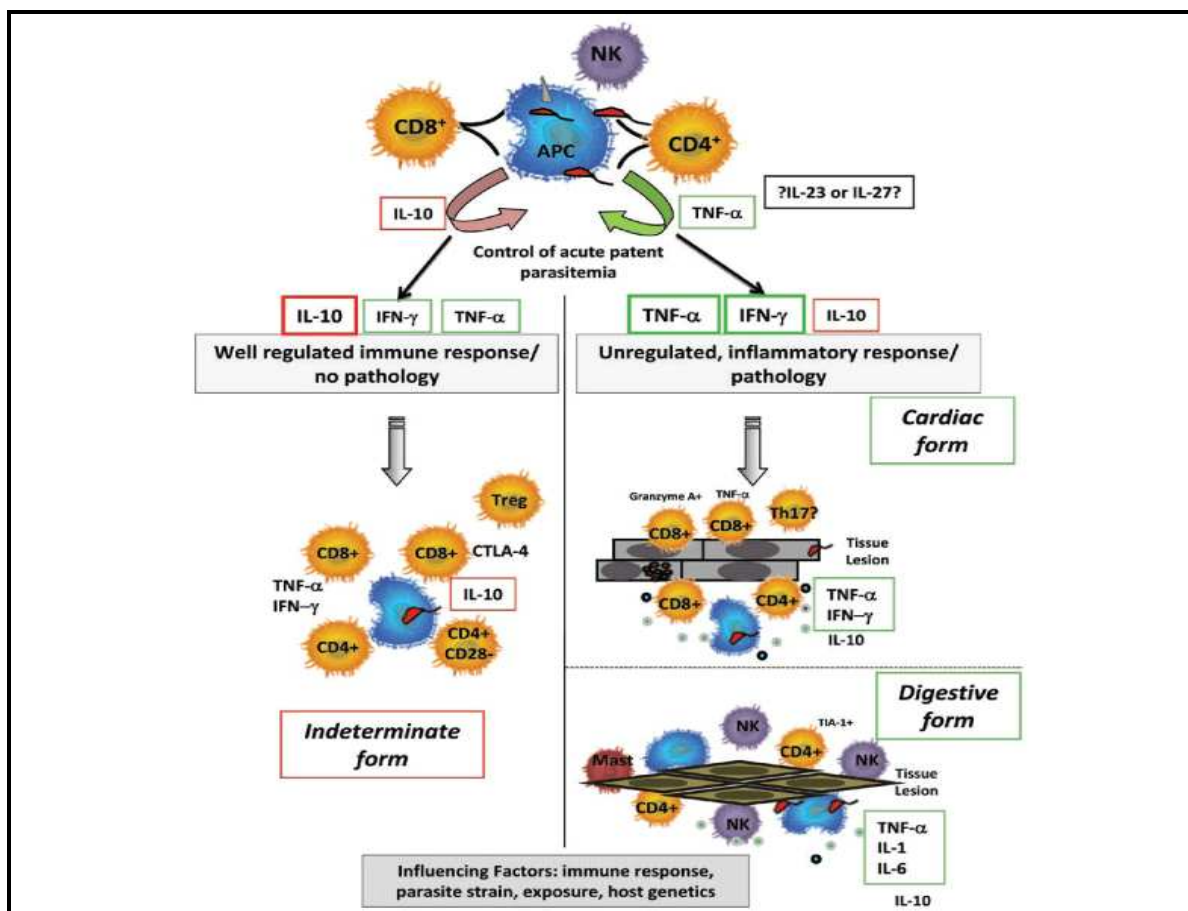
Neste sentido, foi observado que uma frequência elevada de células T ativadas CD4+CD28- no sangue periférico de pacientes chagásicos estaria associada com a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-10 em pacientes das formas cardíaca e indeterminada, respectivamente, sugerindo papéis funcionais distintos para essas células (DUTRA et al., 1996; MENEZES et al., 2004). Já células T CD8+ ativadas com expressão de granzima A e TNF- $\alpha$  seriam predominantes no infiltrado inflamatório associado às lesões cardíacas da doença (REIS, 1993). Além disso, acredita-se que a produção local de citocinas como IL-15 e IL-7 contribua para a sobrevivência das células T CD8+ no tecido cardíaco (FONSECA et al., 2007). Um dado interessante é que células com fenótipo consistente com o de populações regulatórias, CD4+CD25<sup>high</sup> e NKT (CD3+CD16-CD56+), foram encontradas no sangue periférico de indivíduos indeterminados, sugerindo que a falta de populações regulatórias em indivíduos sintomáticos poderia levar à exacerbação das atividades citotóxicas, culminando em dano tecidual (VITELLI-AVELAR et al., 2005).

Com relação à produção de IFN- $\gamma$ , estudo conduzido por Bahia-Oliveira e colaboradores (2000) verificou que pacientes chagásicos tratados curados

apresentavam uma maior produção de IFN- $\gamma$  que os não curados, sugerindo um papel protetor para essa citocina no processo de cura associada ao tratamento químico. Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que o tratamento de pacientes indeterminados, no início da fase crônica, levou à produção de IFN- $\gamma$  (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, autores mostraram uma clara associação entre a expressão de IFN- $\gamma$  e a ocorrência de doença cardíaca grave, sugerindo, na fase crônica, uma relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e a morbidade da doença (CORREA-OLIVEIRA et al, 1999). Nesse sentido, já foi mostrado que clones de células T derivadas do infiltrado inflamatório de pacientes chagásicos cardiopatas são excelentes produtores de IFN- $\gamma$  (CUNHA-NETO et al, 2006). Também foi observada uma correlação positiva entre a expressão de TNF- $\alpha$ , da quimiocina CCL2 e dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 com disfunção cardíaca em pacientes chagásicos, sugerindo uma associação entre TNF- $\alpha$  e patogenia (GOMES, 2005). Com relação à IL-10, embora seja correlacionada com o estabelecimento de um perfil modulatório em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, esta citocina, de perfil anti-inflamatório, foi também produzida por PBMC de pacientes cardiopatas (SOUZA et al., 2004), sugerindo que, mais que a produção de uma dada citocina por si só, o balanço entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas ao longo da doença seria fundamental para determinar o curso da infecção. Assim, fatores que determinam a produção dessas citocinas, como os estímulos antigênicos associados à infecção e como a ocorrência de polimorfismos gênicos, desempenhariam papel essencial na imunopatologia da doença (DUTRA et al., 2009).

Contudo, outros padrões inesperados da resposta imunológica também foram encontrados. Laucela et al. (2004) demonstraram correlação inversa entre níveis de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e gravidade da doença de Chagas. Este estudo, o qual analisou a resposta específica para peptídeos ou para lisado total de *T. cruzi*, em conjunto com os dados de maior resposta em pacientes residentes em área endêmica, sugere que células de memória produtoras de IFN- $\gamma$  são cruciais para o controle da infecção e da progressão para formas sintomáticas graves. Além disso, um estudo em camundongos sugeriu que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> não têm participação efetiva na imuno-regulação da resposta imune anti-*T. cruzi*, visto que a depleção das mesmas não alterou o curso da infecção aguda ou crônica pelo parasito (MENEZES; TEIXEIRA; DUTRA, 2009). Assim, podemos constatar a

complexidade dos fatores envolvidos na evolução da doença de Chagas. A Figura 1 propõe um modelo de imunorregulação que poderia estar ocorrendo nas formas crônicas sintomáticas e indeterminada da doença de Chagas.



**Figura 1:** Modelo esquemático do mecanismo de imunorregulação na doença de Chagas crônica. Fonte: DUTRA; GOLLOB. (2008).

Desta forma, embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos em relação à resposta imune de pacientes chagásicos, importantes aspectos ainda não foram esclarecidos. É possível que mecanismos imunológicos envolvidos na interação conjunta de células do sistema imune, além da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro, ocasionem uma patologia altamente complexa, impondo dificuldades para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias eficientes (DUTRA et al., 2009). O desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando a regulação da funcionalidade celular e da modulação de componentes inflamatórios, associado às

drogas anti-parasitárias, seriam alvos importantes no tratamento da doença de Chagas.

Assim, considerando-se a complexidade das interações parasita-hospedeiro, é improvável que apenas um braço do sistema imunológico esteja associado à evolução da doença, sendo esta o resultado da interação dos diversos compartimentos do sistema imune que incluem, desde o direcionamento pela da imunidade inata, a interação entre as diversas células bem como sua função e o balanço da produção de citocinas.

### 1.3 Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

A utilização de antígenos específicos do *T. cruzi* poderia apresentar um desempenho melhor na identificação de moléculas importantes na interação parasito-hospedeiro e nos estudos para o entendimento da imunopatologia da doença de Chagas (LORCA et al., 1992).

Em 1989, Lafaille et al. realizaram a clonagem e a caracterização de dois genes de *T. cruzi*. Estes genes codificam proteínas com estruturas onde há a repetição de um mesmo epítipo. Em função de suas estruturas e localização, esses antígenos foram denominados de CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen* ou antígeno citoplasmático repetitivo), presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen* ou antígeno flagelar repetitivo), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (LAFAILLE et al. 1989; KRIEGER et al., 1992). O perfil protéico dos antígenos realizado por Pereira et al. (2004) mostrou que o CRA possui 50KDa e o FRA 30KDa.

Esses antígenos já são utilizados com sucesso no imunodiagnóstico da doença de Chagas (GOLDENBERG et al., 1991; GOMES et al, 2001; GADELHA et al. 2003), e nos últimos anos suas propriedades imunogênicas têm sido avaliadas pelo nosso grupo. Nestes estudos foi observado que os antígenos CRA e FRA, além de induzirem resposta humoral e celular em camundongos imunizados (PEREIRA et al., 2004; 2005), também estimularam linfócitos de pacientes chagásicos a produzir determinado padrão de citocinas (PEREIRA et al., 2002). Além disso, também foi observado que o isotipo IgG2 anti-FRA está presente em níveis elevados no soro de

indivíduos chagásicos portadores da forma clínica cardíaca (VERÇOSA et al., 2007), o que sugere que os referidos antígenos podem ser utilizados como marcadores da progressão da doença em estudos de seguimento com indivíduos portadores da FI.

Desta forma, o potencial dos antígenos na investigação de um perfil de citocinas secretadas foi avaliado por Lorena et al. (2008). Porém, apesar dos resultados mostrarem que o CRA é capaz de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por indivíduos chagásicos em comparação com indivíduos não chagásicos, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os indivíduos portadores das formas crônicas cardíaca e indeterminada da doença. Uma justificativa para que não tenha sido identificado um perfil de citocinas por Lorena et al. (2008), poderia ser a baixa sensibilidade do ELISA de captura empregado na metodologia, além de baixos níveis das citocinas nas culturas e/ou ao seu consumo por receptores celulares. Assim, Lorena et al. (2009) ao investigarem a produção de citocinas através de citometria de fluxo, mostraram que após estímulo com CRA, a percentagem de células T CD4+ produtoras de IL-4 por portadores da FC sem dilatação, apresentou-se maior quando comparado aos indivíduos portadores da FC com dilatação. No entanto, quando estudada a produção de IL-10, por essas células, apenas os indivíduos portadores da FI apresentam níveis de CD4+/IL-10+ maiores que os indivíduos NI, indicando que a produção de IL-10 por linfócitos T CD4+ pode realmente, estar exercendo um papel regulatório neste grupo de indivíduos. Resultados diferentes foram observados quando o estímulo foi FRA, com relação à IL-4, foi observado que apenas os pacientes portadores da FC com dilatação não produziram níveis significativos dessa citocina, comparados aos indivíduos NI, indicando que indivíduos com severidade cardíaca podem ter perdido a capacidade de regulação imunológica por essa citocina.

Ao avaliar as respostas de linfócitos T CD8+, Lorena et al. (2009) observaram que indivíduos portadores da FC com dilatação apresentaram maiores níveis de linfócitos T CD8+/IFN- $\gamma$ +, bem como de linfócitos T CD8+/TNF- $\alpha$ +, quando comparado aos indivíduos portadores da FC sem dilatação e da FI da doença quando utilizado o Ag-Rec CRA para estimulação in vitro, indicando que a severidade do dano cardíaco está relacionada com altos níveis de citocinas inflamatórias. No entanto, nenhuma diferença estatística foi verificada quando o estímulo antigênico foi o FRA.



Considerando a importância da produção de citocinas pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ mostrada por Lorena et al. (2009), a expressão gênica para citocinas em pacientes chagásicos crônicos, após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. Cruzi*, poderia fornecer evidências complementares, auxiliando no entendimento da evolução de indivíduos assintomáticos (FI) em direção às formas clínicas sintomáticas. Assim, predizendo a evolução clínica desses indivíduos, essa ferramenta poderia ser utilizada para o seguimento de intervenções terapêuticas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos portadores da FI da doença de Chagas não apresentam manifestações clínicas sendo estigmatizados e ditos incapazes, erroneamente, de exercerem suas funções no trabalho e atividades diárias. A descoberta da doença nesses indivíduos ocorre geralmente através da realização de provas sorológicas por ocasiões de inquéritos epidemiológicos, triagem para doações de sangue ou órgãos e na avaliação para admissão em empresas. Neste caso, a detecção da infecção pelo *T. cruzi* resulta na recusa destes indivíduos durante o processo de admissão ao emprego, o que gera um problema psico-social.

Além disso, a cardiopatia chagásica apresenta pior prognóstico quando comparada com a insuficiência cardíaca de outras etiologias (SILVA et al., 2008). Porém, caso tratada com antecedência com drogas como o enalaprilato, a hipertrofia ventricular esquerda que ocorre na doença pode ser prevenida (COSTA et al., 1997). Com relação à forma digestiva, não existe atualmente mecanismos para sua prevenção caso sua evolução seja detectada precocemente. Contudo pacientes que estivessem evoluindo para essa forma poderiam ter maior atenção por parte dos médicos que poderiam traçar estratégias para a melhoria da qualidade de vida destes indivíduos.

Desta maneira, estudos que avaliem os padrões celulares e as citocinas produzidas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas são de fundamental importância para que se possam compreender os mecanismos de desenvolvimento da patologia chagásica, permitindo o estabelecimento dos perfis imunológicos na fase crônica da doença. Tais fatos contribuiriam para melhoria da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que permitiriam o desenvolvimento de novos métodos prognósticos aliados a novas terapêuticas, além de garantir aos portadores da doença de Chagas direitos trabalhistas frente às empresas e ao INSS.

### 3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais as diferenças na produção de RNA mensageiro de citocinas do perfil Th1 e Th2, no sangue periférico de pacientes chagásicos, após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*, que permitem diferenciar as formas clínicas crônicas da doença de Chagas?

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica de citocinas do perfil Th1(IFN- $\gamma$ ) e Th2(IL-10) em portadores da doença de Chagas, após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

### 5.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar a produção de RNA mensageiro para as citocinas do perfil Th1(IFN- $\gamma$ ) e Th2(IL-10) em cada forma clínica crônica estudada;
- b) Avaliar os indivíduos altos e baixos produtores de citocinas em cada forma clínica estudada;
- c) Comparar os perfis de expressão gênica para as citocinas, entre as diferentes formas clínicas crônicas;

## 6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 6.1 Antígenos Recombinantes de *T. cruzi*

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos/Fiocruz e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz. Com o intuito de se avaliar as condições do lote dos antígenos utilizados, foi realizada uma análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) (LAEMMILI, 1970) e coloração pelo corante para proteínas Comassie Blue. Além disso, contaminações por proteínas e carboidratos bacterianos também foram analisadas através da coloração pela prata (MORRISSEY, 1981) e pelo ácido periódico de Schiff (JANN et al., 1975), respectivamente.

Após a avaliação da integridade e pureza, os antígenos foram ressuspensos, em 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado contendo 0,2% de bicarbonato de sódio e 1% de solução de antibióticos (estreptomicina – 100 µg/mL e penicilina – 100 U/mL) e soro bovino fetal a 10% (Sigma-Aldrich®). Em condições estéreis, a suspensão de antígeno foi filtrada, utilizando-se filtro de 0.2µm, e armazenada a -20°C para posterior utilização nos ensaios de cultura celular.

### 6.2 População do Estudo

Os indivíduos portadores da doença de Chagas foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Osvaldo Cruz – HUOC, na Universidade de Pernambuco – UPE. A inclusão dos indivíduos foi baseada no preenchimento de 3 critérios: 1) possuir sorologia reagente para a infecção chagásica (dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas

diferentes); 2) ter realizado exames clínicos para a caracterização de suas formas clínicas (exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago e enema opaco, quando necessários); e 3) não ter sido submetido ao tratamento etiológico. Os pacientes foram atendidos e examinados por médicos que fazem parte do ambulatório após instruções detalhadas repassadas pela Dra. Glória Cavalcanti Melo (CRM 7942), Dra. Mariza Melo (CRM 7760) e Dra. Cristina Tavares (CRM 6061), médicas do HUOC/UPE e colaboradoras deste estudo.

Os pacientes portadores da Forma Cardíaca (FC) (n=19) foram selecionados por apresentarem alteração no eletrocardiograma, ecocardiograma e/ou raio-X de tórax, ausência de dilatação do esôfago, ausência de queixas digestivas (engasgos e constipação) e sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*. Esses pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes portadores da FC sem dilatação cardíaca ou forma cardíaca leve (FCL) (n=9) e; pacientes portadores da FC apresentando dilatação cardíaca ou forma cardíaca severa (FCS) (n=10), quando no ecocardiograma o paciente apresentava fração de ejeção <55% e/ou aumento da área do ventrículo esquerdo.

Os pacientes portadores da Forma Indeterminada (FI) (n=17) foram selecionados por não apresentarem quaisquer alterações cardíacas e digestivas, mas com sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*. Um grupo de indivíduos voluntários não infectados (NI) (n=8) foi composto para comparação com os indivíduos portadores da doença de Chagas através do preenchimento dos seguintes critérios: 1) ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; 2) nunca ter recebido transfusão de sangue; e 3) ter apresentado teste sorológico não reagente para a doença de Chagas. Este grupo controle foi composto pelos acompanhantes dos pacientes atendidos no ambulatório de doença de Chagas.

### **6.3 Considerações Éticas**

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B). A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados

pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz sob o parecer N<sup>o</sup>. 03/2009 (Anexo A).

#### **6.4 Coleta de Sangue**

Quinze mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica (BD Vacutainer™), para ensaios de cultura celular, e cinco mililitros em tubos sem anticoagulante (tubo seco) (BD Vacutainer™) para a obtenção do soro e confirmação da sorologia para a infecção pelo *T.cruzi*. Os tubos secos, após a retração do coágulo, foram centrifugados (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente) e as alíquotas de soro, devidamente retiradas, identificadas e armazenadas a -20°C na Soroteca de Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz.

#### **6.5 Sorologia para Infecção pelo *T. cruzi***

Para a confirmação da infecção pelo *T. cruzi* foram utilizados um teste imunoenzimático, constituído de uma mistura de extratos totais do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III, Bioschile Ingenieria Genetica S.A), e um teste imunoenzimático que utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Imuno- ELISA Chagas, Wama Diagnóstica). Resultados reagentes foram considerados quando os dois testes apresentaram reatividade e não-reagentes, quando os dois testes não apresentaram reatividade (BRASIL, 2005).

## 6.6 Separação e cultivo de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Para a separação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC), o sangue coletado nos tubos contendo heparina, foi diluído (1:2) em Meio RPMI 1640 incompleto (sem adição de soro bovino fetal a 10%). Esta solução (sangue/RPMI) foi adicionada a tubos de polipropileno (BD Falcon<sup>TM</sup>; 50mL) contendo Ficoll-Paque PLUS<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences) numa proporção de 5mL de Ficoll para cada 10 mL de sangue/RPMI. Após centrifugação dos tubos (900 x g a 20°C) por 30 minutos, os anéis de PBMC que se formaram na interface entre o Ficoll e o plasma foram removidos utilizando-se pipetas *pasteur* e colocados em tubos de polipropileno (BD Falcon<sup>TM</sup>; 15mL). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação durante 15 minutos (400 x g a 20°C) em 14mL de meio RPMI 1640. Finalizadas as lavagens as células foram ressuspendidas em 2mL de meio RPMI 1640 suplementado e contadas em câmara de Neubauer (Loptik Labor), em uma diluição (1:10) com azul de Trypan (Sigma-Aldrich®) e ajustadas para a concentração desejada de  $5 \times 10^6$  células/mL. As culturas foram estimuladas com Fitohemaglutinina (PHA) (5µg/mL); com as proteínas recombinantes CRA e FRA (2µg/mL); e culturas sem estímulo foram utilizadas como controle negativo; e cultivadas por 3 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

## 6.7 Extração e quantificação do RNA Celular

A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando-se o reagente comercialmente disponível Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>), segundo as recomendações do fabricante.

Com o objetivo de liberar as células em cultura, que aderem à superfície do tubo, foi procedida uma lavagem adicionando-se 2mL de PBS-WASH (PBS contendo albumina sérica bovina 0.5% e azida sódica 1% - Sigma-Aldrich®, pH 7.2) a cada tubo de cultura, e estes centrifugados por 10min (400 x g a 20°C). A remoção do sobrenadante foi realizada por aspiração à vácuo até um volume restante de 1mL



onde em seguida as células foram ressuspensas. Desta suspensão, 400µL foram transferidos para microtubos (Eppendorf, 1,5mL), e a extração do RNA iniciada com a adição de 1mL do reagente Trizol<sup>®</sup>. Quando não realizado o processamento imediato das amostras, foi feito o armazenamento destas a -20°C para posterior continuidade das etapas da extração do RNA.

Após o tratamento com o Trizol<sup>®</sup>, foi adicionado a cada microtubo 200µL de clorofórmio P.A. (VETEC) e estes incubados por 15min à temperatura ambiente (T.A.) Após esse período, os tubos foram levados à centrifugação por 15min (12000 x g, 4°C). Nesta etapa pôde ser observada a formação de três fases, onde a fase aquosa ou inorgânica contendo o RNA foi removida para novos tubos (400µL adicionados em 2x de 200µL). Após este procedimento, foram adicionados a cada tubo 400µL de álcool isopropílico P.A. (Quimex), seguindo-se uma incubação por 10min à T.A e posterior centrifugação por 15min (12000 x g, 4°C). Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, foi adicionado aos tubos 1mL de etanol 75% (Nuclear) e realizada uma última centrifugação por 5min (7500 x g, 4°C). Após a remoção do sobrenadante por aspiração com bomba à vácuo, o *pellet* de RNA foi ressuspendido em 30µL de água livre de RNases (água RNase *Free* ou RF), obtida pelo tratamento com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) (AMRESCO), e incubados por 10min 4°C para total solubilização do *pellet*; por fim as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

A quantificação do RNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech) através da leitura no comprimento de onda de 260nm. Também foi determinado o grau de pureza do RNA, que indica sua contaminação por constituintes orgânicos como proteínas, através da razão de leitura entre os comprimentos de 260/280nm. A quantificação foi realizada tomando-se o fator de diluição 1:70.

## 6.8 Eletroforese do RNA total

Para se avaliar a integridade do RNA extraído foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1,2% desnaturante. Desta forma 0,72g de agarose (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foram dissolvidos, por aquecimento, em 40ml de água RF. Ao gel

ainda liquefeito foram adicionados 10mL de solução tampão MOPS 10x concentrada [ (80%) Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfônico (95,9%) em acetato de sódio (50Mm), pH 7; (1%) EDTA (0,5M, pH 8] (Sigma-Aldrich®) e o volume completado para 60ml com água RF, o gel foi disposto em suporte específico e deixado solidificar por 30min a T.A. Após solidificação do gel, este foi disposto em cuba eletroforética (LCH 7 x 8 - Loccus Biotecnologia) onde foram adicionados 250ml do tampão de corrida (tampão MOPS 1X) e realizada a posterior aplicação das amostras nos poços.

No preparo das amostras a serem aplicadas no gel, foram utilizados 7µl de cada amostra (0,5-1,0µg de RNA) e 7,0 µL do mix de amostras [70% Formamida (99,5%); 20%MOPS (10X); 10% Corante – Padrão de migração eletroforética (25%)]. Este conjunto foi levado ao banho seco por 10min a 65°C e logo após foi mantido resfriado em gelo onde foi adicionado 1,0 µL do corante SYBR Gold (Invitrogen™) (100X). Para o preparo do peso molecular, foram utilizados 0,5µl de ladder para RNA (0.5 – 10 Kb – Invitrogen™), 2µl do mix de amostras e 9,5µl de água RF. Posteriormente foram aplicadas 14µL de cada amostra e 12µl do peso molecular em poços do gel.

A corrida eletroforética foi realizada à 80V, por 40min. Após a corrida, o gel foi analisado em um sistema de fotodocumentação (Gel Logic 100, Imaging System).

## 6.9 Tratamento do RNA total com DNase

Com o objetivo de eliminar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA com DNA genômico (gDNA), foi realizado o tratamento dessas amostras com uma Desoxirribonuclease (DNase), desta forma foi utilizado o Kit Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen™), e procedido de acordo com as instruções do fabricante. Nesta reação, foram utilizados 3µg de cada amostra de RNA, 1 µl do tampão de reação da DNase (200 mM Tris-HCL pH 8,4, 20 Mm MgCl<sub>2</sub>, 500 Mm KCL) concentrado e 3µl da enzima DNase I (1U/µl) no volume final de reação de 30µl. Este conjunto foi incubado por 15 min, T.A., e após isso foi adicionado a cada tubo 3µl de EDTA (25mM) e estes submetidos ao banho seco (Dry Bath, Heat and Cool - Loccus Biotecnologia) por 10 min a 65°C. Após isso, as amostras de RNA

tratadas foram armazenadas a -80°C até posterior utilização nos ensaios de transcrição reversa.

## 6.10 Reação de Transcrição Reversa

Com o objetivo de se obter o DNA complementar (cDNA) a partir do mRNA extraído, foi realizada uma reação de transcrição reversa do RNA das amostras utilizando-se o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações foram realizadas em duplicatas para cada amostra, assim, foram dispostos em placas para PCR (96 poços, Applied Biosystems™), 10µl do RNA tratado com DNase e 10µl do conjunto de reagentes do Kit [RT Buffer 10X, dNTP Mix (100Mm) 25X, RT Random primers 10X, Enzima Multiscribe, Rnase inhibitor e água RF]. Com o objetivo de se verificar possíveis contaminações dos reagentes um controle negativo contendo todos os reagentes menos a amostra também foi realizado. As placas foram centrifugadas brevemente por 30seg (1000 x g, 4°C) para que fossem removidas quaisquer bolhas de ar, e levadas ao termociclador (Mastercycler Gradiente - Eppendorf) onde foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: 25°C – 10min; 37°C – 120min; 85°C – 5min e 4°C – *Hold*. O cDNA foi armazenado a -20°C para posterior amplificação por PCR em Tempo Real.

## 6.11 PCR em Tempo Real

### 6.11.1 Condições gerais

As amplificações por PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com instruções do fabricante. As sequências alvo consideradas foram referentes às citocinas IFN-γ e IL-10. Além disso, foram

incluídos nas placas de reação, um controle da reação (sem o cDNA alvo) e um controle endógeno correspondente ao gene da  $\beta$ -actina. Os *primers* e sondas foram os mesmos descritos no estudo de Mocellin et al. (2003), cujas sequências nucleotídicas encontram-se detalhadas no Quadro 1. Para se detectar os produtos de amplificação para as citocinas e controle endógeno, foi utilizado o sistema TaqMan de marcação de sondas, sendo esta realizada através do *Reporter* – FAM e do *Quencher* – TAMRA, a fluorescência foi detectada utilizando-se a plataforma ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, CA, USA).

IFN- $\gamma$	Primer sense	5'-AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT-3'
	Primer anti-sense	5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3'
	Sonda	6FAM-TCTTGGCTGTTACTGCCAGGACCCA-TAMRA
$\beta$ -actina	Primer sense	5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3'
	Primer anti-sense	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
	Sonda	6FAM-TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGAGCGC-TAMRA
IL-10	Primer sense	5'-GCCGTGGAGCAGGTGAAG-3'
	Primer anti-sense	5'-GAAGATGTCAAACCTCACTCATGGCT-3'
	Sonda	6FAM-GCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACA-TAMRA

Quadro 1: Sequências nucleotídicas dos primers e sondas dos genes analisados. Fonte: Mocellin et al. 2003.

As amplificações foram realizadas em triplicata utilizando-se microplacas para PCR (96 poços, Applied Biosystems™), de acordo com o seguinte protocolo: a cada 23 $\mu$ l do mix de reagentes ( 12,5 $\mu$ l de TaqMan Universal PCR Máster Mix [2x]; 2,5 $\mu$ l de cada *primer Forward* e *Reverse* [4 $\mu$ M]; 2,5 $\mu$ l da sonda [2 $\mu$ M] e 2.5 $\mu$ l de água RF) foram adicionados 2 $\mu$ l de cDNA das amostras em um volume final de reação de 25  $\mu$ l. Após o selamento da placa, esta foi submetida a uma breve centrifugação por 30 seg (1000 x g, 4°C) para que fossem removidas quais quer bolhas de ar, e levadas à plataforma de PCR em tempo real para amplificação dos genes alvos e do controle endógeno, de acordo com o protocolo de ciclagem pré-estabelecido pelo *software* da plataforma (50°C – 2min; 95°C – 10min e 40 ciclos de 95°C – 15seg e 60°C – 1min) .

### 6.11.2 Especificidade dos primers e sondas

Com o objetivo de se observar a especificidade dos primers e sondas, ou seja, confirmar que amplificariam apenas o cDNA dos genes em estudo, foram realizadas duas etapas. A primeira consistiu na comparação entre a amplificação de amostra de cDNA e uma de gDNA utilizando-se os primers e sondas das sequências estudadas. Além disso, foi realizada uma corrida eletroforética, em gel de agarose 2%, dos amplicons obtidos pela amplificação do cDNA com o objetivo de se estimar o tamanho dos produtos e verificar a ocorrência de amplificação de produtos inespecíficos.

A segunda etapa consistiu na realização de um alinhamento das sequências de *primers* e sondas com o genoma humano, utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). O objetivo deste alinhamento foi confirmar se o desenho dos *primers* e sondas para cada alvo, foi realizado em sequências correspondentes aos respectivos mRNAs, evitando desta forma, a emissão de fluorescência por moléculas de gDNA e amplificando apenas amostras de cDNA.

### 6.11.3 Eficiência dos primers e sondas

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos *primers* e sondas utilizados foram realizadas ampliações do gene alvo e endógeno utilizando-se cinco pontos em triplicata de uma diluição seriada (1:2) e partindo-se da concentração de 8ng/μl de cDNA. Este procedimento objetivou a construção de uma curva padrão para cada citocina e uma para o controle endógeno, com a posterior determinação de suas respectivas eficiências de reação. A eficiência consiste na capacidade que o conjunto de *primers* e sondas têm em detectar diferentes quantidades do alvo presentes na amostra.

A partir da curva padrão, se obtém o valor da inclinação da reta (*slope*) e a partir deste valor calcula-se a eficiência da reação a partir da seguinte fórmula:  $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$ . Desta forma, espera-se que as eficiências, tanto do alvo quanto do controle endógeno, sejam similares e próximas a 100%.

#### 6.11.4 Realização da análise pelo $2^{\Delta\Delta CT}$ comparativo

Este método de análise é constituído de uma quantificação relativa que utiliza fórmulas aritméticas para determinar as diferenças na expressão de um alvo de uma amostra (com estímulo) comparando com a sua expressão em uma amostra controle (sem estímulo). Além disso, nesse tipo de análise é realizada uma normalização de expressão deste alvo para cada amplificação, ou seja, sua expressão é subtraída pela expressão de um gene constitutivo que é expresso de maneira semelhante em diferentes tecidos e em diferentes condições (WILHELM; PINGOUD, 2003). Assim, para cada amostra (estimuladas com CRA, FRA e PHA) e para o controle (sem estímulo) foram amplificados os genes alvo (IFN- $\gamma$  e IL-10) e o gene constitutivo ( $\beta$ -actina), de forma a se obter os valores dos *Threshold Cycles* (CT) correspondentes e realização dos cálculos para obtenção dos resultados.

Para se realizar uma análise com base nos valores do  $\Delta\Delta CT$  faz-se necessário que as eficiências entre alvos (citocinas) e o gene endógeno sejam semelhantes. Contudo, é recomendado que mesmo que os *primers* obtenham eficiências semelhantes, seja realizada uma correção destas, pois mesmo que pequenas essas diferenças podem ocasionar erros na interpretação da expressão gênica (CHINI, et al. 2007). Assim, os cálculos para a determinação do  $\Delta\Delta CT$  foram realizados a partir do método matemático descrito por Pfaffl et al., 2001, onde as diferenças na expressão gênica são calculadas baseando-se apenas nas eficiências das amplificações e as diferenças de CTs do alvo na amostra a no controle. Desta forma, na determinação dos valores dos CTs e para que os resultados pudessem ser comparados entre as placas, os valores estabelecidos para o *Threshold* foram de 0.01 para os alvos e de 0.05 para o controle endógeno.

## 6.12 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média, mediana e desvio padrão. Para testar a suposição de homogeneidade dos dados foi aplicado o teste de Levene e quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar as médias de expressão gênica para citocinas entre os grupos e para cada estímulo foi utilizado o teste para médias Anova seguido do teste de Tukey e quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, quando existiu diferenças entre médias. Na avaliação dos indivíduos “alto” e “baixo” produtores de citocinas Foi realizado o teste Qui-quadrado de proporções. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de  $p < 0,05$ . Os softwares utilizados foram o Excel 2000, GraphPad Prism 3.0 e o SPSS 8.0.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Avaliação do perfil protéico dos antígenos recombinantes

Para avaliar a pureza dos Ags-Recs foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE seguida de coloração pela prata para investigar a presença de contaminações protéicas. Assim, foi observado que Os Ags-Recs CRA e FRA utilizados apresentaram-se bem conservados e não estavam contaminados por proteínas ou carboidratos derivados da *Escherichia coli*, bactéria onde os Ags-Recs são produzidos.

### 7.2 Avaliação da sorologia da população do estudo

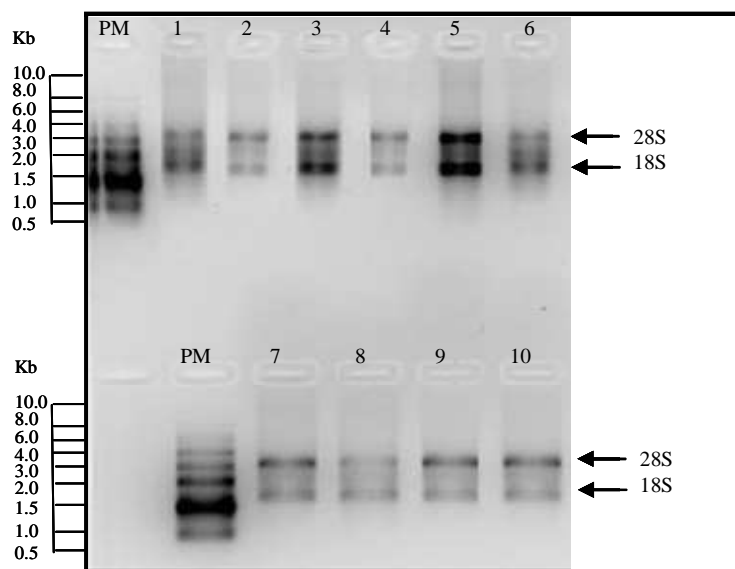
Para confirmarmos a sorologia acerca da infecção pelo *T. cruzi* realizamos dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes em amostras de soro de todos os indivíduos envolvidos neste estudo. Todos os pacientes provenientes do HUOC/UPE apresentaram sorologias reagentes, confirmando os dados obtidos em seus prontuários. Além disso, a sorologia não-reagente também foi confirmada nos indivíduos NI.

### 7.3 Integridade e pureza do RNA extraído

Foi observada a amplificação dos alvos e do controle endógeno quando da realização da amplificação na plataforma de PCR em tempo real. Desta forma, para a confirmação da viabilidade das amostras dos indivíduos selecionados para o estudo, foi verificado, de forma aleatória, o perfil eletroforético do RNA de 10% das extrações realizadas. Através da Figura 2, podemos observar em todas as extrações avaliadas que o RNA apresentou-se íntegro, através da visualização das respectivas



bandas para os RNAs ribossomais 28S e 18S sem sinais de rastro de uma possível degradação. Além disso, pode-se observar a inexistência de fluorescência nas regiões superiores à banda do ribossomal 28S e nos poços, o que indica que o RNA extraído apresenta-se livre de contaminação por DNA genômico (gDNA).



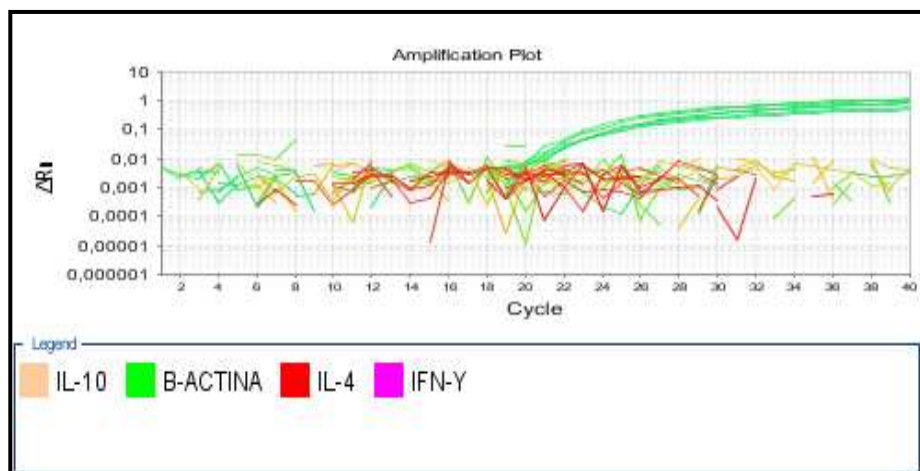
**Figura 2:** Perfil eletroforético de RNA obtido de amostras de cultura de PBMC de indivíduos selecionados para o estudo.

Legenda: (PM): Peso Molecular para RNA (0.5-10 Kb); (1-10): amostras de RNA de indivíduos selecionados para o estudo.

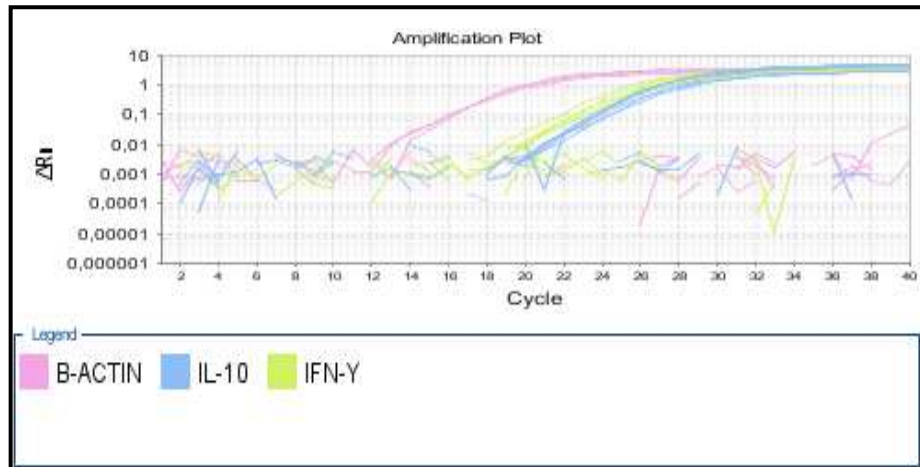
#### 7.4 Especificidade dos *primers* e sondas

A avaliação da especificidade dos primers e sondas utilizados, através da comparação de suas amplificações com gDNA e com cDNA, demonstrou que o conjunto de oligos utilizados para a amplificação do alvos (IFN- $\gamma$  e IL-10), apresentaram-se específicos para amplificação de cDNA, não amplificando o gDNA (Figuras 3 e 4). Esta observação, está de acordo com o descrito por Mocellin et al., 2003, que descreve as sequências em seu trabalho e afirma serem elas construídas em regiões exon-exon. Contudo, quando observados o conjunto de oligos para amplificação do gene da  $\beta$ -actina, foi evidenciada amplificação com amostras de gDNA (Figura 3). Apesar de também ter sido descrita sua sequência como

construídas em regiões exón-exón, este fato apenas ratifica o tratamento prévio das amostras de RNA com uma DNase.



**Figura 3:** Amplificação dos genes alvos e do controle endógeno utilizando-se amostra de gDNA.



**Figura 4:** Amplificação dos genes alvos e do controle endógeno utilizando-se amostra de cDNA.

A análise do alinhamento das sequências de *primers* e sondas confirmou o desenho destes para sequências de ESTs, ou seja construídas tendo como molde o RNA mensageiro e sendo específicas para a amplificação do cDNA (Figuras 5, 6 e 7).

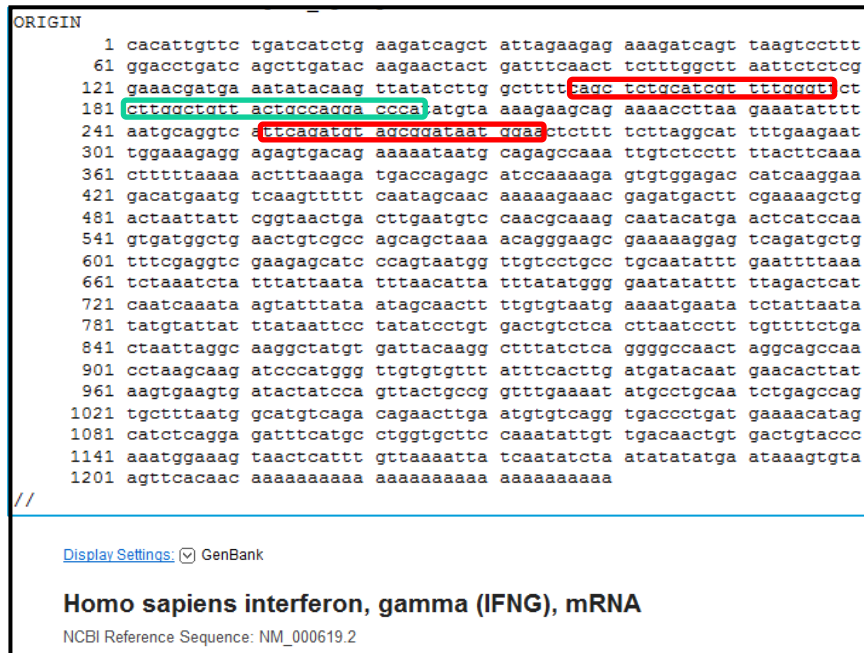


Figura 5: Alinhamento das seqüências de *primers* e sonda para o gene de IFN- $\gamma$ .  
 Legenda: em vermelho – conjunto de *primers*; em verde – sonda.

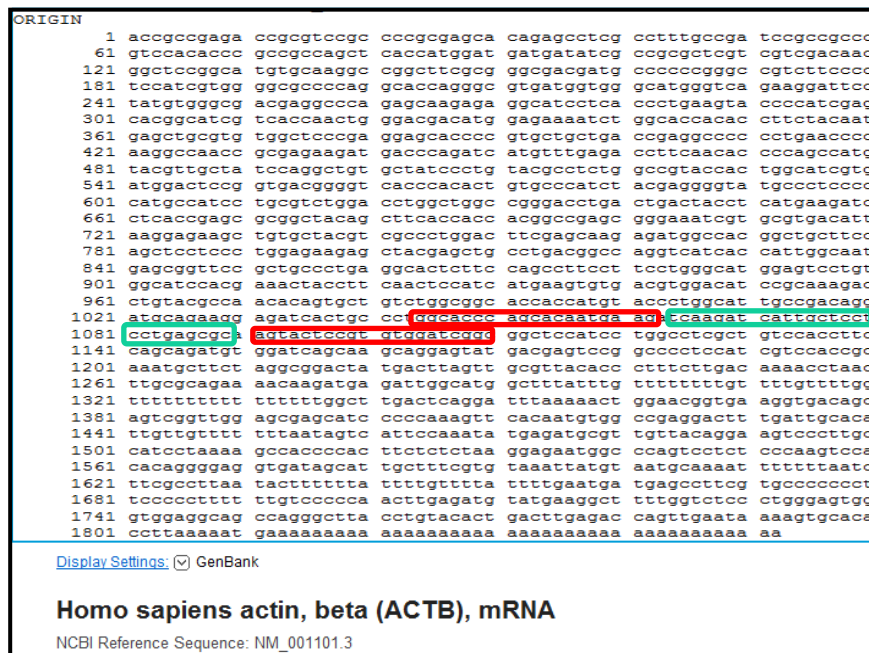
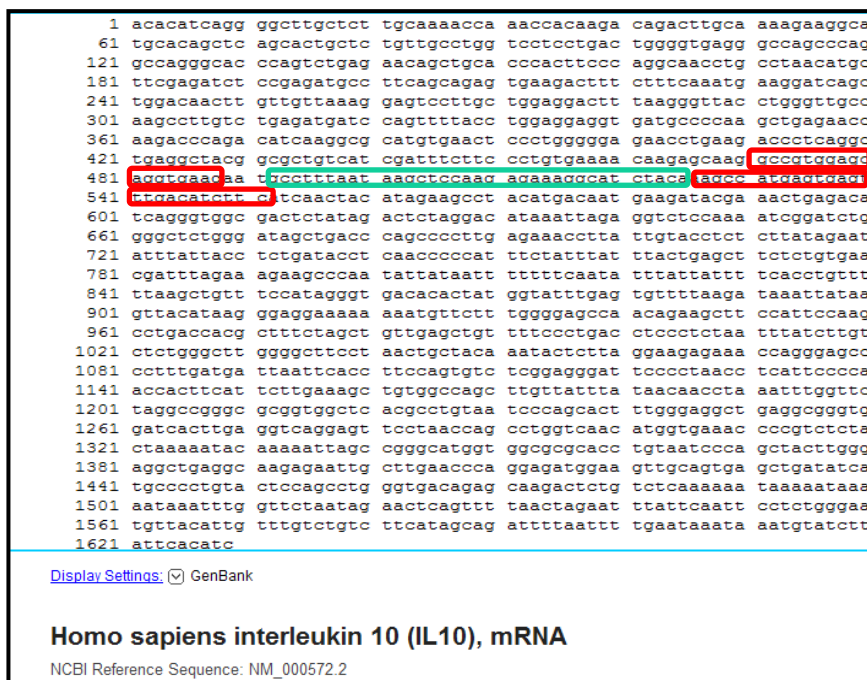
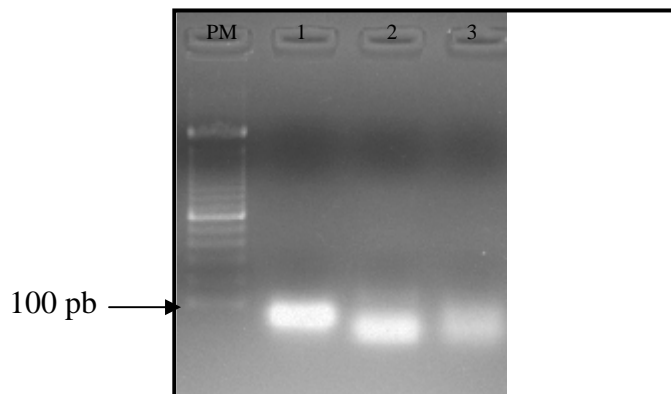


Figura 6: Alinhamento das seqüências de *primers* e sonda para o gene de  $\beta$ -actina.  
 Legenda: em vermelho – conjunto de *primers*; em verde – sonda.



**Figura 7:** Alinhamento das seqüências de *primers* e sonda para o gene de IL-10.  
 Legenda: em vermelho – conjunto de *primers*; em verde – sonda.

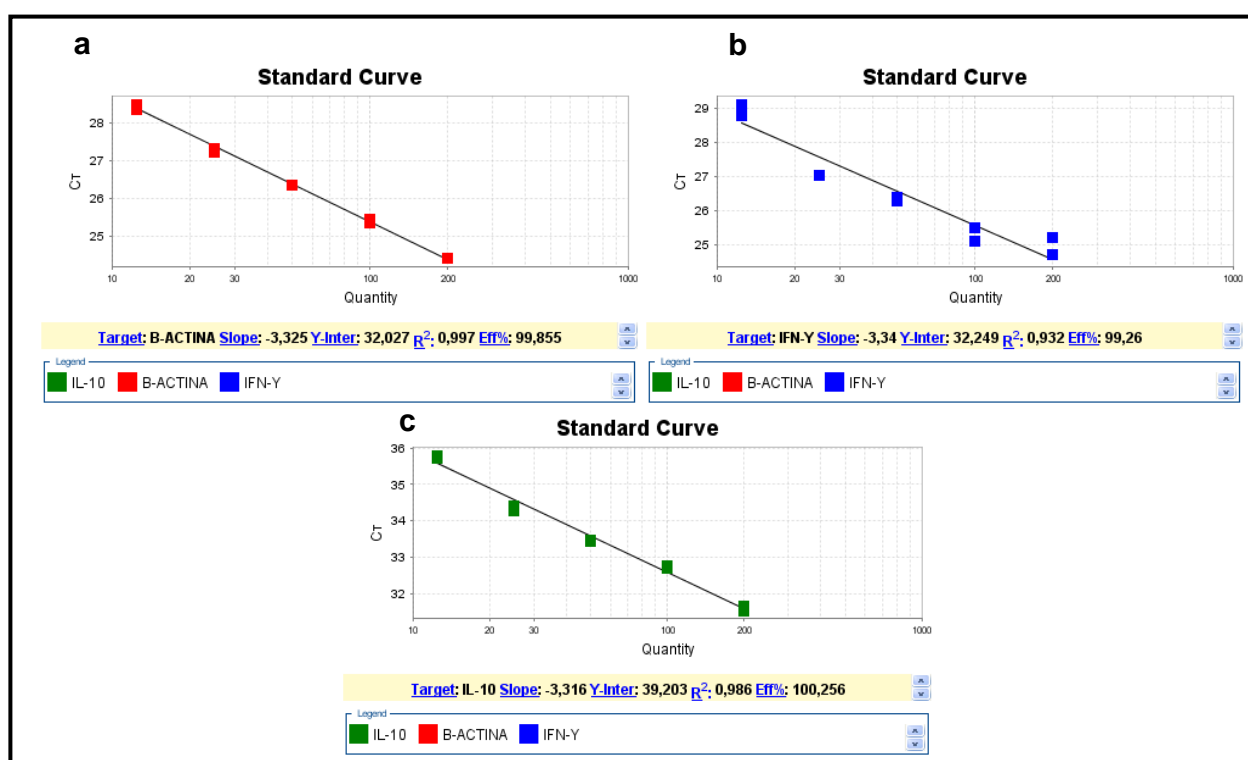
Quando realizado o perfil eletroforético dos amplicons dos alvos e do controle endógeno utilizados no estudo, pôde ser confirmado que estes apresentavam apenas um produto de amplificação e ausência de dímeros de *primers* (Figura 8), confirmando também suas especificidades quanto aos alvos em questão. Além disso, os produtos de amplificação apresentaram pequeno peso molecular, inferior a 100 pb, o que apenas colabora para uma melhor eficiência da reação de PCR.



**Figura 8:** Perfil eletroforético dos amplicons dos genes alvos e do controle endógeno.  
 Legenda: (PM): peso molecular; (1): amplicom para o gene de IL-10; (2): amplicom para o gene de IFN-Y; (3): amplicom para o gene de  $\beta$ -actina.

## 7.5 Eficiência dos *primers* e sondas

Ao avaliar a eficiência dos diferentes conjuntos de *primers* e sondas utilizados, observamos através de suas curvas-padrão (Figura 9), que estes se apresentaram satisfatórios com eficiências de 99% para os genes da  $\beta$ -actina e do IFN- $\gamma$ , e de 100% para o gene da IL-10.

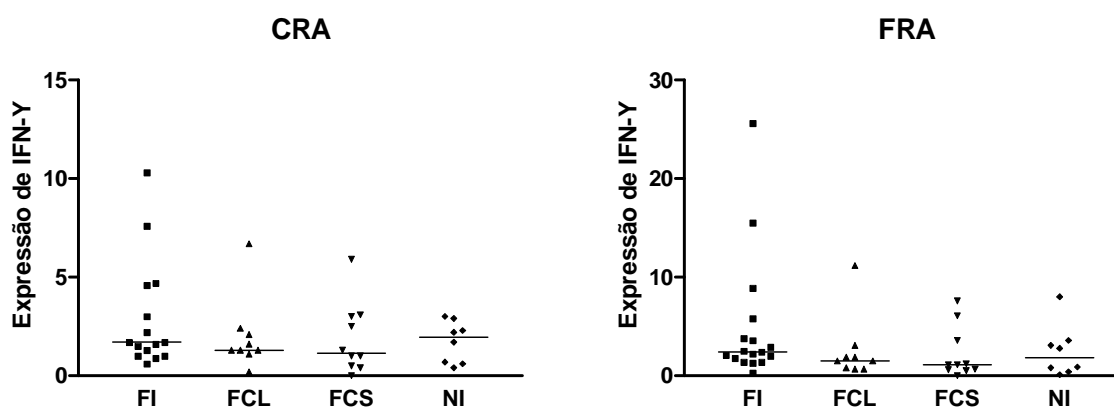


**Figura 9:** Curvas Padrão para obtenção dos valores de eficiência. Legenda: a) Curva padrão para o gene da  $\beta$ -actina; b) Curva padrão para o gene do IFN- $\gamma$ ; c) Curva padrão para o gene da IL-10.

Desta forma, isto nos permitiu concluir que os conjuntos de sondas e *primers* utilizados foram capazes de discriminar entre as diferentes concentrações do alvo que poderiam estar presentes na amostra. Além disso, por possuírem eficiências semelhantes, foi permitida a análise dos resultados a partir do método do  $\Delta\Delta CT$  comparativo, utilizando-se a tabela descrita por Pffafel et al. (2001), como forma de correção dos valores da amplificação de acordo com a eficiência obtida.

## 7.6 Avaliação da expressão gênica para IFN- $\gamma$ após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

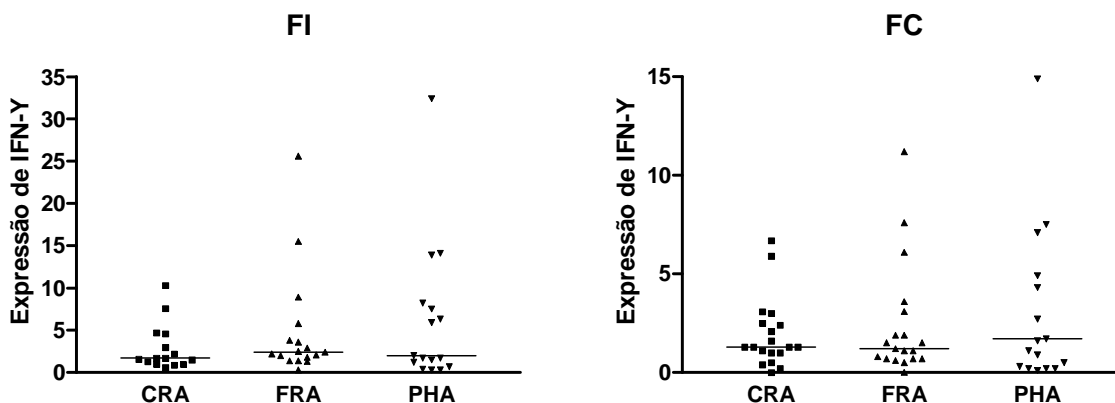
A avaliação das diferenças nos níveis de expressão gênica para a citocina IFN- $\gamma$  foi realizada após estimulação *in vitro* das células com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi* em relação às culturas sem estímulo. Contudo, uma distribuição homogênea foi observada em torno do valor da mediana de cada grupo, na expressão para IFN- $\gamma$  entre os grupos de indivíduos portadores da doença (FI, FCL e FCS) e dos indivíduos não infectados (NI), após estimulação com ambos Ag-Recs, não tendo sido evidenciada diferença estatística na expressão, por nenhum dos grupos avaliados (Figura 10).



**Figura 10:** Expressão gênica para IFN- $\gamma$  (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por indivíduos portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, após estímulo *in vitro* com os Ags-Rcs CRA e FRA de *T. cruzi*. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo.

## 7.7 Comparação da expressão gênica para IFN- $\gamma$ após diferentes estímulos antigênicos

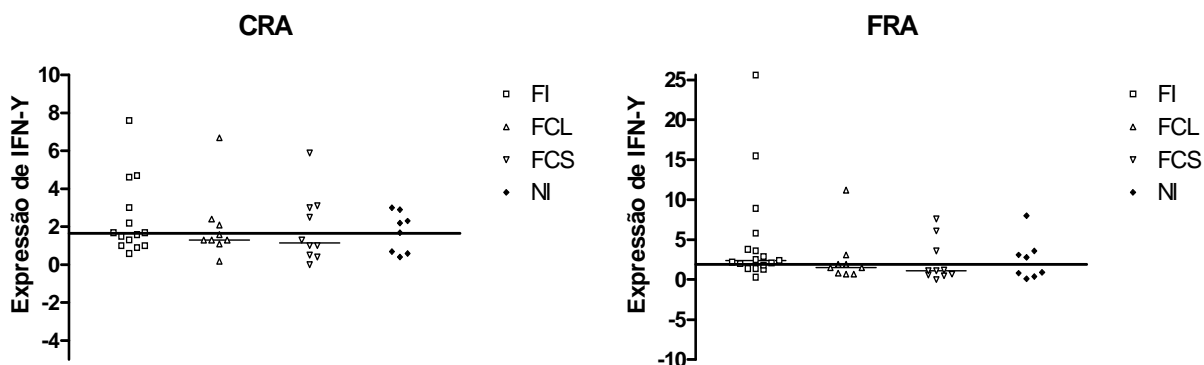
Após a avaliação de qual estímulo estaria induzindo maior ou menor expressão de IFN- $\gamma$  entre os grupos de indivíduos portadores da FI e FC da doença, não foi observada diferença estatística na expressão desta citocina entre os diferentes estímulos (Figura 11).



**Figura 11:** Expressão gênica para IFN- $\gamma$  (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por indivíduos portadores das formas FI e FC, após diferentes estímulos. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo.

### 7.8 Avaliação da frequência de altos e baixos padrões de expressão gênica para IFN- $\gamma$ após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Com o objetivo de detectar altos padrões de expressão gênica para IFN- $\gamma$ , foi obtido um cut-off correspondente à mediana dos valores de expressão de todos os grupos avaliados (FI, FCL, FCS e NI), e os indivíduos dispostos acima ou abaixo desse valor, de acordo com seus níveis de expressão para a IFN- $\gamma$ . Neste caso, quando realizada a análise da distribuição dos pacientes, foi observada uma elevada produção desta citocina, em sua maioria por indivíduos portadores da FI, quando da estimulação antigênica por ambos os Ags-Recs de *T. cruzi* (Figura 12).



**Figura 12:** Expressão gênica para IFN- $\gamma$  (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, com relação à mediana de expressão. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo. A barra horizontal maior, representa o cut-off que corresponde à mediana global de todos os grupos.

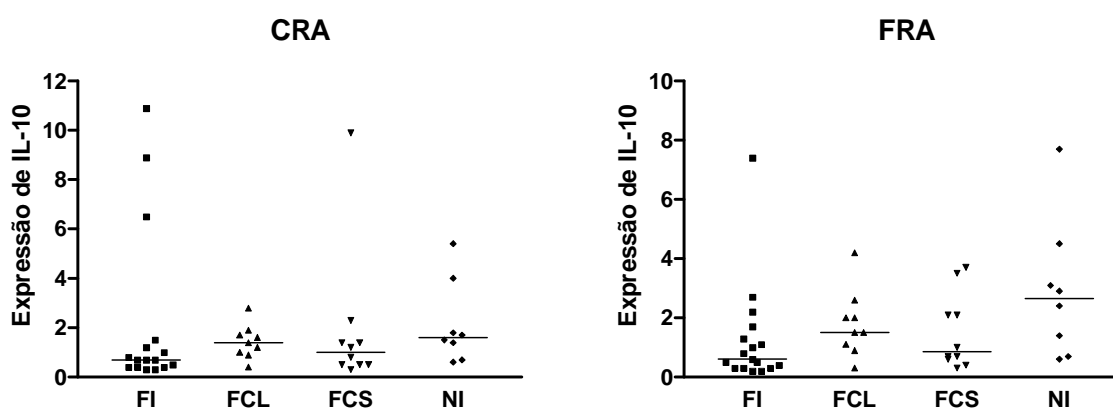
Este resultado também pôde ser evidenciado, quando realizada esta análise com relação às frequências obtidas, com os indivíduos portadores da FI com uma frequência de 58,8% e de 70,58%, após o estímulo com CRA e FRA respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Frequência de baixa e elevada expressão gênica para IFN- $\gamma$ , por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI.

Estímulo	Cut-off (mediana)	Elevada expressão de IFN- $\gamma$ (%)			
		FI	FCL	FCS	NI
CRA	1,65	58,8	33,3	40	62,5
FRA	1,9	70,58	44,4	30	50

### 7.9 Avaliação da expressão gênica para IL-10 após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Foi realizada a avaliação das diferenças nos níveis de expressão gênica para a citocina IL-10, após estimulação com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi* em relação às culturas sem estímulo. Contudo, apesar de observar uma distribuição mais homogênea na expressão para IL-10 entre os grupos de indivíduos portadores da doença (FI, FCL e FCS) e dos indivíduos não infectados (NI), após estimulação com o FRA, do que após a estimulação com o CRA, não foi observada diferença estatística na expressão, por nenhum dos grupos avaliados (Figura 13).

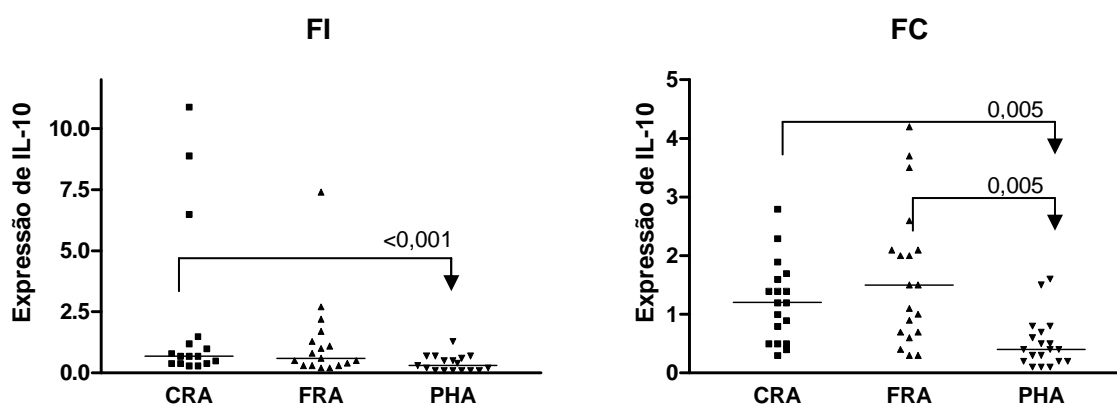


**Figura 13:** Expressão gênica para IL-10 (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, após estímulo *in vitro* com os Ags-Rcs CRA e FRA de *T. cruzi*. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo.



## 7.10 Comparação da expressão gênica para IL-10 após diferentes estímulos antigênicos

Após a avaliação de qual estímulo estaria induzindo a uma maior ou menor expressão de IL-10 nas formas clínicas FI e FC da doença, foi observado que apesar de ambos os indivíduos portadores da FI e da FC, terem expressado maiores níveis desta citocina após estímulo com os Ags-Recs em comparação à estimulação por PHA, não foi observada uma expressão diferencial desta citocina quando comparada a estimulação entre o CRA e o FRA (Figura 14).

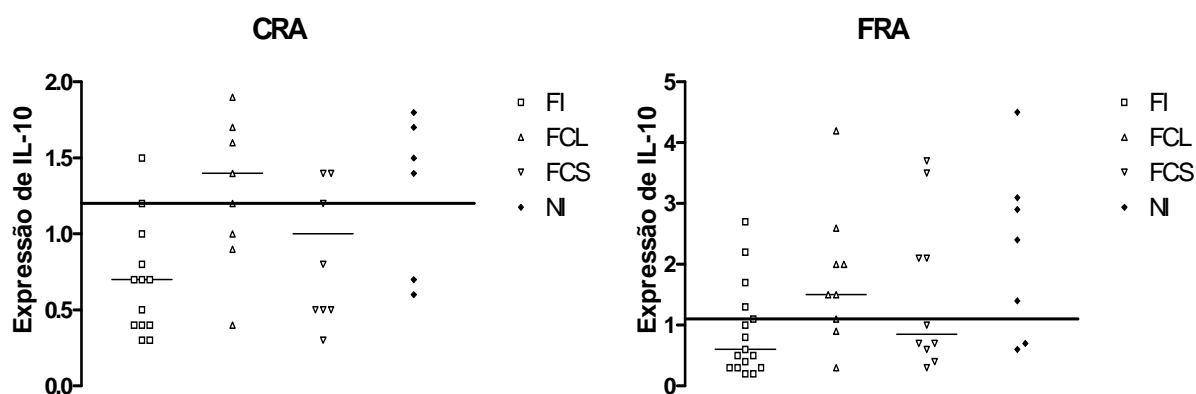


**Figura 14:** Expressão gênica para IL-10 (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por indivíduos portadores das formas FI e FC, após estímulo com os antígenos CRA, FRA e PHA. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo.

## 7.11 Avaliação da frequência de altos e baixos padrões de expressão gênica para IL-10 após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Da mesma forma que realizado para o IFN- $\gamma$ , foi obtido um cut-off correspondente à mediana dos valores de expressão para IL-10 de todos os grupos avaliados (FI, FCL, FCS e NI), e os indivíduos dispostos acima ou abaixo desse valor, de acordo com seus níveis de expressão para a IL-10. Assim, através desta

avaliação pode-se observar que a maioria dos portadores da FCL apresentou-se alto produtor de IL-10 após estimulação antigênica por ambos os Ags-Recs (Figura 15).



**Figura 15:** Expressão gênica para IL-10 (número de vezes em que o gene esteve mais expresso com relação ao controle sem estímulo), por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI, com relação à mediana de expressão. As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão dentro de cada grupo.

Este resultado também pôde ser evidenciado, quando realizada esta análise com relação às frequências obtidas, com os indivíduos portadores da FCL com uma frequência de 66,66% após o estímulo com CRA e de 77,77% após o estímulo com FRA (Tabela 2).

**Tabela 2:** Frequência de baixa e elevada expressão gênica para IL-10, por portadores das formas FI, FCL, FCS e por indivíduos NI.

Estímulo	Cut-off (mediana)	Elevada expressão de IL-10 (%)			
		FI	FCL	FCS	NI
CRA	1,2	29,4	66,6	50	75
FRA	1,1	35,29	77,77	40	75

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 Avaliação da expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

As diferentes apresentações clínicas observadas no curso da doença de Chagas crônica, além das variações observadas dentro de uma mesma forma clínica, sugerem que, independentemente da origem ou fonte dos antígenos que estimulam a resposta imune durante a infecção, o sistema imune do hospedeiro, particularmente a ação de subpopulações de células T bem como a sua produção de citocinas, exerça um papel central no desenvolvimento da patologia (DUTRA, et al., 2009). Desta forma, essas características imunológicas poderiam induzir o desenvolvimento de marcadores de prognóstico das formas clínicas severas. A utilização desses marcadores biológicos identificaria antecipadamente a evolução das formas clínicas da doença de Chagas, auxiliando no redirecionamento da conduta terapêutica pelos médicos (LORENA et al., 2010).

Neste contexto, foi observado que a resposta imune Th1 caracterizada pela produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  contribui para o controle dos níveis de parasitemia e aumento da sobrevivência de camundongos infectados por *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 1996; MARTINS, 1999). Por outro lado, as citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-10, são relatadas por sustentar o parasitismo e por tornar o camundongo mais susceptível à infecção pelo *T. cruzi* (REED et al., 1994; ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Contudo, a divisão dos aspectos protetores e lesivos no paradigma Th1 x Th2 nunca chegou a ser estabelecido na doença de Chagas humana. No entanto, não há dúvidas que as citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e seguramente estejam envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia da doença.

No presente estudo, foi avaliada a expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por portadores da doença de Chagas após estímulo com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*. Assim, observamos uma distribuição homogênea na expressão destas citocinas entre os grupos de indivíduos portadores das diferentes formas clínicas estudadas (FI, FCL e FCS) e entre os indivíduos não infectados (NI), o que não permitiu evidenciar diferenças estatísticas de expressão e a identificação de um

possível marcador de prognóstico. Além disso, não foi observado aumento ou diminuição diferencial na expressão gênica para as referidas citocinas com relação ao tipo de estímulo utilizado.

Os aspectos imunológicos para entender o porquê da evolução dos pacientes para as distintas formas clínicas da doença são explicados por duas teorias principais: a primeira postula que a persistência do *T. cruzi* nos órgãos afetados é a maior causa da patologia, e conseqüentemente dano tissular (JONES et al., 1993; VAGO et al., 1996; FUENMAYOR et al., 2005) e; a segunda postula que processos autoimunes têm importância fundamental para a destruição dos tecidos (KIERSZENBAUM, 2005; CUNHA-NETO et al., 2006; HYLAND; ENGMAN, 2006). Essas teorias podem estar associadas explicando a severidade das formas clínicas da doença.

Abordagens para a investigação de padrões de secreção de citocinas em PBMC de pacientes chagásicos têm sido realizadas utilizando antígenos complexos das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstraram que a IL-10 é a principal citocina secretada por pacientes portadores da FI. Já os pacientes chagásicos com doença cardíaca têm maiores níveis de IFN- $\gamma$  (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

Souza et al. (2004) quando expuseram células aderentes obtidas de PBMC a tripomastigotas vivos, observaram que monócitos de pacientes com a FI estão relacionados com a produção de IL-10, enquanto monócitos de pacientes com a FC expressam TNF- $\alpha$ . Assim, citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, poderiam estar envolvidas com a evolução da FC. Por outro lado, a IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da FI contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, os autores sugerem que pacientes portadores da FI, que são capazes de manter baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-10, poderiam não desenvolver a doença cardíaca.

Contudo, apesar de estudos indicarem a associação da FI com uma elevada produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e a FC por sua vez apresentando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , encontramos resultados semelhantes à outros estudos onde também não foi possível demonstrar uma correlação entre produção de citocinas de determinado

perfil e os sintomas clínicos encontrados na Doença de Chagas. (DUTRA et al. 1997; CUNHA et al, 2000; GOMES et al. 2003; ARAUJO et al. 2007; LORENA et al., 2008)

## **8.2 Avaliação da frequência de altos padrões de expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 após estímulo *in vitro* com CRA e FRA**

A categorização dos pacientes, com relação à produção de citocinas tem sido utilizada para avaliar aqueles indivíduos, que dentro do grupo, possuem altos níveis de produção de citocinas (GOMES et al., 2003; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Gomes et al. (2003), ao estudarem a produção de IFN- $\gamma$ , dividiram o grupo de pacientes com alterações cardíacas de acordo com a severidade da doença através de exames clínicos mais sensíveis. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação entre “altos” e “baixos” produtores de IFN- $\gamma$  e o estado clínico do paciente. Vitelli-Avellar et al. (2008), estabeleceram um *cut-off* obtido através de uma mediana global entre todos os indivíduos do estudo e desta forma foi possível segregar os “altos” e “baixos” produtores de citocinas.

No presente estudo, avaliamos os padrões de expressão gênica para os genes das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 com relação ao estabelecimento de um *cut-off* e identificação de altos valores de expressão. Apesar de não ter obtido diferenças estatisticamente significativas, observamos uma maior produção de IFN- $\gamma$ , em sua maioria por indivíduos portadores da FI com frequências de 58,8% e 70,58%, após o estímulo com CRA e FRA respectivamente. Já com relação à produção de IL-10, observamos que esta se deu principalmente por indivíduos portadores da FCL com frequências de 66,6% e 77,7% após o estímulo com CRA e FRA respectivamente.

O conceito mais atual sobre a evolução crônica da infecção pelo *T. cruzi* relaciona que, em resposta à permanência de parasitos em órgãos-alvo afetados, a resposta imune específica resulta em processo inflamatório exacerbado com consequentes efeitos deletérios para os tecidos (SATHLER-AVELAR et al., 2009).

Neste processo inflamatório, parece ser chave, a presença de altos níveis de IFN- $\gamma$  como uma deficiência na capacidade imunomodulatória exercida por citocinas como a IL-10. Contudo, este postulado parece paradoxal se for levado em

consideração que uma resposta anti-parasitária efetiva seria crítica para o controle da infecção e, conseqüentemente, impediria a progressão para as formas clínicas graves da doença (PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009).

Neste sentido, alguns estudos avaliaram a população de células T CD8+ e TCD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  em indivíduos portadores da doença de Chagas crônica estratificados em graus de acometimento cardíaco. Nestes trabalhos, foi observada uma correlação inversa entre a frequência de células T CD8+ e TCD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  e a severidade da doença (LAUCELLA, et al., 2004; ALBAREDA, et al., 2006).

Além disso, também foi observado um declínio gradual na expressão dos marcadores de superfície CD27+ e CD28+ com baixa expressão de CD57+ por estas células T CD8+ e TCD4+ produtoras de IFN- $\gamma$ , com relação ao maior acometimento clínico da doença. Isto sugere que a população de células T efetora na infecção crônica por *T. cruzi* se caracterizaria por uma alta proporção de células T recentemente recrutadas. Assim, com o tempo a população de células T de memória parasito-específicas, demonstraria sinais de senescência e perda de diferenciação acarretando a progressão para estágios de acometimento cardíaco mais severos (ALBAREDA, et al., 2009).

Desta forma, estes autores defendem que a persistência crônica do parasita nos tecidos acarretaria uma contínua estimulação antigênica, e levaria as populações de células T, de uma forma geral, à exaustão. Assim, o indivíduo começaria a exibir baixas frequências de células T CD8+ e T CD4+ parasito-específicas, o que iria predispor este paciente à progressão da doença, ou seja, a permanência do parasita nos tecidos poderia induzir a uma falha na resposta imune do hospedeiro em controlar a replicação parasitária levando ao aparecimento dos sintomas severos da doença. Além disso, a intensidade da infestação parasitária, que é influenciada por aspectos genéticos do parasita e pela resposta imune do hospedeiro, poderia determinar o nível de exaustão do sistema imunológico e até mesmo o nível de progressão da doença (LAUCELLA, et al., 2004; ALBAREDA, et al., 2006; ALBAREDA, et al., 2009).

Outro ponto chave se refere à noção de regulação no sistema imune, processo que parece estar envolvido com múltiplos componentes fundamentais para o bloqueio de eventuais danos que se seguiriam a uma resposta imune efetora. Contudo, a presença de citocinas de propriedades imuno-regulatórias como a IL-10

e o TGF- $\beta$ , no curso da infecção pelo *T. cruzi*, foi relacionada à maior suscetibilidade à infecção, possivelmente por exercerem papel inibitório às atividades de citocinas tripanocidas como o IFN- $\gamma$  (HALL;PEREIRA, 2000; WAGHABI, et al. 2002).

Ainda com relação à imunorregulação, além da produção de citocinas também vem sendo investigada a participação de subpopulações diretamente envolvidas em processos imuno-regulatórios de natureza supressora, como as células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e as células T regulatórias naturais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Neste sentido, Vitelli-Avelar et al. (2005) demonstraram que pacientes com a forma indeterminada apresentavam maior frequência de células NKT e de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> concomitante a níveis aumentados de células T CD4<sup>+</sup> ativadas e de células NK com alto potencial citotóxico. Importante salientar, que a menor frequência destas células potencialmente regulatórias em pacientes sintomáticos graves correlacionam com maior presença de células T CD8<sup>+</sup> ativadas.

Assim, mesmo com o sugestivo papel regulador de IL-10 nestes achados, visto que pacientes com a forma indeterminada apresentavam maior frequência de células IL-10<sup>+</sup> na subpopulação de células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FoxP3<sup>+</sup>, estudo recente em camundongos sugere que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> não tenham participação efetiva na imuno-regulação da resposta imune anti-*T. cruzi*, visto que depleção das mesmas não alterou o curso da infecção aguda ou crônica pelo parasito (MENEZES; TEIXEIRA; DUTRA, 2009).

Interessantemente, Vitelli-Avelar et al. (2008), após avaliar a produção de citocinas por diferentes populações celulares do sangue periférico de pacientes, observaram que após a estimulação *in vitro* com tripomastigotas de *T. cruzi*, o perfil das citocinas foi invertido com relação às culturas sem estímulo, ou seja, portadores da FC passaram a apresentar maior produção de citocinas do perfil regulatório, enquanto que os portadores da FI passaram a apresentar um perfil de citocinas predominantemente inflamatório. Esta resposta de células de pacientes não tratados, após a estimulação antigênica, poderia refletir a síntese de citocinas que ocorre durante o tratamento específico, já que é relatada uma produção de citocinas inflamatórias com a utilização do benzonidazol (SATHLER-AVELAR; VITELLI-AVELAR; MASSARA, 2008).

Além disso, estudo realizado em cobaias verificou que a cura após o tratamento com o benzonidazol foi obtida com o surgimento de uma população de células TCD8<sup>+</sup> parasito-específicas com características de células centrais de

memória (CD8+CD62L+CCR7+CD127+CD122+Bcl-2+), e que estas células se expandiam mais rapidamente do que as dos controles não tratados (BUSTAMANTE; BIXBY; TARLETON, 2008). Desta forma, apesar dos potenciais efeitos de exaustão celular após períodos prolongados de exposição antigênica observados em modelos de infecção crônica (BARBER et al. 2006; DAY et al. 2006), o desenvolvimento de cura após terapêutica estaria relacionado com o estabelecimento de uma proteção estável por células TCD8+ de memória antígeno-independentes.

Com relação aos resultados obtidos por nosso grupo acerca da resposta imune celular de pacientes chagásicos utilizando os antígenos CRA e FRA, foi observada, após detecção de citocinas por ELISA de captura em sobrenadante de cultura, significativa produção para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por indivíduos portadores da doença após estimulação pelo CRA (LORENA et al., 2008). Contudo, a baixa sensibilidade da técnica empregada poderia ter dificultado a identificação de diferenças na produção da citocinas e a consequente diferenciação das formas clínicas. Desta forma, Lorena et al. (2010) realizaram a avaliação da produção de citocinas por citometria de fluxo e observaram que indivíduos com a forma cardíaca severa da doença apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos por células CD8+ T em comparação com portadores das formas clínicas mais brandas, após estímulo com o CRA, indicando uma associação entre a severidade do dano cardíaco e altos níveis de citocinas inflamatórias. Neste estudo observamos a importância que a análise da produção de citocinas por populações celulares específicas representa para o entendimento do papel que um subtipo celular está exercendo no desenvolvimento e manutenção da resposta imune frente ao parasita. Contudo, como o desenvolvimento da patologia pode não estar relacionado apenas à função efetora de grupos celulares isolados e sim ao conjunto de todas as respostas que estão ocorrendo, a análise global da produção de citocinas representa uma importante abordagem no esclarecimento da resposta imune que está ocorrendo nestes pacientes.

Desta maneira, como no presente estudo encontramos uma maior frequência na expressão gênica para IFN- $\gamma$  por portadores da FI, concomitantemente à uma maior frequência na expressão gênica para IL-10 por portadores da FCL, apesar de não ter sido estatisticamente significativa, relacionamos, com base na literatura discutida que na FI se encontre uma resposta imune efetiva ao parasita não deixando que este se prolifere e que consequentemente o indivíduo permaneça sem



sintomas clínicos. Já na FCL poderia estar ocorrendo um déficit nesta resposta imune efetiva, tanto pela exaustão do sistema imune como pela indução da produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10, já que este é um dos mecanismos de escape que o parasita utiliza, promovendo uma baixa resposta imune específica e facilitando sua proliferação, que poderia estar levando este indivíduo a apresentar danos no tecido cardíaco. Contudo, se faz importante observar outras citocinas em um número maior de pacientes para se estabelecer o padrão inflamatório ou anti-inflamatório nestes grupos de indivíduos estudados.

Por fim, acreditamos que mecanismos imunológicos envolvidos na interação conjunta de células do sistema imune, além da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro, dêem origem a uma patologia altamente complexa, impondo dificuldades na detecção de uma resposta imune específica. Desta forma são necessários maiores estudos de seguimento destes indivíduos no sentido de melhor esclarecer este mecanismo imunopatológico e abrir horizontes voltados ao desenvolvimento de vacinas e imunoterapias eficientes para o tratamento da doença de Chagas.

## 9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluímos que através da avaliação da expressão gênica para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em indivíduos portadores de doença de Chagas, não foi possível diferenciar as formas clínicas crônicas de acordo com os distintos graus de acometimento clínico da doença. Assim, não identificamos um marcador de prognóstico que pudesse auxiliar nas condutas terapêuticas e melhoria no manejo destes pacientes.

Por outro lado, apesar de não evidenciarmos diferença estatística, observamos uma maior frequência de expressão gênica para IFN- $\gamma$  por pacientes portadores da forma indeterminada e uma maior frequência de expressão gênica para IL-10 por indivíduos portadores da forma cardíaca leve. Assim, acreditamos que são necessários mais estudos analisando um perfil maior de citocinas na busca de um melhor entendimento desta resposta imune que está ocorrendo.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi* : Il-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 84, p. 231-244, 1996.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada. N. 153, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. U., v., 15 jun 2004.
- ALBAREDA, M.C., et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. **International immunology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.
- ALBAREDA, M.C., et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4<sup>+</sup> T cells to immune senescence. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 183, n. 6, p. 4103-4108, 2009.
- ALIBERT, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 64, n. 5, p. 1961-1967, 1996.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 63, p. 721-726, 1985.
- ARAÚJO, F. F. et al. Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 12, p.2797-2806, 2007.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 31, p.127-135, 1998.
- BARBER, D. L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, Londres, v. 439, p. 682-687, 2006.
- BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 111, n. 1, p. 137-145, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, supl. 3, p.29. 2005

BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nature Medicine**, Londres, v. 14, p. 542-550, 2008.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p. 99-113, 1985.

CHAGAS, C. Tripanossomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.8, p. 37-60, 1916.

CHINI, V. et al. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 45, p. 479-484, 2007.

CLAYTON J. Chagas disease. **Nature**. Londres. v.465,p.S4–S5, 2010.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n.1, p. 253-255, 1999.

COSTA, A. S. et al. Enalaprilato na Prevenção da Hipertrofia Ventricular Esquerda Induzida pelo Isoproterenol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 69, n.1, p. 35-39, 1997.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.1, p. 31-40, 2009.

CUNA, W. R.; ENCINA, J. L. R.; CUNA, C. R. Interferon- $\gamma$  or IL-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n.2, p.295-299, 2000.

CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart

disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, Londres, v. 39, p. 41-54, 2006.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells associated with T cell exhaustion and disease progression. **Nature**, Londres, v. 443, p. 350-354, 2006.

DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.43, p.88-93, 1996.

DUTRA, W. O. et al. Cytokine mRNA Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 45, p. 74-80, 1997.

DUTRA, W. O. et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 51, p. 91-97, 2000.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Londres, v. 21, p. 287–292, 2008.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol.104, n.1, p. 208-218, 2009.

FONSECA, S.G. et al. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8<sup>+</sup> T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 63, n. 2-3, p. 362-71, 2007.

FUENMAYOR, C. et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. **Acta Cardiologica**, Leuven, v. 60, p. 33-67, 2005.

GADELHA, A. A. M. et al. Chagas's Disease Diagnosticis: Comparative Analysis of Recombinant ELISA with Convencional ELISA and Hemagglutination Test. **Vox Sanguinis**, Oxford, v.85, p.165-170, 2003.

GIRONES, N., et al. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease, **Current topics in microbiology and immunology**, Berlin, v. 296, p. 89–123, 2005.

GOLDENBERG, S. et al. Use of Trypanosoma cruzi antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Butantan**, Rio de Janeiro, v. 53, n.1, p. 71-76, 1991

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.

GOMES, J. A. S. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 12, p. 7960-7966, 2005.

GOMES, Y. M. PCR and serodiagnosis in chronic Chagas' disease: biotechnological advances. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.66, p. 107-119, 1997.

GOMES, Y. M. et al. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 497-501, 2001.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v.31, n.11, p. 673–685, 2009.

HALL, B. S.; PEREIRA, M. A. Dual Role for Transforming Growth Factor b Dependent Signaling in *Trypanosoma cruzi* Infection of Mammalian Cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 68, n. 4, p. 2077–2081, 2000.

HUGGINGS, W. D. Quadro Clínico: Fase Aguda. In: MALTA, J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Ed. Savier, 1996, p. 39-42.

HYLAND, K. V.; ENGMAN, D. M. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. **Trends Parasitology**, Londres, v. 22, p. 101-102, 2006.

JANN, B.; RESKE, K.; JANN, K. Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 60, n.1, p. 239-246, 1975.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human Chagas cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v. 48, n. 4, p. 348-357, 1993.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the immunity hypothesis of Chagas disease? **Trends Parasitology**, Londres, v. 21, p. 513-516, 2005.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.128 n. 5, p. 2009-2012, 1982.

KRIGGER, M. A. et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n.4, p. 427-434, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAFAILLE, J.J. et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, p. 127-136, 1989.

LAUCELLA, S. A. et al. Frequency of interferon- $\gamma$ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n.5, p.909-918, 2004.

LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clinical and experimental immunology**, England, v.85, p.413-417, 1991.

LORCA, M. et al. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, 1992.

LORENA, V. M. B. et al. Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinante antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Jornal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 21, p.1-8, 2008.

LORENA, V. M. B. **Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2009. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

LORENA, V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 72, n. 6, p. 529-39, 2010.

MARTINS, G. A. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 3, p.3864-3871, 1999.

MENEZES, C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v. 137, n. 1, p. 129-138, 2004.

MENEZES C. A. S.; TEIXEIRA M. M.; DUTRA W. O. **A resposta imunológica dos pacientes chagásicos**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>>. Acesso em: 20 maio 2010.

MOCELLIN, S. et al. Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment. **Journal of Immunological Methods**. Netherlands, v. 280, p.1-11, 2003.

MONTALVÃO, F. Apoptotic lymphocytes treated with IgG from *Trypanosoma cruzi* infection increase TNF- $\alpha$  secretion and reduce parasite replication in macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.40, n.2,p.417–425, 2010.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 117, n.2, p. 307-310, 1981.



OLIVEIRA JR. L. C. B. et al. Antigen-specific IL-4 and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase *in vivo* susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, New York, v. 170, p. 41-53, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)** - Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/chagas/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/)> [Acesso em 02/03/2010]

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 21, p. 385-390, 2009.

PEREIRA, V. R. A. et al. Cytokine Production Profiles to T. cruzi Recombinant Antigens CRA and FRA by Cultured Chagasic Patients Leukocytes. In: XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e VI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2002, Uberaba. **Resumos...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 27, 2002.

PEREIRA, V. R. A. et al. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, Londres, v. 129, n. 5, p. 563-570, 2004.

PEREIRA, V. R. A. et al. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Estados Unidos, v. 96, n. 3, p. 154-161, 2005.

PETHERICK, A. Chagas disease. **Nature outlook**, London. s. 10-11. 2010.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v45, n. 9, p. 1-29, 2001.

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, Oslo, v. 153, p. 3135-3140, 1994.

REIS, D. D. et al. Characterization of Inflammatory Infiltrates in Chronic Chagasic Myocardial Lesions: Presence of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ <sup>+</sup> Cells and Dominance of Granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 637-644, 1993.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.31, n.3, p.301-14, 1998.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and infection**, France, v. 10, p. 103-113, 2008.

SATHLER-AVELAR, R. et al. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v.104, n.1, p. 246-251, 2009.

SILVA C. P. et al. Por que os portadores de cardiomiopatia chagásica têm pior evolução que os não-chagásicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v.91, n. 6, p. 389-394, 2008.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

VAGO, A. R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. **Lancet**, Londres, v. 348, p. 891-892, 1996.

VERÇOSA, A. F. A. et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 21, p. 271-276, 2007.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 68, p. 516-525, 2008.

WAGHABI, M. C. et al. Increased *Trypanosoma cruzi* Invasion and Heart Fibrosis Associated with High Transforming Growth Factor  $\beta$  Levels in Mice Deficient in  $\alpha_2$ -Macroglobulin. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 9, p. 5115–5123, 2002.

WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, Weinheim, v.4, p.1120-1128, 2003.

## Apêndice A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

**Título de projeto:** Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *trypanosoma cruzi*

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, residente na \_\_\_\_\_, bairro \_\_\_\_\_, município \_\_\_\_\_, estado \_\_\_\_, usuário do telefone ( ) \_\_\_\_\_, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar células da imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado que como portador da doença de Chagas terei três colheres de chá de meu sangue (15ml) coletadas através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20C. Também fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se tais substâncias funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença, será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

_____	Data: ___/___/___
Assinatura do Paciente	
_____	Data: ___/___/___
Testemunha	
_____	Data: ___/___/___
Assinatura do responsável pelo projeto	

Responsável pelo projeto:

Yara de Miranda Gomes

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566/ 9965-1663

Médica responsável:

Dra Maria da Glória de Melo

Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz

Telefone para contato: 2101-1441/ 9976-5398

## Apêndice B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O VOLUNTÁRIO CONTROLE

**Título de projeto:** Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulo com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *trypanosoma cruzi*

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, residente na \_\_\_\_\_, bairro \_\_\_\_\_, município \_\_\_\_\_, estado \_\_\_\_, usuário do telefone ( ) \_\_\_\_\_, aceito participar desse estudo, cujo objetivo analisar células da imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado que como portador da doença de Chagas terei três colheres de chá de meu sangue (15ml) coletadas através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20C. Também fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se tais substâncias funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença, será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário controle

Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo projeto

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Responsável pelo projeto:

Yara de Miranda Gomes

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566/ 9965-1663

Médica responsável:

Dra Maria da Glória de Melo

Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz

Telefone para contato: 2101-1441/ 9976-5398

## Apêndice C

## Artigo Publicado

REVISTA BRASILEIRA  
DE HEMATOLOGIA  
E HEMOTERAPIA

Artigo /Article

**A comparative analysis of the suitability of different peripheral blood samples for reverse transcriptase polymerase chain reaction****Análise comparativa da adequação de diferentes amostras de sangue periférico em ensaios de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa**

Adriene Siqueira de Melo<sup>1</sup>  
Virginia Maria Barros de Lorena<sup>1</sup>  
Suellen Carvalho de Moura Braz<sup>1</sup>  
Yara de Miranda Gomes<sup>1</sup>

Venipuncture is one of the easiest clinical procedures to obtain viable blood samples to evaluate gene expression using mRNA analysis. However, the use of this sample type in reverse transcriptase polymerase chain reaction tests (RT-PCR) without prior treatment is controversial. We therefore propose to compare the suitability of different peripheral blood samples (whole blood without treatment, whole blood with hemolysis, peripheral blood mononuclear cells and frozen whole blood) for RT-PCR analysis. The results showed that, despite the blood sample being peripheral, it is possible to extract a fair amount of RNA and perform target gene amplification. Thus, peripheral blood without prior treatment could be used to investigate the gene expression using Real Time PCR.

**Keywords:** Blood specimen collection/methods; Gene expression; RNA, messenger/ blood; Transcription, genetic/immunology; Reverse transcriptase polymerase chain reaction/methods; Spectrophotometers

**Introduction**

Evaluation of the gene expression by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tests has been widely used in scientific research. However, the kind of samples and the reagents used in the protocols of RNA extraction may contain substances which inhibit the reaction.

Collecting blood through venipuncture is a simple clinical procedure to obtain a viable blood sample for the evaluation of gene expression by mRNA detection. Nevertheless, some studies claim that such samples contain PCR inhibitors, and that it is therefore first necessary to perform a procedure to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC).<sup>(1)</sup> Another option would be to conduct blood hemolysis prior to RNA extraction.<sup>(2)</sup> Blood also contains high levels of RNases, which are the primary

cause of RNA sample degradation. This degradation occurs if the quality of the employed procedures is not controlled rigorously.<sup>(3)</sup>

In view of the doubts that have been cast on the use of whole blood without previous treatment for these molecular tests, the aim of the present report is to compare the suitability of different peripheral blood samples for RT-PCR analysis.

**Methods**

Ten volunteers were selected from the Immunoparasitology Laboratory of the Immunology Department at the Aggeu Magalhães Research Center/Fiocruz (CPqAM/Fiocruz) and from the Hospital Universitário de Pernambuco (UPE), both situated in the city of Recife, State of Pernambuco, Brazil. The study was approved by the Research

<sup>1</sup>Immunoparasitology Laboratory of the Immunology Department at the Aggeu Magalhães Research Center/Fiocruz (CPqAM/Fiocruz) and from the Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco – UPE – Recife (PE), Brazil.

Conflict of interest: none

**Correspondence:** Yara de Miranda Gomes  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária  
50670-420 – Recife (PE), Brasil  
Tel.: (55 81) 2101-2559; Fax: (55 81) 2101-2674  
E-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Ethics Committee of CPqAM/Fiocruz (Nº. 032009). The participants were informed about the nature of the research, its objectives and methods and all participants signed written consent forms.

Peripheral blood was collected using the vacuum system (Vacutainer®) in 10 ml tubes containing heparin. In order to evaluate the viability of stored frozen whole blood, the samples of individuals from the Huoc-Upe were, after culturing, stored in Trizol at -20°C for 6 months, whereas the other samples were immediately processed for PBMC and whole blood cultures with or without hemolysis.

The cells were cultured as follows: i) For whole blood, heparinized blood was diluted 1:2 in an RPMI 1640 medium (Sigma) SBF (10%) and incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. For samples processed immediately, cultures were performed in duplicate for subsequent hemolysis in one of the tubes. ii) In the case of PBMC, separation was performed in accordance with the protocol developed by Lorena et al.<sup>(4)</sup> A 10<sup>6</sup> cells/ml concentration was placed in culture tubes in a 1 ml final volume of medium. The tubes were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> environment and cultured at 37°C for 24 hours.

Hemolysis was performed by adding 8 ml of lysing solution (2.85% sodium citrate, 30% diethylene glycol, 54% of 37% formaldehyde, 0.04% of USP 100,000 heparin) to culture tubes previously set aside for this purpose. The tubes were incubated for 8 minutes in the dark until the solution was translucent. After this period, filtered PBS was added. Then, the solution was centrifuged at 460 x g for 10 minutes and the supernatant removed with a vacuum pump.

Total RNA isolation was performed using the Trizol reagent (Invitrogen®) according to the manufacturer's instructions. After extraction, samples were re-suspended in Rnase-Free Water (Invitrogen®, Carlsbad CA). Quantification was carried out using a spectrophotometer (Pharmacia Biotech) following the manufacturer's instructions. For the subsequent amplification tests, the sample group (whole blood without treatment, whole blood with hemolysis, PBMC and frozen whole blood) which showed the highest ratio was chosen. The normalization of concentrations was carried out at a 30 µg/ml final concentration. The integrity of the extracted RNA was evaluated by 1.2% agarose denaturing electrophoresis with visualization using ethidium bromide stain. The gel was analyzed in a photo documentation system (Gel Logic 100, Imaging System).

For the reverse transcription reaction, tubes with a 13 µL mixture containing 4 µL (500ng) total RNA, 1 µL Oligo dT primer (50 µM), 1 µL dNTP (10 mM), and 7 µL Rnase-free water, were placed in a dry bath for 5 min at 65°C followed by 1 min in an ice bath. As a second step, 7 µL of sample mix was added to each tube (5X RT buffer [250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>], DTT [0.1 M]; RNase inhibitor [40 U/µL]; MMLV reverse transcriptase enzyme [50 U/µL]) (Applied Biosystems®) to a final volume of 20 µL per reaction.

Samples were incubated at 50°C for 1 hour followed by 70°C for 15 min, whereupon they were re-suspended in 80 µL Rnase-free water. A negative control without sample and a reaction control without enzyme were also used. In order to compare the "in-house" protocol with a commercial kit, the samples were submitted to reverse transcription using the SuperScript III First-Strand Synthesis System kit for RT-PCR (Invitrogen®) following the manufacturer's instructions.

The samples were evaluated using conventional PCR with the human β-globin gene as the target. A 48 µL sample mix was thus used ([1.5 mM TBMG], [20 pmol] forward primer and [20 pmol] reverse; [200 mM] dNTP; [5U/µL] Recombinant Taq DNA polymerase; miliq water) and 2 µL of each cDNA sample. Amplification was performed in a Mastercycler gradient thermocycler apparatus (Eppendorf®). The first stage transcript was performed at 94°C for 30 seconds, followed by heating to 55°C for 30 seconds, one denaturation cycle at 55°C for 60 seconds, annealing at 72°C for 30 seconds, extension at 72°C for 90 seconds followed by 35 consecutive cycles of denaturation, annealing and extension at 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds respectively, and with a hold temperature of 20°C. To observe the specific band of the β-globin gene, 2% agarose gel electrophoresis was performed with visualization by ethidium bromide stain. Gel analysis was carried out using a photo documentation system (Gel Logic 100 Imaging System).

## Results

Spectrophotometer RNA analysis showed that it was possible to obtain a good degree of nucleic acid purity (ratio between 1.8 and 2.0) in adequate amounts (concentrations between 30 µg/ml and 304 µg/ml) for all the sample types (whole blood without treatment, whole blood with hemolysis, PBMC and frozen whole blood).

With regards to the quality of RNA, the electrophoretic profiles indicated that the RNA was intact without any degradation in all samples (Figure 1), which suggests that the RNA was not subjected to the action of RNase in the samples and/or in the materials used.

Analysis of the adequacy of samples for RT-PCR using β-globin gene amplification showed the 110pb target for all sample types and protocols employed in reverse transcription (Figure 2).

## Discussion

Historically, the assessment of the integrity of RNA has been performed using agarose gel with ethidium bromide stain. Typically, these gels show two ribosomal RNA (rRNA) bands of 28S and 18S. In this kind of analysis, the quality of the RNA is considered good when the 28S/18S ratio is equal

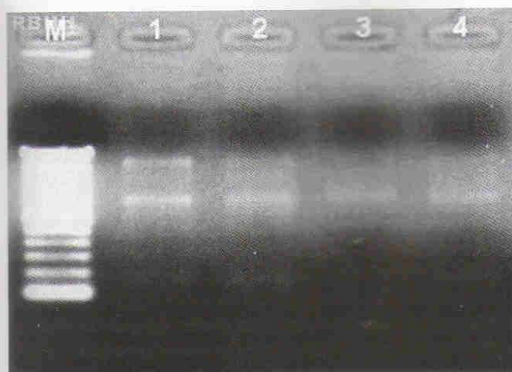


Figure 1. Relationship between 28S/18S ribosomal RNA bands using 1.2% denaturing agarose gel. Electrophoretic profile descriptions: (M): Molecular Weight - (1): whole blood with hemolysis (2): whole blood without treatment (3): PBMC (4): whole blood kept frozen for 6 months.

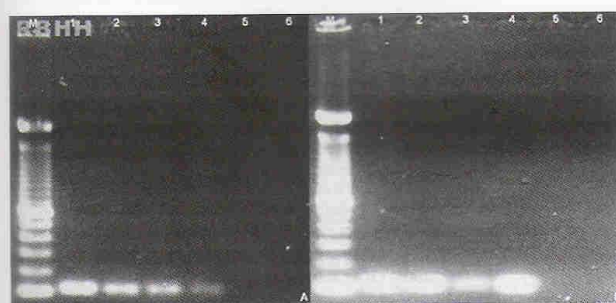


Figure 2. 2% Agarose gel showing the amplified product of 110bp of  $\beta$ -globin gene. A) Reverse transcription performed using a Kit (Invitrogen). B) Reverse transcription performed using an "in house" protocol. Electrophoretic profile descriptions: (M): Molecular Weight, (1): whole blood with hemolysis (2): whole blood without treatment (3): PBMC (4): whole blood kept frozen for 6 months (5): negative control: without sample (6): reaction control: without enzyme

to or greater than 2.<sup>(5)</sup> However, this interpretation appears to be subjective and difficult to reproduce, since this ratio is rarely found in literature, especially in cases of RNA derived from clinical samples, where the relationship between the electrophoretic pattern found for the rRNA and the integrity of mRNA has not been fully clarified.<sup>(6)</sup> Therefore, in the absence of more sophisticated and accurate methods to establish the integrity of RNA, such as the 2100 bioanalyzer system for correct discrimination of DNA, RNA and protein, the electrophoretic profile evaluation should be performed to determine the banding pattern and the 28S/18S ratio for each experiment.<sup>(7)</sup> As found in our results, it is acceptable that even with a low ribosomal RNA ratio, the RNA is of good quality, especially if no degradation products are observed in the electrophoresis.<sup>(8)</sup>

Most traditional methods of RNA extraction, such as extraction by phenol chloroform or the use of Trizol, are known to potentially act as PCR inhibitors, which might increase the margin of error of the reaction.<sup>(9)</sup> In the present study, RNA extraction using the Trizol reagent was satisfactory to produce RNA in an appropriate quantity and of an appropriate integrity for further analysis. However, the variation in the RNA concentration observed in this study is certainly not related to the extraction method, because another study which compared three different methods to extract RNA from resins found that similar results were obtained, regardless of the method used.<sup>(10)</sup>

Furthermore, a study conducted by some authors<sup>(11)</sup>, which compared different protocols to extract RNA from paraffin-embedded samples, found that the cost-benefit remained constant for all of the principal methods available. This means that these traditional methods are cheaper than commercially available kits which employ more expensive advanced technology. This result was also reported by another authors,<sup>(12)</sup> who stated that the quantity and quality are factors which are independent of the RNA extraction method.

Regarding the implementation of RT-PCR by  $\beta$ -globin gene amplification, our results show that when the extraction and purification of RNA are carried out in an appropriate manner, the choice of sample type and protocol depend only on cost-effectiveness. In the case of the samples frozen for six months, the banding pattern was more subtle than the others. This indicates increased degradation of RNA in samples that are kept frozen for long periods of time.

As for the use of peripheral blood samples in studies to evaluate gene expression using PCR, some authors rule out the use of this kind of sample without prior treatment due to the high levels of RNase and PCR inhibitors, such as heme, immunoglobulin G and lactoferrin.<sup>(13,14)</sup>

Additionally, blood samples collected using the anticoagulant heparin present an additional problem, because this drug also appears to be a strong inhibitor of PCR.<sup>(15)</sup>

Unlike the aforementioned studies, this report observed target amplification irrespective of the sample type, the presence of the anticoagulant heparin or the type of protocol used for RNA extraction or reverse transcription. In view of this, whole blood without prior treatment would appear to be a viable sample for this purpose. This is of great importance because even a few minutes after blood sample collection, the gene expression profile of cells changes significantly as a result of transcription induction and transcript degradation, in such a way that it is almost certain that purification processes, such as PBMC separation, introduce further changes in gene expression.<sup>(2)</sup>



## Conclusion

The results presented in this report demonstrate that, irrespective of the sample type used, it was possible to extract RNA of an acceptable quality and in an acceptable quantity for RT-PCR testing and subsequent amplification of target genes. Peripheral blood without prior treatment is more practical for laboratory testing and could be used in tests that quantitatively assess gene expression, such as Real Time PCR.

## Resumo

A punção venosa representa um dos procedimentos clínicos mais simples na obtenção de amostras de sangue periférico e avaliação da expressão gênica através da análise do RNA mensageiro. Contudo, a utilização desta amostra, sem um tratamento prévio, em ensaios de Transcrição Reversa (RT-PCR) é controverso. Desta forma, propomos comparar a adequação de diferentes amostras de sangue periférico (sangue total sem tratamento, sangue total após hemólise, células mononucleares do sangue periférico e sangue total congelado) em ensaios de Transcrição Reversa. Os resultados mostraram que independente da amostra de sangue periférico é possível extrair RNA em quantidade adequada e realizar a amplificação do gene alvo. Desta forma, o sangue periférico sem tratamento prévio pode ser utilizado em abordagens que envolvam a avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

**Descritores:** Coleta de amostras sanguíneas/métodos; Expressão gênica; RNA mensageiro/sangue; Transcrição genética/imunologia; Reação em cadeia da polimerase da transcriptase inversa/métodos; Espectrofotômetros

## Acknowledgments

We would like to thank the team of Dr. Milton Ozorio Moraes (Leprosy Laboratory - IOC/Fiocruz) for scientific support. We are also grateful to Ana Karine Soares and Andrea Moraes for technical assistance.

**Financial support:** This report received support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Y. M. Gomes is in receipt of a CNPq (Nº 306427/2006-0) research fellowship. VMB Lorena received a CNPq PhD scholarship for the duration of the study. AS Melo and SCM Braz are in receipt of a CAPES (06407432421) and CNPq (Nº 133106/2009-8) MSc scholarship, respectively.

## References

- Pilz D, Alfieri AF, Alfieri AA. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. *Semina: Ciências Agrárias*. 2005;26(2):219-28.
- Asare AL, Kolchinsky SA, Gao Z, Wang R, Raddassi K, Bourcier K, et al. Differential gene expression profiles are dependent upon

method of peripheral blood collection and RNA isolation. *BMC Genomics*. 2008;9:474.

- Fleige S, Pfaffli MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):126-39.
- Lorena VMB, Verçosa AF, Machado RC, Moitinho-Silva L, Cavalcanti MGA, Silva ED, et al. Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal*. 2008;22(2):91-8.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSH Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbour; 2001
- Monstein HJ, Nylander AG, Chen D. RNA extraction from gastrointestinal tract and pancreas by a modified Chomczynski and Sacchi method. *Biotechniques*. 1995;19(3):340-4.
- Marx V. RNA quality: defining the good, the bad, the ugly [Internet]. *Genomics & Proteomics*. [about 8 p.] [cited 2010 Jun 21]. Available from: [http://www.dnaarrays.org/P\\_GenProMag.pdf](http://www.dnaarrays.org/P_GenProMag.pdf)
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Toward standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(6):e56.
- Barea JA, Pardini MIM, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(4):274-81.
- Ribeiro-Silva A, Garcia SB. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(2):123-30.
- Vincek V, Nassiri M, Block N, Welsh CF, Nadji M, Morales AR. Methodology for preservation of high molecular-weight RNA in paraffin-embedded tissue: application for laser-capture microdissection. *Diagn Mol Pathol*. 2005;14(3):127-33.
- Chung JY, Braunschweig T, Hewitt SM. Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(4):229-36.
- Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):485-93.
- Perch-Nielsen IR, Bang DD, Poulsen CR, El-Ali J, Wolff A. Removal of PCR inhibitors using dielectrophoresis as a selective filter in a microsystem. *Lab Chip*. 2003;3(3):212-6.
- Glaum MC, Wang Y, Raible DG, Schulman ES. Degranulation influences heparin-associated inhibition of RT-PCR in human lung mast cells. *Clin Exp Allergy*. 2008;31(10):1631-5.

Received: 15/5/2010

Accepted: 7/7/2010

**Anexo A****Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CPqAM/Fiocruz/PE**

Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** Avaliação da síntese de citocinas em pacientes chagásicos após estímulos com os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*.

**Pesquisador responsável:** Yara de Miranda Gomes

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 21/01/2009

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 03/09

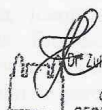
**Registro no CAAE:** 0002.0.095.000-09

**PARECER Nº 03/2009**

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de fevereiro de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 04 fevereiro de 2009.

  
Dr. Zulma Maria de Medeiros  
Biomédica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

**Observação:****Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 04/02/2010.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

  
Centro de Pesquisas  
AGGEU  
MAGALHÃES

  
FIOCRUZ  
Ministério da Saúde