

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

Suellen Carvalho de Moura Braz

Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica  
de portadores crônicos da doença de Chagas

RECIFE  
2015

SUELLEN CARVALHO DE MOURA BRAZ

**Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica  
de portadores crônicos da doença de Chagas**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como etapa obrigatória para obtenção do título de doutor em Ciências.

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

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2015

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

---

- B827i Braz, Suellen Carvalho de Moura.  
Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas / Suellen Carvalho de Moura Braz. - Recife: s.n, 2015.  
152, ilus, 30 cm.  
Tese (doutorado em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.  
Orientadoras: Yara de Miranda Gomes, Virginia Maria Barros de Lorena.
1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Doença de Chagas - quimioterapia. 3. Sistema imune. 4. Tripanossomicidas - uso terapêutico. 5. Nitroimidazóis - uso terapêutico. 6. Doença crônica. 7. Humanos. 8. Adultos. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

---

CDU 616.937

SUELLEN CARVALHO DE MOURA BRAZ

**Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como etapa obrigatória para obtenção do título de doutor em Ciências.

Data da aprovação: 03 de março de 2015

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Yara de Miranda Gomes (Orientadora)  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Zulma Maria de Medeiros (Membro Interno)  
Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Joelma Rodrigues de Souza (Membro Externo)  
Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba

---

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Membro Externo)  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

Dra. Vláudia Maria de Assis Costa (Membro Externo)  
Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Pernambuco

A meus pais que me propiciaram acesso ao conhecimento e que tanto me ensinaram sobre a vida.

Aos pacientes do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Senhor de todas as coisas, por trazer esperança nos momentos mais difíceis. Só tenho a agradecer por todas as dádivas concedidas.

Aos meus familiares, alicerce de minha vida, em especial aos meus pais Anacleto e Izabel. Só agradecer não basta ao amor, carinho e dedicação com que conduzem nossa família.

A Dra Yara Gomes e Virginia pela orientação durante o doutorado.

A todos os alunos do Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP), vocês moram no meu coração.

Aos colegas de doutorado, em especial ao meu amigo Júnior (mala).

Aos demais amigos que fiz na CPqAM/Fiocruz e que tanto colaboraram para a conclusão desta etapa profissional.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz) por disponibilizar a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto.

A equipe do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE pela colaboração na seleção dos pacientes.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

“...A certeza sempre me pareceu ignorância. Só os incultos têm tanta certeza. Ou melhor, os semicultos. Exatamente. Aqueles que sabem muito pouco e, do pouco que sabem, julgam que sabem muito. Saber muito é outra coisa. É saber que não se sabe. Humildade. Das margens não se é possível conhecer o rio, ainda mais a noite.”

Gabriel Chalita

BRAZ, Suellen Carvalho de Moura. Investigação do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas. 2015. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

Existem indícios de que o benzonidazol interfere diretamente nos padrões imunológicos do hospedeiro tratados na fase crônica da doença de Chagas. Contudo, ainda não foi realizado estudo longitudinal com portadores crônicos assintomáticos e sintomáticos submetidos ao tratamento etiológico onde fossem avaliados parâmetros imunológicos relacionados à ativação, citotoxicidade, regulação e inflamação celular de forma simultânea. Diante disto, nos propomos a investigar a resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol. Foram selecionados vinte e um adultos classificados na fase crônica da doença de Chagas (forma indeterminada-IND=13/ forma cardíaca-CARD=8). Amostras de sangue foram coletadas antes do tratamento etiológico (T0/n=21), após 2-3 meses (T1/n=21) e 5-6 meses (T2/n=16), sendo avaliadas por citometria de fluxo. Observamos um aumento de linfócito B1 CD5+CD19+, bem como uma maior ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CD28+), indicando que o benzonidazol exacerbou mecanismos celulares relacionados à eliminação do *Trypanosoma cruzi*. Contudo, houve redução em todos os indivíduos de linfócitos T e B produtores de IFN- $\gamma$ +. Tais fenômenos, associados ao baixo percentual de linfócitos T CD4+CD25+/highFoxP3+, demonstram perda de mecanismos de combate ao parasita e de controle da resposta inflamatória. Porém, ressaltamos que o surgimento de um padrão de citocinas Th1 modulado (inflamatória: IFN- $\gamma$ / regulatórias: IL-4, IL-6, IL-10) de forma tardia (T2) no grupo IND+CARD pode indicar que, após um inicial desequilíbrio imune, o organismo do hospedeiro estaria migrando para uma imunomodulação. Desta forma, o benzonidazol causou um desequilíbrio de diferentes mecanismos relacionados à resposta imune na doença de Chagas crônica. Porém, apenas o acompanhamento por um maior intervalo de tempo possibilitará concluirmos se estes fenômenos são definitivos ou se são consequência dos elevados níveis antigênicos e medicamentosos no organismo do hospedeiro.

Palavras chaves: Doença de Chagas, sistema imunológico, quimioterapia



BRAZ, Suellen Carvalho de Moura. Investigation of benznidazole treatment on immune response of chronic carriers of Chagas disease. 2015. Thesis (Doctor Degree in Public Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2015.

#### ABSTRACT

Evidence suggests that benznidazole treatment directly interferes with the host immune response in the chronic phase of Chagas disease. However, a longitudinal study to simultaneously evaluate immune parameters related to activation, cytotoxicity, cell regulation and inflammation of these chronic patients submitted to etiological treatment has never been performed. Therefore, the present study aimed to evaluate immune response in individuals with chronic Chagas disease before and after benznidazole treatment. Were selected twenty-one adults classified in the chronic phase of Chagas disease (indeterminate form-IND=13/ cardiac form-CARD=8). Blood samples were collected before etiological treatment (T0 / n = 21) and after 2-3 months (T1/n=21) and 5-6 months (T2/n=16), being analyzed by flow cytometry. Increase in CD5+CD19+ B1 lymphocyte, as well as greater activation of cytotoxic T CD8+ cells (CD28+), indicate that benznidazole exacerbates cellular mechanisms related to *Trypanosoma cruzi* elimination. On the other hand, there was a reduction in IFN- $\gamma$  production by T and B lymphocytes in all individuals. These phenomena associated with low percentage of CD4+CD25+/highFoxP3+ T lymphocyte, showing a loss of the mechanisms of parasite combat and inflammation control. Was emphasized that the rise of a modulated Th1 cytokines pattern (inflammatory: IFN- $\gamma$  / regulatory: IL-4, IL-6, IL-10) delayed (T2) in IND+CARD group may indicate that after initial immune imbalance, host response would become immunomodulatory. Thus, benznidazole acts by unbalancing different mechanisms related to immune response in chronic Chagas disease. Although, a long follow-up investigation will be necessary to conclude if these phenomena are definitive or are due to high levels of drug and antigen in host organism.

Keywords: Chagas disease, immune system, drug therapy

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Classificação clínica da disfunção ventricular esquerda na cardiopatia chagásica .....   | 21 |
| Figura 2 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 25 |
| Figura 3 - Imunorregulação na doença de Chagas crônica .....  | 26 |
| Quadro 1 - Classificação dos indivíduos com doença de Chagas crônica incluídos na pesquisa segundo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica ..... | 40 |
| Quadro 2 - Anticorpos utilizados na imunofenotipagem .....  | 43 |
| Quadro 3 - Marcação de superfície e intracitoplasmática dos tipos celulares avaliados .....   | 45 |
| Quadro 4 - Tipos celulares avaliados quanto à produção de citocinas .....   | 45 |
| Figura 4 - Exemplo de aquisição demonstrando os parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC) .....  | 46 |
| Figura 5 - Exemplo de aquisição dos linfócitos B no citômetro de fluxo.....   | 47 |
| Figura 6 - Exemplo de aquisição das células NK no citômetro de fluxo .....  | 47 |
| Figura 7 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4+ no citômetro de fluxo.....  | 48 |
| Figura 8 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD8+ no citômetro de fluxo.....  | 49 |
| Figura 9 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T regulatórios no citômetro de fluxo .....   | 50 |
| Figura 10 - Exemplo de gráfico <i>dot plot</i> da aquisição de monócitos no citômetro de fluxo. ....  | 51 |
| Figura 11 - Caracterização da produção de linfócito B convencional (CD5-CD19+) em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                        | 55 |
| Figura 12 - Caracterização da produção de linfócitos B1 (CD5+CD19+) em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                                   | 56 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13 - Caracterização da produção de células NK CD3-CD16+CD56+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol ..... | 58 |
| Figura 14 - Caracterização da produção de células NK CD3-CD16+CD56- em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol ..... | 59 |
| Figura 15 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD28+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....    | 60 |
| Figura 16 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD152+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....   | 62 |
| Figura 17 - Caracterização da produção de linfócitos T CD8+CD28+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....    | 63 |
| Figura 18 - Caracterização da produção de linfócitos T CD8+CD152+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....   | 64 |
| Figura 19 - Caracterização da produção de monócitos CD14+CD80+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....      | 66 |
| Figura 20 - Caracterização da produção de monócitos CD14+CD86+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....      | 67 |
| Figura 21 - Caracterização da produção de monócitos CD14+HLA-DR+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....    | 68 |
| Figura 22 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....    | 70 |
| Figura 23 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25high em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol ..... | 71 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 24 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+FoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....   | 73 |
| Figura 25 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....  | 74 |
| Figura 26 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25highFoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                                       | 75 |
| Figura 27 - Caracterização da produção de IFN- $\gamma$ em células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                     | 78 |
| Figura 28 - Caracterização da produção de IL-10 em células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                             | 81 |
| Figura 29 - Quantificação de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-2 no sobrenadante de cultura de células obtidas de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol ..... | 83 |
| Figura 30 - Quantificação de IL-4, IL-6 e IL-10 no sobrenadante de cultura de células obtidas de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol .....                   | 85 |

## SUMÁRIO

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| <b>1</b>    | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 15 |
| <b>2</b>    | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 17 |
| <b>2.1</b>  | <b>Epidemiologia da doença de Chagas</b> .....   | 17 |
| <b>2.2</b>  | <b>Aspectos clínicos da doença de Chagas</b> .....   | 20 |
| <b>2.3</b>  | <b>Fatores envolvidos no estabelecimento da patologia da doença de Chagas</b> .....                        | 23 |
| 2.3.1       | A resposta imunológica do hospedeiro e a patologia na doença de Chagas .....                               | 24 |
| <b>2.4</b>  | <b>Tratamento etiológico na doença de Chagas crônica</b> .....   | 30 |
| 2.4.1       | Novas abordagens para o acompanhamento laboratorial após o tratamento etiológico na doença de Chagas ..... | 32 |
| 2.4.2       | Resposta imune e o tratamento da infecção chagásica pelo benzonidazol .....                                | 35 |
| <b>3</b>    | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | 37 |
| <b>4</b>    | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 38 |
| <b>4.1</b>  | <b>Objetivo geral</b> .....  | 38 |
| <b>4.2</b>  | <b>Objetivos específicos</b> .....   | 38 |
| <b>5</b>    | <b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....   | 39 |
| <b>5.1</b>  | <b>Tipo de Estudo</b> .....  | 39 |
| <b>5.2</b>  | <b>População do estudo</b> .....   | 39 |
| <b>5.3</b>  | <b>Coleta de sangue</b> .....  | 41 |
| <b>5.4</b>  | <b>Sorologia para infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....   | 41 |
| <b>5.5</b>  | <b>Antígeno solúvel de epimastigota</b> .....  | 41 |
| <b>5.6</b>  | <b>Cultivo celular</b> .....   | 42 |
| <b>5.7</b>  | <b>Imunofenotipagem</b> .....  | 42 |
| 5.7.1       | Contexto <i>Ex vivo</i> .....  | 43 |
| 5.7.2       | Contexto <i>In vitro</i> .....   | 44 |
| <b>5.8</b>  | <b>Aquisição celular e análise do fenótipo por citometria de fluxo</b> .....                               | 44 |
| <b>5.9</b>  | <b>Deteção de citocinas no sobrenadante de cultura</b> .....   | 51 |
| <b>5.10</b> | <b>Análise estatística</b> .....   | 52 |
| <b>6</b>    | <b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....  | 53 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| <b>7</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....  | 54 |
| <b>7.1</b> | <b>Caracterização fenotípica de células da resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas no contexto <i>ex vivo</i> e após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i>, antes e após o tratamento com o benzonidazol</b> .....                    | 54 |
| 7.1.1      | Células B .....  | 54 |
| 7.1.2      | Células <i>Natural Killer</i> .....  | 57 |
| 7.1.3      | Expressão de CD28 e CD152 em células T CD4+ e CD8+ .....   | 60 |
| 7.1.4      | Expressão de CD80, CD86 e HLA-DR em monócitos CD14+ .....  | 65 |
| 7.1.5      | Células T regulatórias .....   | 69 |
| <b>7.2</b> | <b>Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células imunes de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol no contexto <i>ex vivo</i> e após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i></b> ..... | 76 |
| <b>7.3</b> | <b>Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue total de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com o benzonidazol após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i></b> .....                             | 82 |
| <b>8</b>   | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 86 |
| <b>8.1</b> | <b>Caracterização fenotípica de células da resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas no contexto <i>ex vivo</i> e após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i>, antes e após o tratamento com o benzonidazol</b> .....                    | 86 |
| 8.1.1      | Células B .....  | 86 |
| 8.1.2      | Células <i>Natural Killer</i> .....  | 88 |
| 8.1.3      | Expressão de CD28 e CD152 em células T CD4+ e CD8+ .....   | 90 |
| 8.1.4      | Expressão de CD80, CD86 e HLA-DR em monócitos CD14+ .....  | 92 |
| 8.1.5      | Células T regulatórias .....   | 94 |
| <b>8.2</b> | <b>Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células imunes de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol no contexto <i>ex vivo</i> e após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i></b> ..... | 97 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 8.3 | Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue total de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com o benzonidazol após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>T. cruzi</i> ..... | 100 |
| 9   | CONCLUSÕES .....  | 104 |
| 10  | CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 105 |
| 11  | PERSPECTIVAS .....  | 106 |
|     | REFERÊNCIAS .....   | 107 |
|     | APÊNDICE A .....  | 123 |
|     | APÊNDICE B .....  | 124 |
|     | APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido .....   | 125 |
|     | APÊNDICE D – Artigo publicado .....   | 127 |
|     | APÊNDICE E – Artigo publicado .....   | 133 |
|     | APÊNDICE F – Artigo publicado .....   | 139 |
|     | APENDECE G - Artigo publicado .....   | 144 |
|     | ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz ....  | 152 |

## 1 INTRODUÇÃO

Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a doença de Chagas está circunscrita do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile, existindo relatos de casos em países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (COURA; DIAS, 2009; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Clinicamente, os indivíduos infectados apresentam quadro inicial assintomático ou oligossintomático, o que dificulta o diagnóstico da doença em sua fase aguda. Dois a quatro meses após o término desta fase os indivíduos evoluem para a fase crônica, sendo esta de grande preocupação médica devido ao caráter debilitante apresentado por parte dos indivíduos infectados (DIAS, 1989).

A única opção para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil é o benzonidazol, com cerca de 70% dos indivíduos tratados na fase aguda apresentando cura (MARIN-NETO et al., 2009). Entretanto, o uso desta medicação também é recomendado em casos de transmissão congênita, de reativação da infecção e em crianças infectadas. Na fase crônica, por sua vez, a indicação do tratamento é para indivíduos que não demonstrem manifestações clínicas, ou que estejam presentes de forma branda (BERN et al., 2007).

Acredita-se que a utilização da medicação na fase crônica tem como finalidade prevenir ou retardar a evolução da doença de Chagas para as formas clínicas mais graves. Evidências de atenuação no curso de miocardites em animais infectados com *T. cruzi* (GARCIA et al., 2005), bem como estudos observacionais de indivíduos que demonstraram negatização dos testes sorológicos e prevenção quanto à evolução para os quadros clínicos sintomáticos (FRAGATA FILHO; SILVA; BOAINAIN, 1995), vem ratificar o papel do tratamento etiológico no controle do curso clínico desta parasitose. Contudo, a intervenção com o benzonidazol na fase crônica da doença ainda não foi estabelecida, uma vez que não estão definidos os reais benefícios da utilização do tratamento etiológico nesta fase da doença de Chagas (BRITTO et al., 2001; LAURIA-PIRES et al., 2000).

Um dos grandes empecilhos para o estabelecimento do benzonidazol como abordagem terapêutica na fase crônica é a inexistências de padrões laboratoriais que confirmem a cura ou a falha terapêutica de forma precoce e segura. Baseados em métodos sorológicos indiretos (que identificam anticorpos específicos ao *T. cruzi*), os testes mais utilizadas apresentam como desvantagem a demora em



demonstrar a redução dos títulos de anticorpos ou a soroconversão dos indivíduos na fase crônica, indicando a necessidade de novas abordagens para esta finalidade.

Com o objetivo de identificar novos marcadores imunológicos de acompanhamento após tratamento etiológico, alguns grupos de pesquisa têm realizado trabalhos avaliando a influência do benzonidazol na resposta imunológica dos indivíduos portadores da doença de Chagas (LAUCELLA et al., 2009; GUEDES et al., 2012; SATHLER-AVELAR et al., 2006, 2008, 2012; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Contudo, nenhum marcador imunológico foi definido.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo de seguimento onde foi avaliada a resposta imunológica em indivíduos adultos na fase crônica da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estímulo com antígeno de *T. cruzi*, antes e após o tratamento etiológico com o benzonidazol. Estudos que possam contribuir trazendo conhecimento sobre a atuação desta medicação na fase crônica da doença de Chagas são de grande relevância diante da importância da busca de indicadores mais adequados para o acompanhamento após o tratamento. O intuito foi demonstrar que a observação do comportamento imune pode permitir a identificação do impacto da terapêutica nesta fase da doença, auxiliando na definição do tratamento etiológico como intervenção.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Epidemiologia da doença de Chagas

O médico Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em 1908 no município de Lassance (Minas Gerais), teve seu primeiro contato com o inseto hematófago vetor do *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas. A partir de então suas pesquisas permitiram a descrição de detalhes do ciclo de transmissão e das manifestações clínicas do primeiro caso humano, tornando seu relato único na história (CHAGAS, 1909; COUTINHO; DIAS, 1999; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Causada pelo protozoário *T. cruzi*, a doença de Chagas apresenta diversos mecanismos não vetoriais de transmissão (transplante de órgãos e hemoderivados, congênita, oral, por aleitamento materno e acidentes laboratoriais). Contudo, a via clássica de transmissão, caracterizada pela presença de insetos hematófagos da família *Reduviidae*, foi o principal fator que contribuiu para o estabelecimento da doença de Chagas como enfermidade atualmente endêmica do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile, apresentando 15-18 milhões de infectados apenas na América Latina (BRICEÑO-LEÓN, 2009; COURA; DIAS, 2009).

Um conjunto de fatores permitiu o estabelecimento, manutenção e expansão da doença, como: progressão das fronteiras agrícolas, habitações rudimentares (cafus e casas de taipa), estabelecimento de ciclos domésticos e peridomésticos (galinheiros e chiqueiros), entre outros (BRICEÑO-LEÓN, 2009; KROPF, 2006; SILVEIRA, 2000). Aliada a isso, a expansão da doença, devido a migração de pessoas de países endêmicos para países não endêmicos, tem reforçado a relevância desta parasitose como problema de saúde pública, com aproximadamente 100 milhões de indivíduos estando sobre risco de infecção em todo o mundo (COURA; DIAS, 2009; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Em 2010 foram estimados 47.743 imigrantes infectados pelo *T. cruzi* vivendo na Espanha. No Canadá e na Austrália, o número estimado de imigrantes com doença de Chagas foi de 1.789 e 1.392, respectivamente (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). A imigração de infectados para estas regiões aumentou o risco de transmissão congênita e por transfusão sanguínea, levando a necessidade de melhorias na infraestrutura especializada no cuidado médico dos indivíduos

portadores e no controle dos bancos de sangue (COURA; DIAS, 2009; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS, 2007; TANOWITZ, WEISS; MONTGOMERY, 2011).

No Brasil, entre 2001 e 2006, o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 2.249 casos agudos de doença de Chagas - taxa média de 0,21 casos agudos/100.000 habitantes - com os estados das regiões Norte e Nordeste apresentando as maiores taxas (BRAZ et al., 2011). Em inquérito sorológico com neonatos do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais, foi verificada uma prevalência para doença em puérperas de 0,5%, sendo o risco de transmissão vertical de 0,2% e a incidência congênita de 1,6/100.000 nascidos vivos (GONTIJO et al., 2009). Em inquérito de soroprevalência realizado entre 2001 e 2008 em crianças com idade até cinco anos, apenas 32 (0,03%) das 104.954 crianças foram confirmadas como infectadas. Destas, 0,02% com positividade materna (sugerindo transmissão congênita) e 0,01% com positividade apenas na criança (provável transmissão vetorial). As crianças que adquiriram a infecção por provável via vetorial distribuíram-se predominantemente na região nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas). Dos casos com provável transmissão congênita sobressaiu-se o Rio Grande do Sul (60%), representando as diferenças regionais na transmissão congênita da doença de Chagas no Brasil (OSTERMAYER et al., 2011). Aliados a tais dados, relatos de infecção por ingestão de alimentos contaminados (transmissão oral) (DIAS et al., 2008; PINTO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2008; VALENTE, VALENTE; NETO, 1999) demonstram que outras formas de transmissão têm permitido a circulação do *T. cruzi* no território brasileiro.

O Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM/ Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde) apresenta registrados, entre 1980 e 2007, 156.224 óbitos que tiveram como causa base a doença de Chagas no Brasil, com taxa de mortalidade de 3,66/100.000 habitantes (BRAZ et al., 2011). Como a notificação dos casos de doença de Chagas restringem-se apenas aos casos agudos, acredita-se que existam cerca de 600.000 indivíduos portadores da doença de Chagas crônica apresentando agravos cardíacos e/ou digestivos, com tais manifestações causando óbito de cerca de 5.000 indivíduos ao ano (COURA; DIAS, 2009).

Desde sua descoberta, algumas ações têm sido desenvolvidas nas áreas endêmicas com o objetivo de atuar contra a disseminação da doença de Chagas. Teve destaque a “Ação para eliminar o *Triatoma infestans*” implementada pelos países do Cone Sul em 1990 (SCHOFIELD; DIAS, 1999). No Brasil isto veio reforçar as ações para o controle da transmissão desta enfermidade já existentes desde 1975 (DIAS, 1987). Como conseqüência, alguns países receberam da Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde a certificação de eliminação da transmissão da doença de Chagas através do principal vetor circulante (DIAS, 2006).

Para o Brasil, esta certificação veio em 2006, estando o país livre da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* e por transfusão de sangue e seus derivados (DIAS, 2006). No entanto, a presença de espécies consideradas vetores secundários como *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (OLIVEIRA FILHO, 1999), aliada as outras formas de transmissão, como por transplante de órgãos e pelas vias congênita e oral (COURA et al., 2002; COURA, 2007; COURA; DIAS, 2009; GONTIJO et al., 2009; PINTO et al., 2008), subsidiam a preocupação acerca desta doença que, apesar dos avanços obtidos, ainda persiste como doença negligenciada no Brasil.

Doenças negligenciadas correspondem a um grupo de doenças infecciosas que afetam predominantemente as populações mais pobres e vulneráveis, contribuindo com a perpetuação dos ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social pelo seu impacto na saúde infantil, na redução da produtividade da população trabalhadora e na promoção do estigma social (BRASIL, 2010; HOTEZ, 2007). Diante disso, merece destaque no Brasil o Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas (SANAR), lançado pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Pernambuco em 2011. O objetivo do projeto é reduzir ou eliminar as doenças transmissíveis negligenciadas que apresentam indicadores inaceitáveis, estando a doença de Chagas entre as prioridades. Passados dois anos de implantação do programa, foram exterminados 2,5 mil vetores do *T. cruzi*, após inspeção de 29.149 residências. Por meio do SANAR também houve o aumento da oferta do exame sorológico para o diagnóstico da doença nas 12 regiões do Estado (PERNAMBUCO, 2014).

Contudo, mesmo com os programas nacionais de controle da doença de Chagas tendo apresentado efetividade em seu controle, ainda existem

aproximadamente 3 milhões de pessoas infectadas no Brasil (PETHERICK et al. 2010), constituindo uma carga permanente sobre os serviços de saúde.

## **2.2 Aspectos clínicos da doença de Chagas**

Os indivíduos portadores da doença de Chagas apresentam duas fases clínicas características, aguda e crônica. A fase aguda dura de 6-8 semanas, com alguns indivíduos apresentando febre, linfadenopatia, esplenomegalia e/ou edema, sendo a maioria dos casos assintomáticos ou oligossintomáticos. Sem tratamento, cerca de 5-10% dos indivíduos sintomáticos vem a óbito durante esta fase, principalmente por encefalomielite ou insuficiência cardíaca grave, sendo raros os casos de morte súbita (COURA, 2007; PRATA, 2001; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Esta fase é caracterizada pelo elevado número de parasitas na corrente sanguínea e nos tecidos do hospedeiro, sendo a infecção aguda acompanhada de ativação excessiva do sistema imune, com elevação dos níveis plasmáticos de citocinas e intensa ativação de linfócitos B e T (JUNQUEIRA et al., 2010). As manifestações da doença aguda resolvem-se espontaneamente em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo quando não é realizado o tratamento com drogas tripanocidas (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas, diminuição da parasitemia e elevação de anticorpos específicos da classe IgG. Cerca de 60-70% dos indivíduos nunca desenvolve doença clínica aparente na fase crônica, sendo caracterizados como portadores da forma indeterminada da doença de Chagas (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Estes indivíduos apresentam eletrocardiograma (ECG) e exames radiológicos de tórax, esôfago e cólon sem alterações (BRASIL, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010), com expectativa de vida similar a dos indivíduos sem doença de Chagas (MARIN-NETO et al., 2002; NUNES et al., 2013; RIBEIRO; ROCHA, 1998;).

Mesmo com a maioria dos indivíduos permanecendo assintomáticos por toda a vida, após um período de 10-30 anos, parte destes desenvolvem a doença de Chagas crônica sintomática, caracterizada pela presença de desordens cardíacas (forma cardíaca) ou gastrointestinais (forma digestiva). Uma minoria dos infectados pode demonstrar forma cardíaca e forma digestiva simultaneamente, caracterizando

a forma mista (FM) da doença crônica (GASCON; BERN; PINAZO, 2010; PRATA, 2001; RASSI Jr, RASSI; MARIN-NETO, 2010)

A cardiopatia chagásica crônica é a principal responsável pela elevada morbidade-mortalidade da doença, surgindo em 20-30% dos indivíduos e incluindo amplo espectro de manifestações, que vão da presença de anormalidades do sistema de condução a bradicardias e taquicardias, aneurisma apical, insuficiência cardíaca, tromboembolia e morte súbita (MAYA et al., 2010; RASSI Jr; RASSI; LITTLE, 2000; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença (BRASIL, 2005). É comum o paciente com a forma cardíaca relatar dor torácica apical. A insuficiência cardíaca é geralmente biventricular, que é a mais frequente e severa manifestação, sendo associada com piores prognósticos e altas taxas de mortalidade em comparação com insuficiência cardíaca devido a outras causas (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI Jr; RASSI, 2010).

Sendo o dano cardíaco na doença de Chagas um processo progressivo que pode ser classificado em estágios, uma nova classificação foi proposta na I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Essa classificação teve como objetivo uniformizar as apresentações clínicas e nortear condutas e recomendações internacionais, sendo mais uma ferramenta auxiliar no tratamento dos indivíduos portadores da doença de Chagas crônica (Figura 1) (ANDRADE et al., 2011).

Figura 1 - Classificação clínica da disfunção ventricular esquerda na cardiopatia chagásica.

| Fase aguda   | Fase crônica  |   |  |  |  |
|--|---|---|--|--|--|
|  | Forma indeterminada   | Forma cardíaca sem disfunção ventricular  | Forma cardíaca com disfunção ventricular   |  |  |
|  | A   | B1  | B2   | C  | D  |
| Pacientes com quadro compatível com Doença de Chagas aguda | Pacientes sob risco de desenvolver ICC. Possuem sorologia positiva, não têm cardiopatia estrutural ou sintomas de ICC. Também não têm alterações digestivas | Pacientes com cardiopatia estrutural, evidenciada por alterações eletrocardiográficas ou ecocardiográficas, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais ou prévios de ICC | Pacientes com cardiopatia estrutural, caracterizada por disfunção ventricular global, mas sem sinais e sintomas prévios ou atuais de ICC | Pacientes com disfunção ventricular e com sintomas prévios ou atuais de ICC. (NYHA I, II, III ou IV) | Pacientes com sintomas refratários de ICC em repouso, apesar de tratamento clínico otimizado, necessitando intervenções especializadas |

Fonte: Andrade et al. (2011).

Segundo essa diretriz, indivíduos portadores da doença de Chagas crônica sem sintomas presentes ou progressos de insuficiência cardíaca (IC) e com ECG e RX de tórax normal são classificados no estágio A, enquadrando os indivíduos da forma indeterminada (ANDRADE et al., 2011).

Por sua vez, os indivíduos anteriormente classificados com forma cardíaca foram subdivididos em quatro estágios (B1, B2, C e D). Indivíduos portadores crônicos com cardiopatia estrutural que nunca tiveram sinais nem sintomas de IC estão no estágio B, que contempla duas situações clínicas: B1 e B2. No estágio B1, estão os indivíduos com alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias) e que não têm disfunção ventricular. Esses indivíduos podem ter alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades da contratilidade regional), porém a função ventricular global é normal. No estágio B2, estão aqueles que já apresentam disfunção ventricular global, com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) reduzida (ANDRADE et al., 2011).

No estágio C, estão os indivíduos com sintomas prévios ou atuais de IC, e que possuem disfunção ventricular (*New York Heart Association-NYHA I, II, III e IV*). Por sua vez, os que apresentam sintomas de IC em repouso, refratários ao tratamento clínico maximizado (NYHA IV), necessitando intervenções especializadas e intensivas, são classificados no estágio D da cardiopatia chagásica (ANDRADE et al., 2011).

Surgindo em cerca de 10-15% dos indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas, as disfunções gastrointestinais são caracterizadas com infiltração linfocítica focal e degeneração neuronal com desnervação, sendo características no megaesôfago e no megacólon (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Indivíduos soropositivos para a doença de Chagas que apresentam queixas clínicas relacionadas ao trato gastrointestinal demonstram fortes indícios de acometimento digestivo. A confirmação ocorre através de alterações reveladas no exame radiológico do esôfago e do colón, na endoscopia, no enema opaco ou na colonoscopia. O megaesôfago causa disfagia combinada com dor epigástrica, regurgitação, ptialismo e desnutrição em casos mais severos. Por sua vez, o megacólon afeta o segmento sigmóide, reto ou cólon descendente, ou uma combinação destes, produzindo prolongada constipação, distensão abdominal e ocasionalmente obstrução do intestino grosso (BRASIL, 2005; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

### 2.3 Fatores envolvidos no estabelecimento da patologia da doença de Chagas

Os mecanismos relacionados ao estabelecimento da variedade de quadros clínicos desenvolvida na fase crônica da doença de Chagas são multifatoriais, envolvendo aspectos ligados tanto ao parasita quanto ao hospedeiro (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005).

Trabalhos acerca dos polimorfismos do *T. cruzi* sugerem que a evolução clínica do hospedeiro seja influenciada pela variabilidade genética do protozoário (BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003). A correlação entre a miocardite na doença de Chagas crônica e a persistência do *T. cruzi* no tecido cardíaco foi documentada (MARIN-NETO et al., 2007; ZHANG; TARLETON, 1999), assim como a detecção do parasita no sangue, em tecido cardíaco (AÑEZ et al., 1999) e no sistema digestivo (GUTIERREZ et al., 2009) de indivíduos crônicos sintomáticos, reforçando a importância do protozoário na patologia crônica. Aliada a isso, existem evidências de que a redução da quantidade de parasitas em decorrência do tratamento etiológico conduz a um decréscimo concomitante na gravidade clínica da doença de Chagas (BUSTAMANTE; BIXBY; TARLETON, 2008; VIOTTI et al., 1994).

Por sua vez, estudos têm demonstrado padrões de resposta imunológica distintos para cada uma das formas clínicas crônicas da doença de Chagas (BARROS-MAZON et al., 2004; CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; DUTRA et al., 1994; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010; VITELLI-AVELAR et al., 2005). A hipótese acerca do papel da resposta imunológica afirma que indivíduos com a forma indeterminada são capazes de reduzir o número de parasitas na fase inicial da infecção, modulando a resposta imune e limitando assim o desenvolvimento da patologia na fase crônica. Já o sistema imunológico dos indivíduos crônicos que não conseguem manter de forma eficiente os mecanismos imunoregulatórios, mesmo sendo capazes de controlar a parasitemia, permite o estabelecimento de resposta inflamatória persistente com desenvolvimento de quadro clínico sintomático (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; DUTRA et al., 2009).

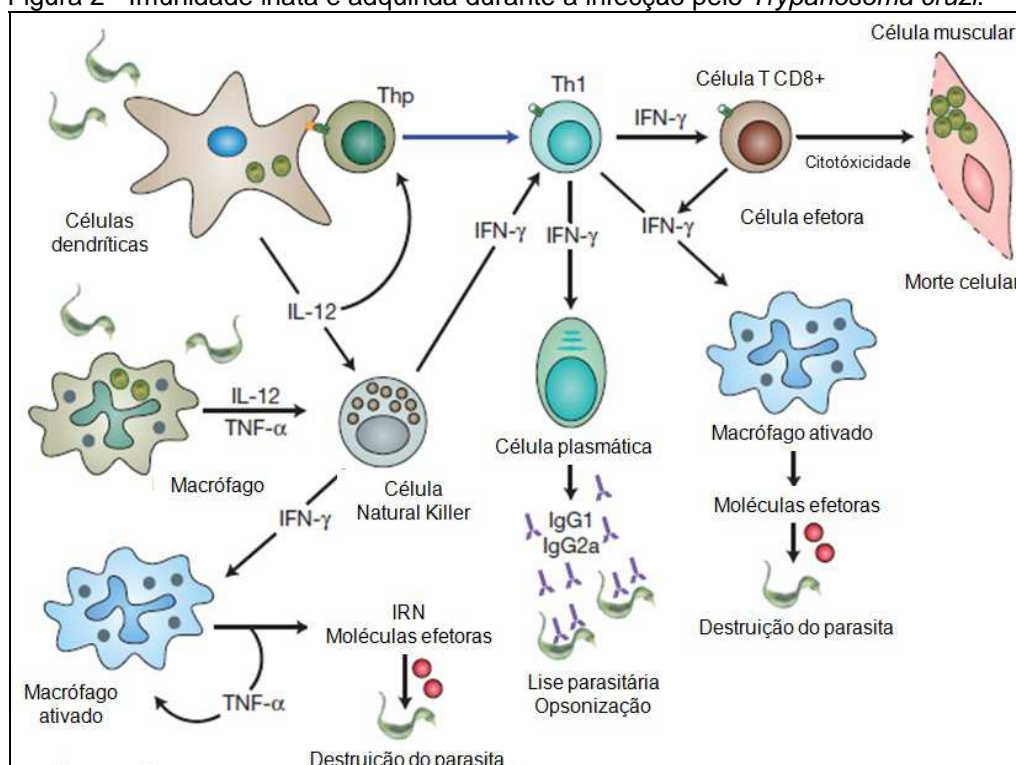
Diante da complexidade presente na relação do hospedeiro com o *T. cruzi*, ambas as hipóteses – imune e da persistência do parasita – devem ser levadas em consideração para compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia da doença de Chagas (MARIN-NETO et al., 2007). Desta forma, o processo patológico desenvolvido por parte dos indivíduos portadores crônicos da doença é influenciado



tanto pela manutenção do parasita no organismo do hospedeiro quanto pela resposta imunológica construída contra a infecção causada pelo *T. cruzi*.

### 2.3.1 A resposta imunológica do hospedeiro e a patologia na doença de Chagas

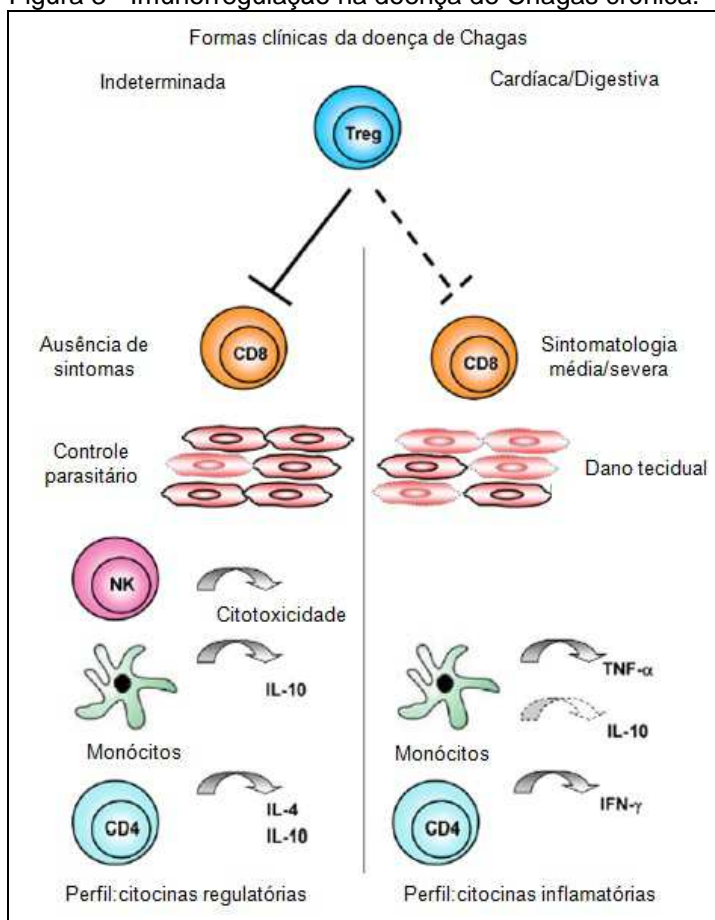
No homem, bem como em modelos experimentais, a infecção pelo *T. cruzi* mobiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares contra o parasita, sendo estas cruciais na redução da elevada carga parasitária característica do primeiro estágio da infecção (BRENER; GAZZINELLI, 1997). O sistema imune inato tem papel central, agindo como primeira barreira na resistência do hospedeiro à infecção, com suas células (macrófagos, células NK e dendríticas) produzindo citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efectoras (intermediários reativos de nitrogênio), além das proteínas do sistema complemento, atuando no controle da replicação do parasita. Além disso, as células do sistema imune inato são responsáveis por interligar a imunidade inata com a adquirida, principalmente através das células dendríticas, produzindo citocinas necessárias para diferenciação e expansão clonal de células Th1 CD4+ e CD8+, assim como células B, com estes tipos celulares atuando direta e indiretamente no controle da infecção através de mecanismos fagocíticos e citotóxicos (Figura 2) (JUNQUEIRA et al., 2010).

Figura 2 - Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de Junqueira et al. (2010).

Entretanto, acredita-se que com o estabelecimento da fase crônica, a resposta imunológica acaba adquirindo padrões diferentes entre as distintas formas clínicas. Experimentos utilizando amostras de sangue humano constataram uma resposta imune citotóxica entre os indivíduos crônicos sintomáticos, com a presença de células T CD8+ e citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (MENEZES et al., 2004). Além disso, elevados níveis de IFN- $\gamma$  estariam correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo o envolvimento desta citocina com a evolução para a forma cardíaca (GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010). Por sua vez, a alta frequência de linfócitos T CD4+ e a elevada produção de IL-10 na forma indeterminada, característicos de uma resposta antiinflamatória, evidenciam um ambiente imunológico regulado (ARAÚJO et al., 2011; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003; MENEZES et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Imunorregulação na doença de Chagas crônica.



Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2011).

Como dito anteriormente, a interação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa é crucial no estabelecimento de uma resposta imune efetiva. Para isso, a ativação das células T pela apresentação de antígenos por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presentes nas células apresentadoras de antígenos-APCs (células dendríticas, monócitos/macrófagos e linfócitos B), deve ser bem sucedida, sendo dependente da presença de co-sinalização apropriada (WANG; CHEN, 2004).

Uma das vias de co-sinalização mais importantes consiste na interação entre a molécula CD28, expressa pelas células T, e os seus homólogos, CD80 e CD86, presentes em APCs. A ligação da CD28 presente nas células T virgens a estas moléculas co-sinalizadoras fornece um potente sinal estimulador de ativação e diferenciação destas células, resultando na indução da transcrição do gene da IL-2, na expressão de CD25, e na entrada no ciclo celular (ALEGRE, FRAUWIRTH, THOMPSON, 2001; BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002; COLLINS; LING; CARRENO, 2005). A CD28 também atua na diferenciação de célula B e produção

de anticorpos além de direcionar a migração dentro do sítio inflamatório pela indução da produção de quimiocinas e regulação dos receptores das quimiocinas (BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002).

Por outro lado, o Antígeno Intracelular-4 Associado ao Linfócito Citotóxico (CTLA-4) ou CD152, desempenha o papel oposto ao da molécula CD28, regulando negativamente a ativação das células T. A CTLA-4 possui 76% de homologia à CD28 e liga-se aos mesmos receptores co-estimuladores, CD80 e CD86, com maior afinidade que o CD28 (BRUNNER et al., 1999; WANG; CHEN, 2004). Entretanto, a expressão de CTLA-4 é apenas verificada após a ativação das células T via CD4+ ou CD8+ (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001).

Ao avaliar a expressão destas moléculas co-estimulatórias em células obtidas de indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas, Souza et al. (2007) verificaram que após infecção com o *T. cruzi*, monócitos CD14+ aumentaram a frequência de CD80 em todos os grupos avaliados. Ao expor linfócitos aos monócitos infectados, os autores observaram aumento na expressão de CTLA-4 na superfície das células T de indivíduos assintomáticos, mas não naqueles com doença cardíaca, em comparação com o grupo controle (SOUZA et al., 2007), sugerindo que o parasita induz uma resposta imunológica modulada apenas na forma indeterminada, com elevada expressão de CD80 e CTLA-4.

As moléculas de superfície HLA-DR, co-sinalizadoras constitutivas das APCs, são antígenos glicoproteicos, conhecidos como MHC classe II, que estimulam as respostas imunes adaptativas através da apresentação de peptídeos a linfócitos TCD4+, também sendo importantes na ativação celular (LA FLAMME et al., 1997). Molica et al. (2007), mesmo sem verificarem diferença estatística, observaram que indivíduos na forma crônica assintomática da doença de Chagas apresentam baixa expressão da molécula HLA-DR em células CD14+, sugerindo que a ativação dos linfócitos T por essas células poderia estar mais controlada neste indivíduos (MOLICA, 2007). Também foram verificados baixos níveis de HLA-DR relacionados com alta expressão de IL-10 em monócitos de indivíduos forma indeterminada, tanto *ex vivo* quanto após infecção *in vitro* com *T. cruzi*, em comparação com o grupo controle (indivíduos não-infectados) (SOUZA et al., 2004), sugerindo a existência de uma regulação da resposta imune por parte dos monócitos de indivíduos do grupo forma indeterminada.

Subtipos específicos de linfócitos também têm sido correlacionados com a presença ou não de manifestações clínicas na fase crônica da doença de Chagas. As células T CD4+CD25+, pertencente ao grupo de células T designadas de regulatórias, vem sendo foco das pesquisas atuais pelo acúmulo de evidências indicativas de seu papel na manutenção da tolerância imunológica e no controle negativo da resposta imune contra patógenos (BELKAID; SUN; BOULADOUX, 2006; CEDERBOM; HALL; IVARS, 2000; FEHÉRVARI; SAKAGUCHI, 2004; SAKAGUCHI et al., 1995). As células T CD4+CD25+ suprimem a ativação, a proliferação e a função efetora de vários tipos de células imunes, incluindo células T CD4+ e CD8+, *natural killer* (NK), NKT, B e apresentadoras de antígenos (APCs) (SAKAGUCHI et al., 2008). Alguns estudos têm relacionado a elevada frequência destas células com a forma crônica assintomática da doença de Chagas (ARAÚJO et al., 2011, 2012; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006).

Além de expressar constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25), as células Tregs CD4+CD25+ também expressam o fator de transcrição Foxp3 (Forkhead Box P3), gene controlador do desenvolvimento e função destes linfócitos (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; SAKAGUCHI et al., 2008). Mutações neste gene levam a deficiência ou má função destas células, tendo como consequência o desenvolvimento de patologias autoimunes e/ou desordens inflamatórias (ZIRGLER, 2006). A alta frequência de células T CD4+CD25+ expressando FoxP3 foi observada em indivíduos com cardiomiopatia chagásica ausente/leve quando comparada com aqueles com cardiomiopatia chagásica moderada/grave após estimulação com tripomastigotas (ARAÚJO et al., 2012; GUEDES et al., 2012). Relatos de alta expressão de FoxP3 em camadas musculares e na área dos plexos neuronais do cólon (SILVEIRA et al., 2009) e no tecido cardíaco (ARAÚJO et al., 2011) de portadores crônicos assintomáticos reforçam o papel regulador das células FoxP3+ na moderação do processo inflamatório apresentado nesta parasitose.

Outro grupo celular indispensável na resposta imunológica contra o *T. cruzi* é o das células NK. Estas células já foram citadas como uma das principais produtoras de IFN- $\gamma$  durante os estágios iniciais da infecção (BRENER et al., 1997; CARDILLO et al., 1996; SILVA et al., 1992). A atividade citotóxica das células NK é dependente de sua subpopulação, sendo descritos dois tipos principais de acordo com a expressão da molécula CD56 (SONDERGAARD; ULLUM; PEDERSEN, 2000).

Aproximadamente 90% são designadas células NK maduras, com baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim/-</sup>) e altos níveis de CD16 em sua superfície. Por sua vez, os outros 10% restantes são CD56+ com baixa ou nenhuma expressão de CD16, demonstrando acentuada atividade proliferativa. Estas últimas são determinadas de células T NK por apresentarem marcadores de superfície tanto dos linfócitos T quanto de células NK, sendo consideradas outro subtipo de linfócito T regulatório (CALIGIURI, 2008; COOPER, 2001; GODFREY et al., 2000; GODFREY; KRONENBERG, 2004). Vittelli-Avellar et al. (2005) indicaram um possível controle do processo inflamatório por parte destes linfócitos na doença de Chagas crônica, uma vez que indivíduos na forma indeterminada exibiram elevada frequência de células CD3+CD16-CD56+ (T NK) concomitante com uma baixa frequência de células T CD8+ ativadas (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Contudo, vias regulatórias envolvendo outras células imunes também podem estar relacionadas ao controle da inflamação na doença de Chagas.

Existem subclasses distintas de células B que suprimem a progressão da inflamação mediada pela imunidade adquirida através de vários mecanismos como: produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , apresentação secundária de antígenos e interação celular direta ou através de anticorpos (MIZOGUCHI; BHAN, 2006). Denominadas com Bregs, estas células suprimem a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4+, CD8+ e células T NK por meio da produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ . Desta forma, influenciam na redução da resposta Th1 patogênica, promovendo a apoptose destas células e/ou inibindo a apresentação de antígeno pelas APCs (BOUAZIZ; YANABA; TEDDER, 2008; MAURI; EHRENSTEIN, 2007). Além disso, promovem a remoção de corpos apoptóticos, evitando que estes desencadeiem respostas inflamatórias (MAURI; EHRENSTEIN, 2007). Sathler-Avelar et al. (2003) demonstraram aumento nos níveis de linfócitos B na fase aguda tardia e nos estágios iniciais da infecção crônica. Posteriormente, foi evidenciada produção de IL-10 por linfócitos B, tanto no contexto *ex vivo* quanto após estimulação antigênica (SATHLER-AVELAR et al., 2008).

Diante dos relatos acerca da relação de diferentes subtipos celulares, assim como moléculas co-estimulatórias e citocinas, com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica, é possível afirmar que a gravidade do quadro inflamatório tecidual estaria relacionada com um padrão citotóxico/inflamatório de resposta, enquanto que a ausência de sintomas clínicos seria acompanhada por

uma resposta imune equilibrada/modulada contra o *T. cruzi* (GOMES et al., 2003; MENEZES et al., 2004; SOUZA et al., 2007; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2008), conduzindo a manutenção de um ambiente tecidual ausente de injúrias.

#### **2.4 Tratamento etiológico na doença de Chagas crônica**

Apenas dois compostos terapêuticos estão atualmente em uso para o tratamento etiológico da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol. Seu uso é recomendado para casos agudos, congênitos, de reativação da infecção e em crianças infectadas (ANDRADE et al., 2011; BRASIL, 2005), com cerca de 70% dos indivíduos tratados na fase aguda apresentando cura (MARIN-NETO et al., 2009).

O benzonidazol, derivado nitroimidazólico (*N*-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida), foi lançado em 1970, sendo a única droga usada na maioria dos países latino-americanos (MAYA et al., 2007). Atualmente no Brasil o benzonidazol é produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) localizado na cidade do Recife (MARIN-NETO et al., 2009). O tratamento deve ter duração de 60 dias, com a dose recomendada sendo de 10 mg/kg/dia em crianças e quadros agudos e 5 mg/kg/dia na fase crônica, com recomendação de dose máxima diária de 300 mg (ANDRADE et al., 2011; BRASIL, 2005).

O principal modo de ação do benzonidazol se baseia na interferência da síntese de macromoléculas através de ligações covalentes entre intermediários nitroredutores e vários componentes celulares do parasita como DNA, lipídios e proteínas. Também foi demonstrado que o medicamento pode melhorar o processo de fagocitose, aumentando a morte de parasitas através da produção de IFN- $\gamma$  e inibição da NADH-fumarato redutase no *T. cruzi* (MAYA et al., 2007).

Indivíduos portadores da doença de Chagas na fase crônica também podem ser tratados com a medicação anti-*T. cruzi* desde que não demonstrem manifestações clínicas ou que estas estejam presentes de forma branda (BERN, 2011; BRASIL, 2005; COURA; BORGES-PEREIRA, 2011; ISSA; BOCCHI, 2010; RIBEIRO et al., 2012; VIOTTI et al., 2006). Tal aplicação teria como finalidades: (i) redução progressiva da quantidade de *T. cruzi* no organismo até sua total eliminação, evitando assim a formação de novos focos inflamatórios e a extensão da lesão tecidual, (ii) promoção da regeneração de tecido por meio da inativação do parasita nos focos teciduais existente, evitando a formação de fibrose consolidada,

(iii) reversão da fibrose e das alterações funcionais do sistema autônomo e das alterações estruturais do sistema de condução do miocárdio, (iv) prevenção da hipertrofia do miocárdio e dilatação do miocárdio, esofágica e do cólon, evitando cardiopatia dilatada e os "megas" e, conseqüentemente, suas alterações funcionais e (v) redução ou eliminação do bloqueio cardíaco e a arritmia, que quase sempre levam à morte súbita (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). Porém, devido aos efeitos adversos da medicação e a variedade de evidências tanto favoráveis quanto contrárias acerca dos benefícios nestes indivíduos, ainda não existe um consenso por parte da comunidade médica quanto a sua utilização na fase crônica da doença de Chagas.

Os efeitos colaterais do benzonidazol em adultos podem ser classificados em três grupos: (i) hipersensibilidade, incluindo dermatites com erupções cutâneas (geralmente aparecem entre o sétimo e o décimo dia de tratamento), mialgia, artralgia e linfadenopatia; (ii) polineuropatia, parestesia e polineurites (geralmente durante a quarta semana de tratamento); e (iii) distúrbios da medula óssea, como púrpura trombopênica e agranulocitose (geralmente após a segunda semana de tratamento) (PINAZO et al., 2010). O efeito colateral mais frequente é a dermatite urticariforme que ocorre em até 30,0% dos indivíduos, já no final da primeira semana de tratamento, apresentando boa resposta terapêutica com anti-histamínicos ou, mais efetivamente, com pequenas doses orais de corticosteroides. Quando há febre e adenomegalia, deve-se suspender a medicação. Leucopenia significativa e agranulocitose são raras e, quando ocorrem, obrigam a interrupção do tratamento. Tais medicamentos são contraindicados em gestantes e em indivíduos com insuficiência renal ou hepática (FRAGATA FILHO, 2009; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999; PINTO et al., 2009; VIOTTI et al., 2009). Devido à gravidade desses efeitos adversos, a taxa de desistência é de aproximadamente 10% entre os indivíduos que realizam o tratamento etiológico com o benzonidazol (PÉREZ-MOLINA et al., 2009).

Trabalhos avaliando indivíduos portadores da doença de Chagas crônica após tratamento verificaram o fracasso da medicação na eliminação dos parasitas nesta fase da doença, não interferindo na progressão da doença (BRITTO et al., 2001; FERNANDES et al., 2009; LAURIA-PIRES et al., 2000). Entretanto, evidências de atenuação no curso de miocardites em animais infectados com *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1991; GARCIA et al., 2005), bem como estudos observacionais de



indivíduos que demonstraram negativação dos testes sorológicos e prevenção de alterações clínicas e eletrocardiográficas (FABBRO DE SUASNÁBAR et al., 2000; FRAGATA FILHO; SILVA; BOAINAIN, 1995), ratificam a importância do tratamento etiológico no controle do curso da doença de Chagas. Dado relevante foi publicado por Machado-de-Assis et al. (2013) ao avaliarem indivíduos com doença de Chagas crônica assintomática (forma indeterminada) 13 anos após a intervenção com o benzonidazol. Os indivíduos com forma indeterminada no início do estudo e que foram tratados apresentaram menor progressão clínica (17,4%) em comparação com o grupo não tratado (56,5%), indicando que a medicação pode ter conduzido a uma prevenção da evolução clínica (MACHADO-DE-ASSIS et al., 2013).

Recentemente foi iniciado um estudo onde a eficácia da utilização do benzonidazol como terapia na prevenção de complicações clínicas em indivíduos com doença cardíaca pré-existente. Chamado de BENEFIT (*Benznidazol Evolution for Interruption Trypanosomiasis*), o estudo é multicêntrico, randomizado, duplo-cego, e controlado por placebo. Conduzido pelo Canadian Institutes of Health Research e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tem como objetivo avaliar se a terapia com o benzonidazol reduz a mortalidade e os principais acontecimentos cardiovasculares em indivíduos com doença de Chagas crônica. Iniciado em 2004, o estudo inclui 42 centros na Argentina, Bolívia, Brasil e Colômbia e constitui uma importante ferramenta para fornecer evidências que apoiem a utilização do tratamento etiológico na doença de Chagas crônica, assim que for concluído (MARIN-NETO et al., 2008, 2009).

#### 2.4.1 Novas abordagens para o acompanhamento laboratorial após o tratamento etiológico na doença de Chagas.

As técnicas laboratoriais utilizadas para o acompanhamento após o tratamento etiológico dos indivíduos na fase crônica são as mesmas recomendadas para o diagnóstico da fase aguda (métodos parasitológicos: hemocultura e xenodiagnóstico) e para o diagnóstico da doença na fase crônica (métodos sorológicos: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) (BRASIL, 2005; CANÇADO, 1999).

Contudo, mesmo após a eliminação do parasita existe uma retenção de antígenos do *T. cruzi* em células dendríticas, conduzindo a uma manutenção por

períodos prolongados do estímulo a síntese de anticorpos (ANDRADE et al., 1991), originando resultados sorológicos falsamente positivos. Outro mecanismo que pode acarretar erro no diagnóstico sorológico diz respeito ao possível mimetismo entre proteínas do coração e a superfície do parasita, ocorrendo manutenção dos anticorpos circulantes (GARCIA et al., 2005). Desta forma, as técnicas empregadas não são capazes de fornecer dados decisivos em um curto espaço de tempo quando aplicadas no grupo de indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas.

Um método alternativo seria o de Lise Mediada pelo Complemento (LMCo) para definição de cura. Este teste detecta anticorpos líticos que reconhecem os epítopos presentes na superfície de tripomastigotas vivos (CANÇADO, 1999). Para tal, tripomastigotas sanguíneos são obtidos de camundongos infectados ou de culturas de tecido para serem incubadas com o soro a ser testado. Para verificar a presença ou não dos anticorpos líticos a incubação é realizada com o soro ativado (fonte do complemento) e com o soro inativado por calor (37°C por 30min). Na ausência de anticorpos líticos a razão entre número de parasitas após incubação com soro ativado e com soro inativado será inferior a 20%. Trabalhos demonstram que os anticorpos líticos são os primeiros a surgirem com a infecção pelo *T. cruzi* (ISRAELSKI; SADLER; ARAÚJO, 1985) e também os primeiros a apresentar redução em seus títulos e/ou negativação após o tratamento etiológico (KRETTLI; BRENER, 1982).

Outro método que poderia ser utilizado para o acompanhamento destes indivíduos é a avaliação de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (lítico) através da citometria de fluxo. Martins-Filho et al. (1995) realizaram a quantificação dos anticorpos, por citometria de fluxo, de indivíduos portadores crônicos (i) não tratados, (ii) tratados que obtiveram cura e (iii) indivíduos com falha no tratamento. Para tal, o soro dos indivíduos portadores da doença de Chagas é utilizado para revestir formas tripomastigotas vivas e os anticorpos específicos são detectados por anticorpos conjugados a fluorocromos, onde é possível distinguir por esta técnica, indivíduos curados e não-curados (MARTINS-FILHO et al., 1995). Contudo, tanto a citometria de fluxo descrita no trabalho de Martins-Filho et al. (1995) quanto a LMCo, apresentam como desvantagem a necessidade de parasitas vivos para sua execução.

Por sua vez, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é um método que permite a detecção de pequenas quantidades de DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue.

Sua indicação na fase crônica está relacionada à confirmação de testes sorológicos duvidosos, para o controle de cura após o tratamento etiológico e em áreas onde exista infecção pelo *T. rangeli* (BRASIL, 2005). Britto et al. (1995) realizaram o monitoramento de indivíduos na fase crônica submetidos ao tratamento específico utilizando a técnica de PCR qualitativa como complemento para inquerito sorológico de cura. Nove dos 32 indivíduos tratados que mantiveram sorologia convencional reagente apresentaram PCR positiva, com o xenodiagnóstico sendo positivo em apenas 5 dos 9 indivíduos positivos na PCR. Uma vez que permitiu a identificação dos indivíduos nos quais não foi obtido sucesso no tratamento, os autores indicaram a PCR como instrumento útil para o acompanhamento de indivíduos após o tratamento etiológico (BRITTO et al., 1995). Em outro trabalho foi realizada uma comparação entre a PCR e o xenodiagnóstico 20 anos após o tratamento etiológico. Ao avaliarem 48 indivíduos na fase crônica foi observado que a PCR qualitativa apresentou-se positiva em 17 dos indivíduos, enquanto o xenodiagnóstico só confirmou a parasitemia em oito destes indivíduos PCR positivos (BRITTO et al., 2001), reforçando a PCR como potencial método diagnóstico na definição precoce de indivíduos tratados e não curados.

Tem recebido destaque a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) como método de acompanhamento da parasitemia em indivíduos portadores da doença de Chagas após o tratamento, uma vez que sua implementação para determinação da carga parasitária pode ser útil como indicador da resposta terapêutica (MARIN-NETO et al., 2009; MOREIRA et al., 2013; VALLEJO; REYES, 2005). Além de permitir o acompanhamento do decaimento na carga parasitária dos indivíduos, uma das grandes vantagens da utilização da qPCR para o acompanhamento após a quimioterapia é a possibilidade de verificar a falha terapêutica devido a seu caráter quantitativo. Diante disso, alguns estudos tem sido realizados com o objetivo de estabelecer uma técnica de qPCR adequada para esta finalidade, com alguns protocolos demonstrando sua potencialidade para o acompanhamento após tratamento etiológico (DUFFY et al., 2009, 2013; MOREIRA et al., 2013).

Contudo, apesar das vantagens apresentadas pela técnica da PCR, ela não deve ser única como critério de cura da doença de Chagas, uma vez que a ausência do parasita na amostra testada não significa necessariamente ausência de infecção ativa. O parasita pode persistir nos tecidos na forma amastigota ou estar circulante,

mais em tão baixa quantidade que sua obtenção exige coletas de amostras em períodos alternados (BRITTO et al., 2001). Sendo assim, existe ainda uma lacuna no que concerne o acompanhamento da população de indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas que é submetida ao tratamento etiológico.

#### 2.4.2 Resposta imune e o tratamento da infecção chagásica pelo benzonidazol

Correlacionando o comportamento da resposta imunológica contra o *T. cruzi* e a terapêutica tripanocida foi observado que o tratamento *in vivo* com benzonidazol interferiu na interação parasita-macrófagos. Em cobaias infectadas com cepa de *T. cruzi* susceptível ao medicamento (benzonidazol) foi observado, após o tratamento com o benzonidazol, um aumento da fagocitose, da destruição parasitária e da liberação de citocinas pelos macrófagos. Os esplenócitos destes animais infectados produziram níveis muito elevados de TNF- $\alpha$  e intermediários reativos de nitrogênio após o tratamento com o benzonidazol (MURTA et al., 1999). Células T CD8+ oriundas de camundongos tratados com benzonidazol e curados expandiram mais rapidamente e proporcionaram maior proteção em comparação a camundongos infectados cronicamente (BUSTAMANTE; BIXBY; TARLETON, 2008).

Já em humanos, ao avaliar cultura de sangue total após estimulação com antígenos de tripomastigota, foi demonstrada uma inversão no perfil de citocinas um ano após tratamento com o benzonidazol. Ocorreu uma redução na produção de IL-10 por células T CD4+ oriundas de indivíduos com a forma indeterminada e aumento de monócitos IL-10+ na forma cardíaca da doença de Chagas crônica. Os indivíduos portadores crônicos que apresentavam um perfil inflamatório antes do tratamento tiveram um aumento na produção de citocinas ditas regulatórias, enquanto que os indivíduos com perfil regulatório passaram a produzir mais citocinas inflamatórias (VITELLI-AVELAR et al., 2008).

Crianças em fase escolar infectadas com o *T. cruzi* e classificadas como estando recentemente na forma indeterminada foram tratadas com benzonidazol. Um ano após o tratamento foi observado, após estimulação *in vitro* com antígenos solúveis de epimastigota, uma modificação para um perfil Th1 modulado, com IFN- $\gamma$  sendo produzido principalmente por células NK e linfócitos T CD8+ (SATHLER-AVELAR et al., 2006). Também foi verificada uma substancial ativação de células T e B produtoras de IL-10 (SATHLER-AVELAR et al., 2008), demonstrando a

interferência do tratamento etiológico na resposta imune do hospedeiro (SATHLER-AVELAR et al., 2006, 2008).

Laucella et al. (2009) realizaram estudo longitudinal com dois grupos de indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas, um de crônicos assintomáticos e o outro com alteração no eletrocardiograma. Para tal, avaliaram células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) cultivadas na presença de lisado de *T. cruzi*. Foi observado que a produção de IFN- $\gamma$  por células T declinou um ano após o tratamento com benzonidazol, também ocorrendo um aumento na população de células T CD8+ de memória na maioria dos indivíduos avaliados (LAUCELLA et al., 2009).

Em dois grupos de indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas - tratados com o benzonidazol e não tratados - foi observado que o benzonidazol conduziu a um deslocamento do padrão de citocinas em monócitos, células NK e T CD8+ no sentido de um perfil de resposta do tipo Th1 modulada após estimulação com antígenos solúveis de epimastigota. Segundo os autores, tais achados demonstram a importância da utilização da medicação tripanocida em indivíduos portadores crônicos por indicar a ação do benzonidazol no sentido de manter um microambiente imunológico não deletério, prevenindo os danos teciduais oriundos de uma resposta imune exacerbada (SATHLER-AVELAR et al., 2012).

Mesmo diante de tais relatos, a utilização de métodos que investiguem as populações celulares ainda não foi estabelecida como ferramenta de avaliação dos indivíduos tratados com o benzonidazol. Estudos acerca das populações celulares dos indivíduos portadores crônicos antes e após o tratamento com o benzonidazol são extremamente importantes não só na compreensão da influência da medicação na resposta imune contra o *T. cruzi*, como também na identificação de marcadores imunológicos que possam permitir a definição de forma precoce e segura dos benefícios da utilização do tratamento específico. Desta forma, este estudo é pioneiro, sendo útil para a futura adoção de procedimentos de prevenção e terapêutica por parte do Sistema de Saúde aos indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas.

### 3 JUSTIFICATIVA

A dificuldade em diagnosticar a doença de Chagas em sua fase aguda faz com que a maioria dos indivíduos infectados evolua para a fase crônica sem receber o tratamento etiológico no período onde o *T. cruzi* está mais susceptível ao medicamento. Diante disto, estudos que venham a estabelecer condutas para melhoria da qualidade de vida dos indivíduos na fase crônica, tornam-se cada vez mais necessários, sendo recomendados pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005) e pelo Programa Integrado em Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz), do qual nosso grupo é atuante.

A literatura já demonstrou que o emprego do benzonidazol na fase crônica da doença de Chagas conduz a prevenção/controla da evolução para os quadros clínicos mais mórbidos desta enfermidade. Contudo, a aplicação da medicação nesta fase apresenta dificuldade pela diversidade de resultados controversos quanto aos reais benefícios. Aliado a isso, nenhum dos métodos diagnósticos atualmente preconizados para avaliação após o tratamento demonstram resultados contundentes para definir seu sucesso de forma precoce e segura. A necessidade de se dar maior suporte aos médicos assistentes, bem como um retorno aos indivíduos portadores crônicos que recebem o tratamento etiológico com o benzonidazol, demonstra a importância da busca de indicadores mais adequados.

Desta forma, nos propomos a investigar a resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol, com o intuito de demonstrar que a observação do comportamento imunológico pode permitir a identificação do impacto da terapêutica nesta fase da doença, podendo auxiliar na definição do tratamento etiológico como intervenção na doença de Chagas crônica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar a resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas antes a após o tratamento com o benzonidazol.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar fenotipicamente células da resposta imune no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*;
- b) Avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas por células imunes no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*;
- c) Avaliar a produção de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue total após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*.

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Tipo de Estudo

O estudo foi do tipo experimental “antes e depois” (intervenção não-controlado). Todos os indivíduos foram submetidos ao tratamento com o benzonidazol, sendo realizada a avaliação de padrões imunológicos antes do início e em dois momentos após o tratamento etiológico. A amostra foi definida a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (MEDRONHO, et al., 2009).

### 5.2 População do estudo

Indivíduos portadores da doença de Chagas crônica foram selecionados, no período de agosto de 2012 a dezembro de 2013 no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), da Universidade de Pernambuco (UPE), O ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos indivíduos portadores da doença de Chagas.

Para sua inclusão no trabalho, os indivíduos preencheram três critérios:

- 1) sorologia reagente para a infecção chagásica;
- 2) exames clínicos e laboratoriais para a caracterização das formas clínicas (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago. hemograma);
- 3) não ter sido submetido ao tratamento etiológico até sua inclusão no projeto de pesquisa.

A avaliação dos critérios de inclusão foi realizada em conjunto com médicos colaboradores deste projeto, sendo estes responsáveis pelo acompanhamento e tratamento dos indivíduos portadores da doença de Chagas. Os indivíduos incluídos no estudo foram aqueles que, mediante abordagem dos médicos responsáveis, aceitaram realizar o tratamento etiológico que é fornecido pelo Ministério da Saúde. Destacamos que o tratamento etiológico é oferecido ao portador da infecção chagásica como estratégia de cuidado segundo recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), não fazendo parte dos objetivos desenvolvidos neste



projeto. Para serem considerados aptos para o tratamento com o benzonidazol, os indivíduos portadores crônicos apresentaram hemograma normal e funções renal e hepática conservadas. O tratamento teve duração prevista de 60 dias, com dose recomendada de 5 mg/kg/dia, sendo a dose máxima diária de 300 mg. Contudo, parte dos indivíduos tratados não finalizou o esquema devido ao surgimento de efeitos colaterais atribuídos ao benzonidazol (Apêndice A).

Para classificação dos indivíduos portadores crônicos quanto à forma clínica os médicos utilizaram os critérios estabelecidos na I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (ANDRADE et al., 2011). Baseados nessa classificação, agrupamos os indivíduos incluídos no trabalho nos grupos IND e CARD (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação dos indivíduos com doença de Chagas crônica incluídos na pesquisa segundo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.

| GRUPOS  |  |
|---|--|
| IND   | CARD   |
| <p style="text-align: center;"><b>A</b></p> <p style="text-align: center;">Portadores sem sintomas presentes ou progressos de IC e com ECG e RX de tórax normal</p> | <p style="text-align: center;"><b>B1</b></p> <p style="text-align: center;">Portadores com alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias) e que não têm disfunção ventricular</p> |
|   | <p style="text-align: center;"><b>B2</b></p> <p style="text-align: center;">Portadores que já apresentam disfunção ventricular global, com FEVE reduzida</p>   |
|   | <p style="text-align: center;"><b>C</b></p> <p style="text-align: center;">Portadores com sintomas prévios ou atuais de IC, e que possuem disfunção ventricular</p>                                      |

Fonte: A autora.

Legenda: (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco; (IC) Insuficiência cardíaca; (ECG) Eletrocardiograma; (RX) Raio-X; (FEVE) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

A inclusão dos indivíduos portadores da doença de Chagas crônica no estudo foi realizada no momento de início do tratamento com o benzonidazol, totalizando 25 indivíduos incluídos. Contudo, quatro indivíduos não retornaram ao atendimento, o que impossibilitou a avaliação após a intervenção, caracterizando perda amostral. Um total de 21 indivíduos portadores crônicos foram avaliados ao final da pesquisa (n = 21; oito homens e treze mulheres; 31 - 48 anos). Deste total, em treze não foram observadas alterações clínicas, sendo classificados no grupo IND (n = 13; quatro homens e nove mulheres; 31 - 55 anos). Por sua vez, os oito indivíduos que apresentaram algum tipo de alteração cardíaca foram classificados no grupo CARD (n = 8; quatro homens e quatro mulheres; 34 - 58 anos). As características dos

pacientes que participaram desse estudo, assim como sua distribuição quanto à classificação clínica, estão descritas no Apêndice B.

### 5.3 Coleta de sangue

Foram coletados 9mL de sangue em tubos contendo heparina sódica (ensaios de imunofenotipagem e cultivo para obtenção de sobrenadante) e 4mL em tubo seco (testes sorológicos) de 21 indivíduos portadores da doença de Chagas crônica. As coletas foram realizadas antes do início do tratamento etiológico (T0:  $n_{\text{IND+CARD}} = 21/ n_{\text{IND}} = 13/ n_{\text{CARD}} = 8$ ) e após o término do tratamento em dois momentos: 2-3 meses (T1:  $n_{\text{IND+CARD}} = 21/ n_{\text{IND}} = 13/ n_{\text{CARD}} = 8$ ) e 5-6 meses após (T2:  $n_{\text{IND+CARD}} = 16/ n_{\text{IND}} = 9/ n_{\text{CARD}} = 7$ ).

### 5.4 Sorologia para infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados dois testes de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Um constituído por mistura de antígenos do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III) proveniente de Bioschile Ingenieria Genetica S.A. O outro teste utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Imuno-ELISA Chagas) proveniente de Wama Diagnóstica. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentaram reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentaram reatividade (BRASIL, 2005). Apenas os indivíduos que apresentaram os dois testes reagentes foram incluídos no estudo, com resultados sorológicos inconclusivos ou discordantes sendo critérios de exclusão da pesquisa.

Os testes sorológicos foram realizados com o apoio do Serviço de Referência no Diagnóstico da Doença de Chagas (SRDC) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE).

### 5.5 Antígeno solúvel de epimastigota

Os antígenos solúveis foram obtidos segundo Pereira et al. (2000). Para Isso, epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) e mantidas em estufa incubadora a 27°C. Após sete dias de cultivo, os

parasitos foram então lavados em solução salina (*Phosphate buffered saline*-PBS 0,15 M; pH 7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada. Posteriormente a massa foi ressuspensa em inibidor de protease (*Phenylmethanesulfonylfluoride*-PMSF 1 mM e *Ethylenediamine tetraacetic acid*- EDTA 1 mM), sendo realizada a ruptura dos parasitos através de quatro ciclos de repetição do processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após esta etapa, o lisado foi centrifugado a 10.000xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi submetido então à centrifugação a 100.000xg por 60min a 4°C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) do antígeno de epimastigota (EPI). Após esterilização por filtração do antígeno solúvel de EPI em filtro Millipore 0,45 µm foi realizada a dosagem de proteína (kit DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories), com posterior armazenamento a -70°C até o momento de sua utilização (PEREIRA et al., 2000).

## 5.6 Cultivo celular

Um mililitro de sangue total heparinizado foi cultivado em meio RPMI 1640 (Sigma) acrescido de solução de Penicilina/ Estreptomicina a 1% (Sigma), na presença de fitohemaglutinina (PHA – 5 µg/mL), do antígeno solúvel de EPI (25 µg/mL) e sem estímulo (controle negativo). O volume final das culturas foi de 2 mL, sendo incubadas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por 24h (LORENA et al., 2010). Nas quatro horas que antecederam o final do cultivo celular, brefeldina A (10 µg/mL) foi adicionada aos tubos. A utilização da brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior celular, uma vez que esta substância interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991).

## 5.7 Imunofenotipagem

O impacto do tratamento etiológico em alguns aspectos da resposta imune de indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas foi analisado no total de indivíduos ( $n_{\text{IND+CARD}} = 21$ ), bem como nos grupos clínicos separadamente ( $n_{\text{IND}} = 13$ ;  $n_{\text{CARD}}=8$ ), em diferentes circunstâncias. A primeira, que definimos como *ex vivo*,

permitiu observarmos a ação do benzonidazol na resposta imunológica basal destes indivíduos. Por sua vez, o cultivo celular na presença de antígeno solúvel de epimastigota, antes e após o tratamento, possibilitou a avaliação do impacto do benzonidazol na resposta imune direcionada ao *T. cruzi*, sendo esta definida como avaliação EPI. Também realizamos cultivo celular na ausência de estímulo antigênico (cultura controle - CC), para observar o comportamento celular após o cultivo.

### 5.7.1 Contexto *Ex vivo*

Sangue heparinizado (100 µL) foi adicionado em tubos de poliestireno devidamente identificados contendo anticorpos monoclonais de superfície (Tabela 2). Após incubação de 30min ao abrigo da luz, foram realizados os procedimentos de lise de eritrócitos, lavagens, permeabilização, incubação com os anticorpos intracitoplasmáticos e fixação (Quadro 2). Após estes procedimentos as células foram então estocadas a 4°C até o momento da utilização do citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickson Immunocytometry Systems).

Quadro 2 - Anticorpos utilizados na imunofenotipagem.

| Anticorpo      | Clone     | Isotipo        | Fluorocromo | Titulação (µL) |
|----------------|-----------|----------------|-------------|----------------|
| CD3            | S4.1      | Mouse IgG2a    | PE          | 2,5            |
| CD4            | S3.5      | Mouse IgG2a    | PercP       | 2,5            |
| CD5            | CD5-5D7   | Mouse IgG1     | APC         | 2,5            |
| CD8            | 3B5       | Mouse IgG2a    | FITC        | 2,5            |
| CD14           | Tük4      | Mouse IgG2a    | FITC        | 5,0            |
| CD16           | 3G8       | Mouse IgG1     | PercP       | 2,5            |
| CD19           | SJ25-C1   | Mouse IgG1     | FITC        | 2,5            |
| CD25           | CD25-3G10 | Mouse IgG1     | APC         | 2,0            |
| CD28           | 10F3      | Mouse IgG1     | PE          | 2,5            |
| CD56           | MEM-188   | Mouse IgG2a    | FITC        | 2,5            |
| CD80           | MEM-233   | Mouse IgG1     | PE          | 2,5            |
| CD86           | BU63      | Mouse IgG1     | APC         | 2,5            |
| CD152 *        | BN13      | Mouse IgG2a, κ | APC         | 20             |
| FoxP3 *        | 259D/C7   | Mouse IgG1     | PE          | 20             |
| HLA-DR         | TÜ36      | Mouse IgG2b    | PercP       | 2,5            |
| IFN-γ * (1:30) | B17       | Mouse IgG1, κ  | APC         | 20             |
| IL-10 * (1:30) | JES3-19F1 | Rat IgG2a      | PE          | 20             |

Fonte: A autora.

Legenda: (CD) *Cluster of differentiation*; (IL) Interleucina; (IFN-γ) Interferon gama; (APC) Alociocianina; (FITC) Isotiocianato de fluoresceína; (PE) Ficoeritrina; (PercP) Proteína Clorofila Peridina; (\*) anticorpos intracitoplasmáticos.

### 5.7.2 Contexto *In vitro*

Após o período de incubação as culturas foram tratadas com 220 µL de EDTA (20 mM) por 10min à temperatura ambiente. Em seguida aos tubos foram adicionado cerca de 8 mL de PBS-Wash (PBS adicionado de albumina sérica bovina a 0,5% e azida sódica a 1%). Os tubos foram então centrifugados a 400xg por 10min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com auxílio de bomba a vácuo, restando o volume final de 1 mL no tubo. Cem microlitros da suspensão celular foram depositados em tubos de poliestireno contendo os anticorpos de superfície. Os anticorpos de superfície e intracitoplasmáticos assim como as etapas do protocolo experimental para imunofenotipagem das culturas celulares foram realizados de forma semelhante ao descrito para o ensaio de imunofenotipagem no contexto *ex vivo*.

### 5.8 Aquisição celular e análise do fenótipo por citometria de fluxo

As populações celulares, bem como suas marcações de superfície e intracitoplasmáticas estão descritas no Quadro 3. Também foi realizada a análise da produção intracitoplasmática das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  em alguns tipos celulares (Quadro 4).

Quadro 3 - Marcação de superfície e intracitoplasmática dos tipos celulares avaliados.

| <b>Tipo Celular</b>          | <b>Marcação</b>  |
|------------------------------|--|
| <b>B convencional</b>        | CD5+CD19+  |
| <b>B1</b>                    | CD5-CD19+  |
| <b>Natural Killer naive</b>  | CD3-CD16+CD56+   |
| <b>Natural Killer madura</b> | CD3-CD16+CD56-   |
| <b>T CD4</b>                 | CD4+CD28+<br>CD4+CD152+  |
| <b>T CD8</b>                 | CD8+CD28+<br>CD8+CD152+  |
| <b>Monócitos</b>             | CD14+CD80+<br>CD14+CD86+<br>CD14+HLA-DR+   |
| <b>T regulatório natural</b> | CD4+CD25+<br>CD4+CD25high<br>CD4+FoxP3+<br>CD4+CD25+FoxP3+<br>CD4+CD25+FoxP3high |

Fonte: A autora.

Nota: (CD) *Cluster of differentiation*; (FoxP3) *Forkhead Box P3*.

Quadro 4 - Tipos celulares avaliados quanto à produção de citocinas.

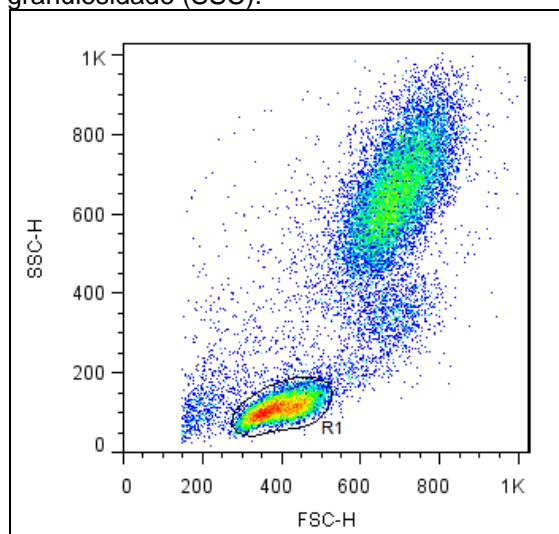
| <b>Tipo Celular</b> | <b>Marcação</b>                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| <b>T CD4</b>        | CD4+IFN- $\gamma$ +<br>CD4+IL-10+   |
| <b>T CD8</b>        | CD8+IFN- $\gamma$ +<br>CD8+IL-10+   |
| <b>B</b>            | CD19+IFN- $\gamma$ +<br>CD19+IL-10+ |

Fonte: A autora.

Nota: (CD) *Cluster of differentiation*; (IL) Interleucina; (IFN- $\gamma$ ) Interferon gama.

As populações de células B, *Natural killer* (NK) e T foram selecionadas através de *dot plot* FSC (*Forward Scatter*) versus SSC (*Side Scatter*), sendo adquiridos 10.000 eventos dentro da janela R1 (Figura 4).

Figura 4 - Exemplo de aquisição demonstrando os parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC).

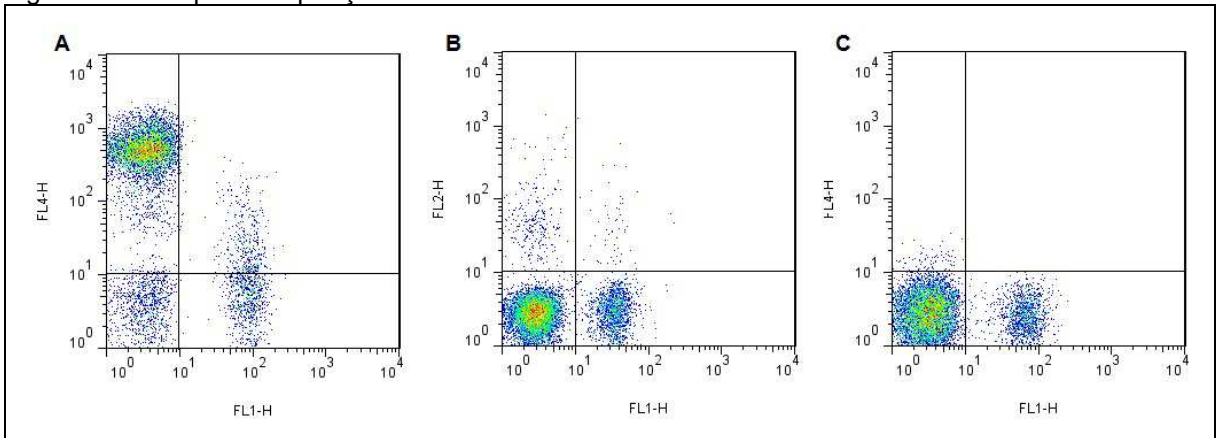


Fonte: A autora.

Legenda: R1 – Marcação realizada para determinar a população celular que se pretende analisar.

Após a seleção da janela de interesse (R1), as marcações de superfície (anti-CD3-PE, anti-CD4-PercP, anti-CD5-APC, anti-CD8-FITC, anti-CD16-PercP, anti-CD19-FITC, anti-CD25-APC, anti-CD28-PE e anti-CD56-FITC), bem como as intracitoplasmáticas (anti-CD152-APC, anti-FoxP3-PE, anti-IL-10-PE e anti-IFN- $\gamma$ -APC) foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência para as populações de células B (Figuras 5), NK (Figura 6), T CD4+ (Figura 7), T CD8+ (Figura 8), T regulatórias (Figura 9).

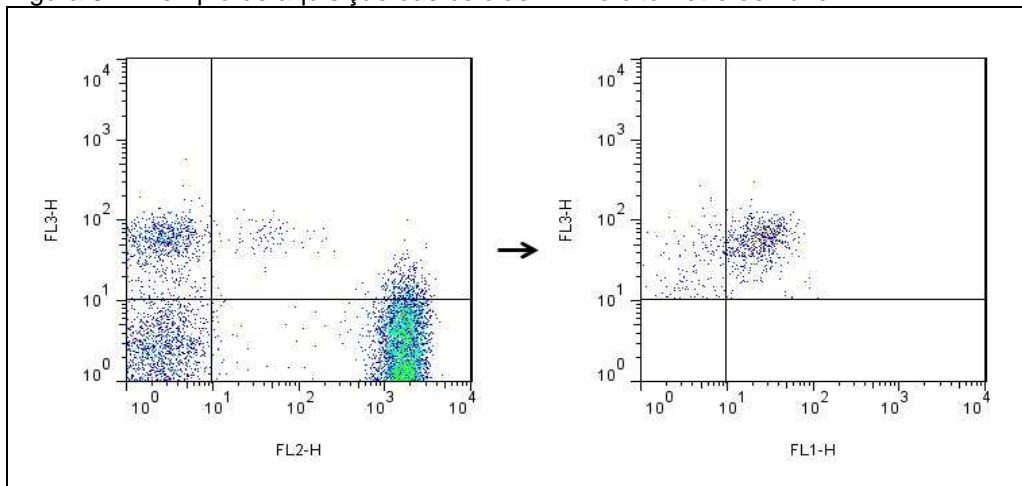
Figura 5 - Exemplo de aquisição dos linfócitos B no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) FL4 versus FL1, demonstrando a marcação de CD5 versus CD19. (B) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação CD19 versus IL-10. (C) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação CD19 versus IFN- $\gamma$ .

Figura 6 - Exemplo de aquisição das células NK no citômetro de fluxo.

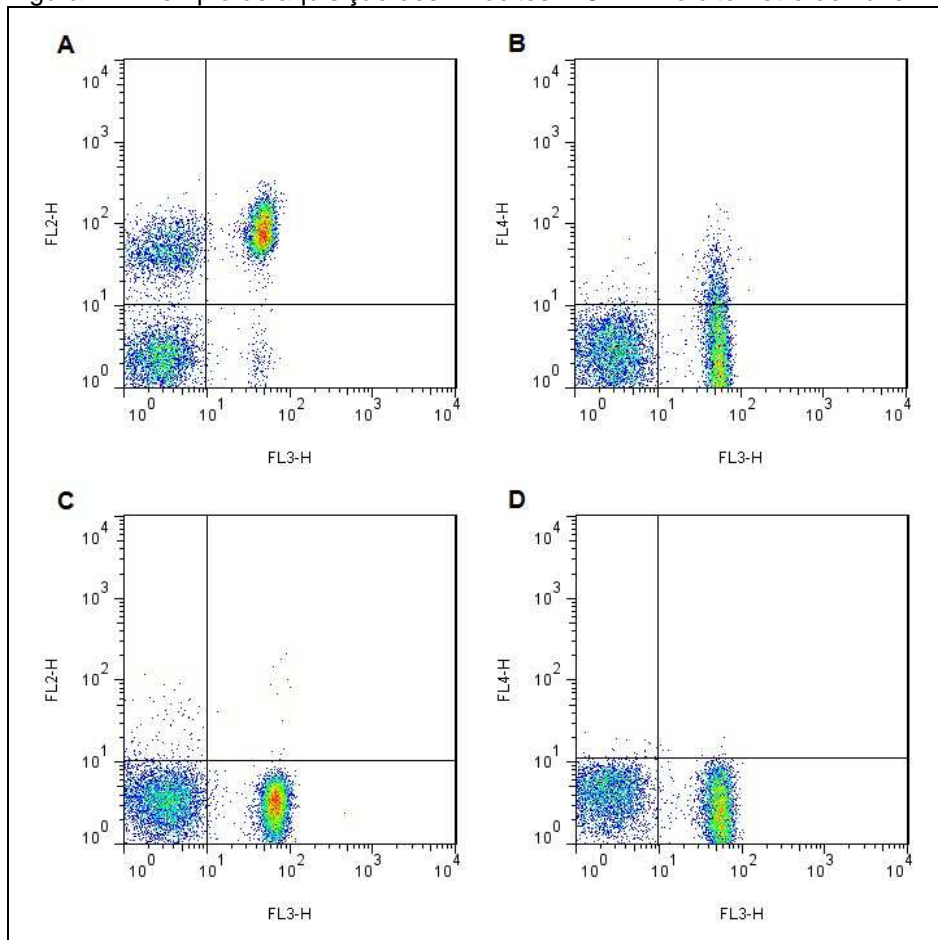


Fonte: A autora.

Legenda: FL2 versus FL3, demonstrando a marcação CD3 versus CD16, sendo selecionada nesse gráfico o quadrante 4 para posterior análise de células triplamente marcadas (CD3- CD16+ CD56-).



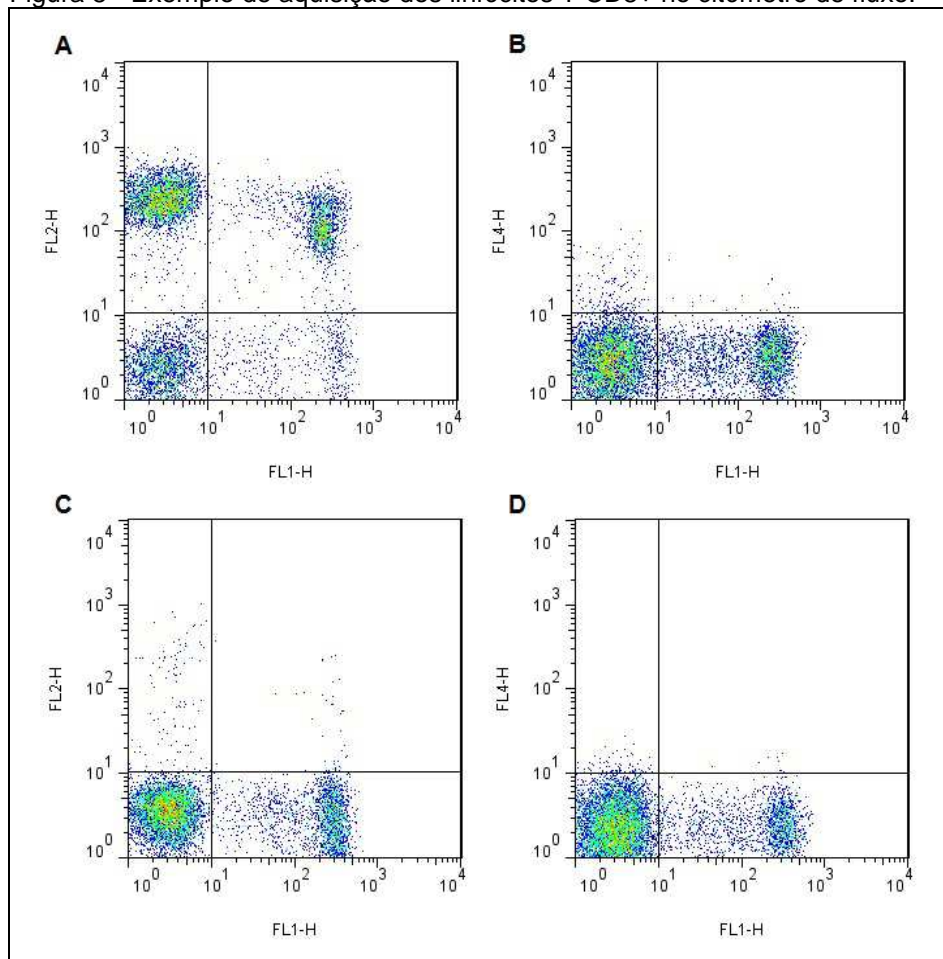
Figura 7 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4+ no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) FL3 versus FL2, demonstrando a marcação CD4 versus CD28. (B) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4 versus CD152). (C) FL3 versus FL2, demonstrando a marcação CD4 versus IL-10. (D) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4 versus IFN- $\gamma$ .

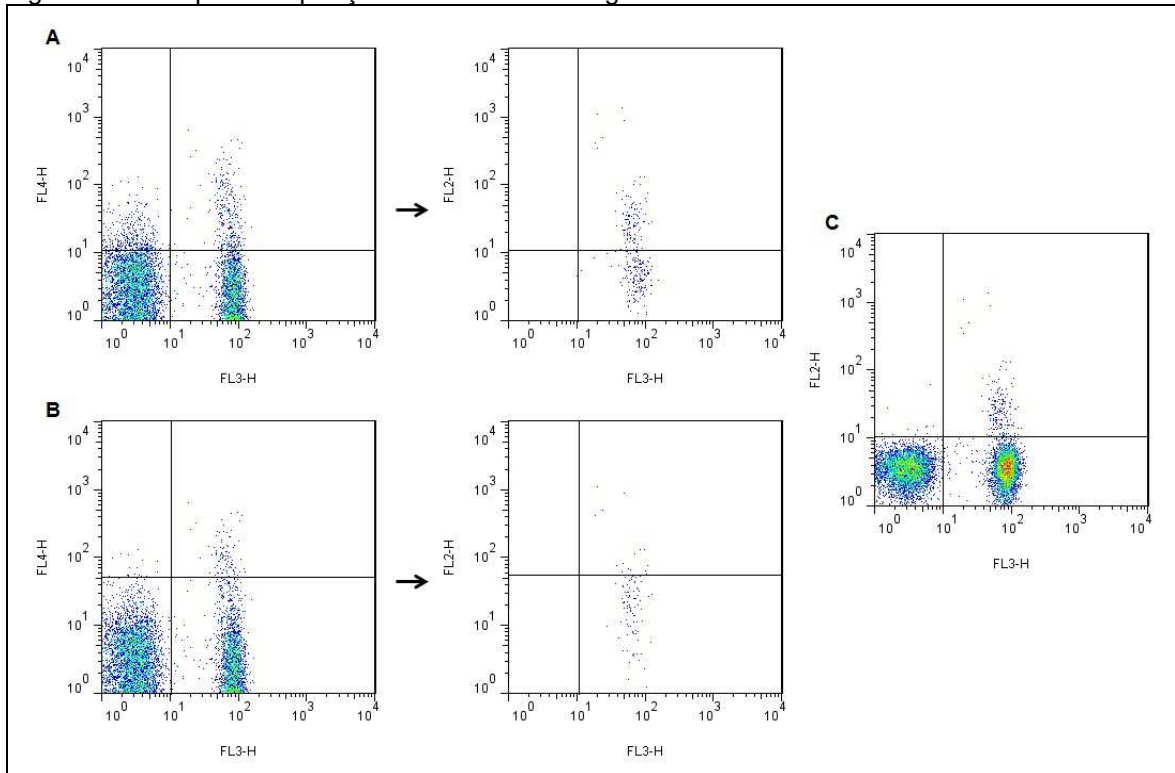
Figura 8 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD8+ no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação CD8 versus CD28. (B) FL1 versus FL4, demonstrando a marcação CD8 versus CD152). (C) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação CD8 versus IL-10. (D) FL1 versus FL4, demonstrando a marcação CD8 versus IFN- $\gamma$ .

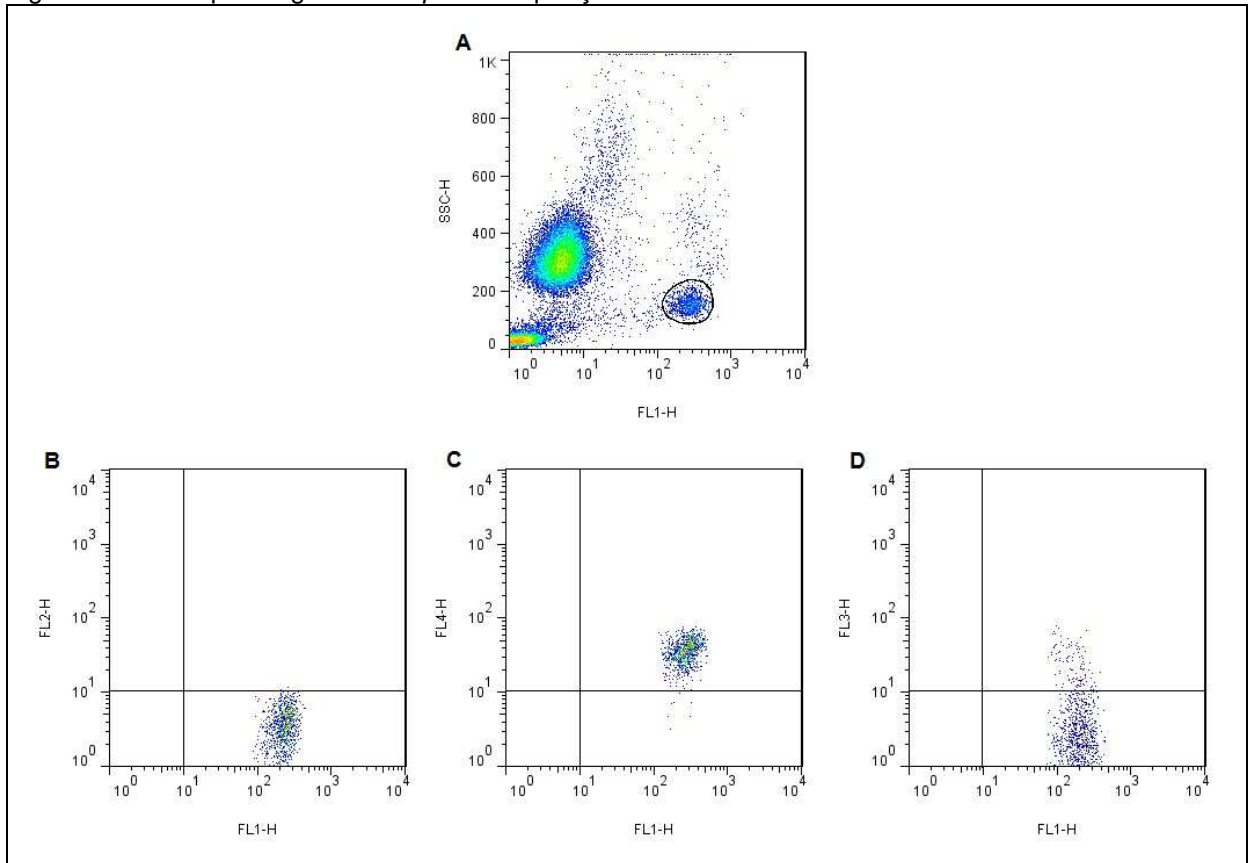
Figura 9 - Exemplo de aquisição dos linfócitos T regulatórios no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4 versus CD25, sendo selecionada nesse gráfico o quadrante 2 para posterior análise de células triplamente marcadas (CD4xCD25xFoxP3) (B) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4 versus CD25, sendo selecionada nesse gráfico o quadrante 2 para posterior análise de células triplamente marcadas (CD4xCD25highxFoxP3). (C) FL3 versus FL2, demonstrando a marcação de CD4 versus FoxP3.

Para a população de monócitos foram adquiridos 1.000 eventos dentro da janela R1 no *dot plot* SSC versus FL1. Os monócitos CD14+CD80+, CD14+CD86+ e CD14+HLA-DR+ foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 10).

Figura 10 - Exemplo de gráfico *dot plot* da aquisição de monócitos no citômetro de fluxo.

Fonte: A autora.

Legenda: (A) SSC versus FL1 (CD14), demonstrando a marcação para monócitos. (B) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação de CD14+ versus CD80+. (C) FL1 versus FL4, demonstrando a marcação de CD14+ versus CD86+; (D) FL1 versus FL3, demonstrando a marcação de CD14+ versus HLA-DR+.

### 5.9 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura

Os sobrenadantes de cultura celular foram coletados quatro horas antes do término do tempo de incubação, com as alíquotas de sobrenadante sendo devidamente identificadas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento do ensaio. Para determinação das citocinas no sobrenadante das culturas foi utilizado o *kit* BD™ *Cytometric Bead Array - CBA Human Th1/Th2 Cytokine* (BD Biosciences, Califórnia) que permitiu a avaliação das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10. Para realizar o ensaio, foi adicionado o mix das *beads* de captura aos tubos do ensaio, as diluições padrão do *kit* aos tubos controle, as amostras clínicas e o reagente de detecção, com posterior incubação por três horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O conteúdo dos tubos foi então lavado (tampão de lavagem) por centrifugação, com posterior descarte do sobrenadante, sendo adicionado

novamente o tampão de lavagem para armazenamento e posterior análise por citometria de fluxo.

### **5.10 Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5.0. Para testar a hipótese de normalidade foi utilizado o teste D'Agostino-Pearson. Os dados que apresentaram como verdadeira a hipótese foram considerados paramétricos, sendo empregado o teste T pareado. Aos dados que não demonstraram como verdadeira a hipótese de normalidade foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon para amostras não-paramétricas. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C). Todas as informações sobre o projeto de pesquisa foram fornecidas individualmente antes da coleta de sangue, com o intuito de explicar os objetivos do trabalho e esclarecer que os indivíduos eram livres para se recusarem a participar do estudo, bem como se retirarem quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico feito no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE. A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (CAEE: 0045.0.095.000-11; Anexo A). Os quatro indivíduos que não retornaram para a coleta após a intervenção (perda amostral) não tiveram nenhum comprometimento quanto ao seu acompanhamento médico.

## 7 RESULTADOS

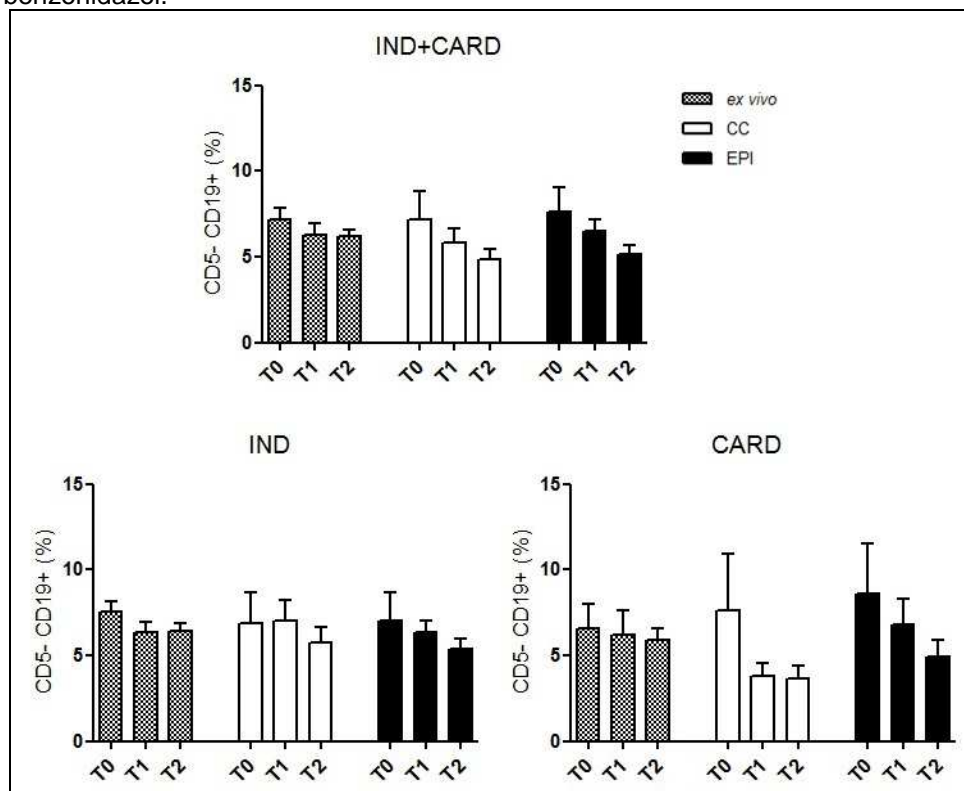
### 7.1 Caracterização fenotípica de células da resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*, antes e após o tratamento com o benzonidazol

Foram avaliados marcadores para as populações de células B, *Natural killer*, T CD4+, T CD8+, monócitos e Treg, antes e após a intervenção com o benzonidazol, em portadores crônicos da doença de Chagas.

#### 7.1.1 Células B

Realizamos a caracterização de duas linhagens de células B, a B convencional (CD5-CD19+) e a B1 (CD5+CD19+), dentro da população de linfócitos. Não foi observada diferença estatística quanto ao percentual de células B CD5-CD19+ em nenhuma das análises realizadas (Figura 11).

Figura 11 - Caracterização da produção de linfócito B convencional (CD5-CD19+) em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica (cultura controle); (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.

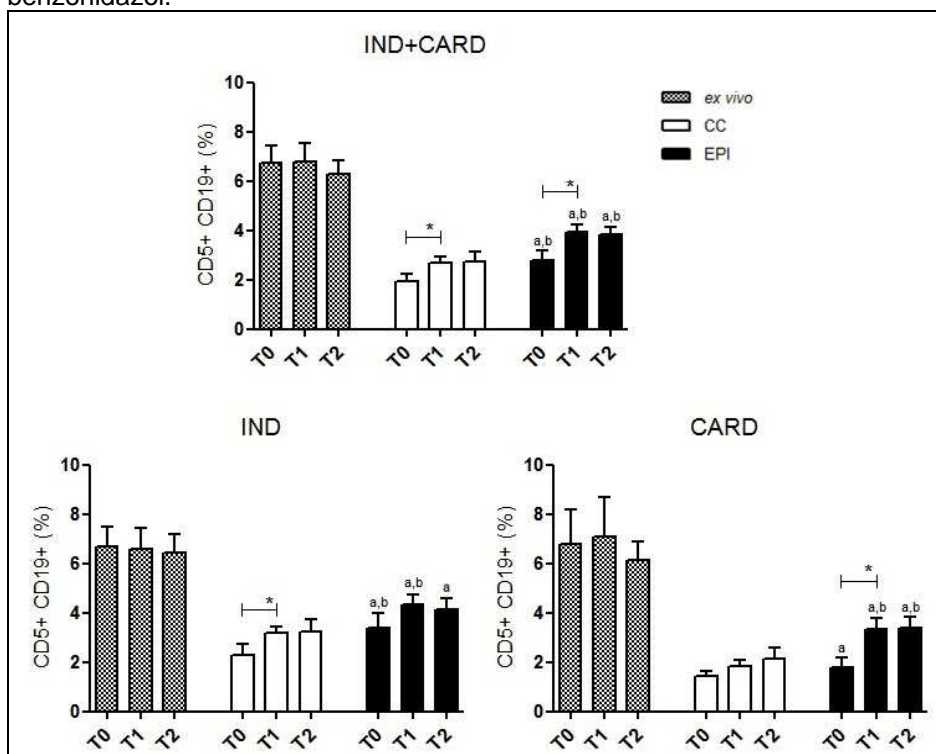
Quanto ao percentual de linfócitos B1, houve um aumento significativo na população celular logo após o tratamento em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0101$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0009$ / IND:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0327$ / CARD:  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0078$ ) (Figura 12).

Na comparação *ex vivo versus* EPI, a elevada produção após estímulo com o antígeno foi mantida após o tratamento etiológico em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0} = 0,0002$ ;  $p_{T1} = 0,0007$ ;  $p_{T2} < 0,0001$ / IND:  $p_{T0} = 0,0046$ ;  $p_{T1} = 0,0203$ ;  $p_{T2} = 0,0039$ / CARD:  $p_{T0} = 0,0078$ ;  $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ). Na avaliação CC *versus* EPI, houve um maior percentual de células B CD5+CD19+ nas culturas estimuladas com o antígeno no grupo IND+CARD em todos os momentos avaliados ( $p_{T0} = 0,0123$ ;  $p_{T1} = 0,0006$ ;  $p_{T2} = 0,0119$ ). Para o grupo IND, a diferença que existia antes



e logo após a intervenção ( $p_{CC \times EPI[T0]} = 0,0327$ ;  $p_{CC \times EPI[T1]} = 0,0081$ ), não ocorreu no momento T2. Por sua vez, o grupo CARD demonstrou elevação no percentual de linfócitos B1 após o tratamento ( $p_{CC \times EPI[T1]} = 0,0391$ ;  $p_{CC \times EPI[T2]} = 0,0156$ ) (Figura 12).

Figura 12 - Caracterização da produção de linfócitos B1 (CD5+CD19+) em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

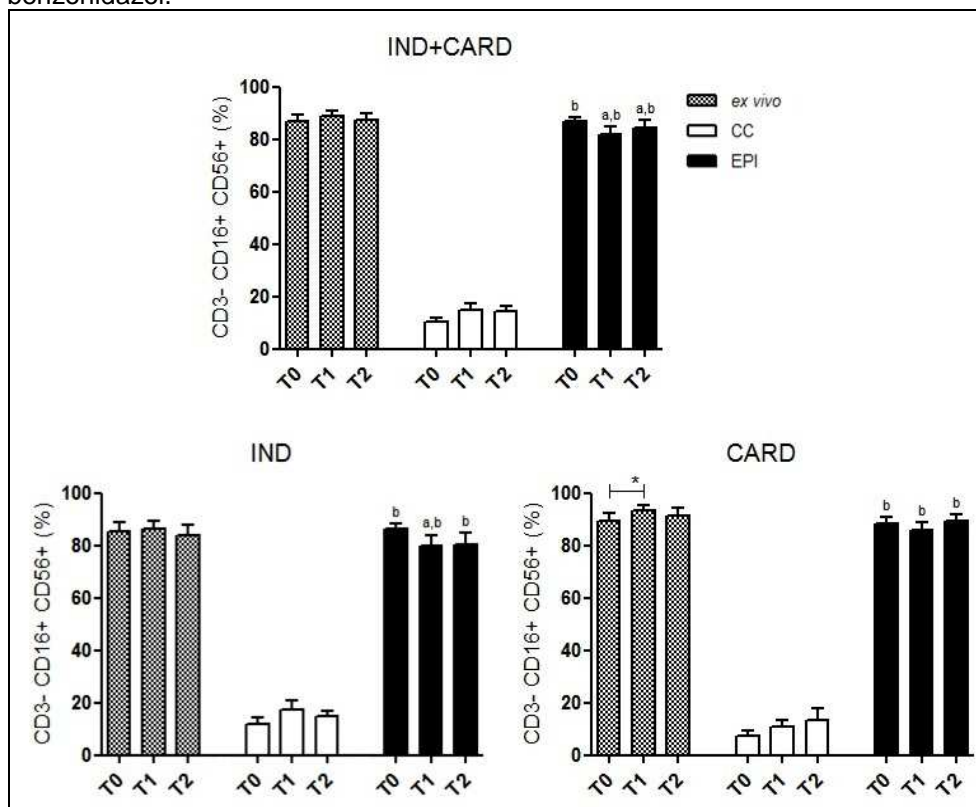
### 7.1.2 Células *Natural Killer*

Realizamos a caracterização de dois sub-tipos de células *Natural killers*: NK *naive* (CD3-CD16+CD56+) e NK madura (CD3-CD16+CD56-).

Apenas o grupo CARD demonstrou aumento percentual das células NK CD3-CD16+CD56+ logo após a intervenção com o benzonidazol ( $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0249$ ) (Figura 13).

Contudo, IND+CARD e IND apresentaram valores significativamente menores quanto à produção destas células após estímulo com EPI em relação ou contexto *ex vivo* ( $p_{IND+CARD[T1]} = 0,0044$ ;  $p_{IND+CARD[T2]} = 0,0332$ ;  $p_{IND[T1]} = 0,0306$ ) após o tratamento. O maior percentual celular apresentado na cultura estimulada com o antígeno *versus* CC demonstrado no momento T0 ( $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} < 0,0001$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ ), se manteve após o tratamento com o benzonidazol (T1:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} < 0,0001$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0005$ ;  $p_{IND} < 0,0001$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ) (Figura 13).

Figura 13 - Caracterização da produção de células NK CD3-CD16+CD56+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

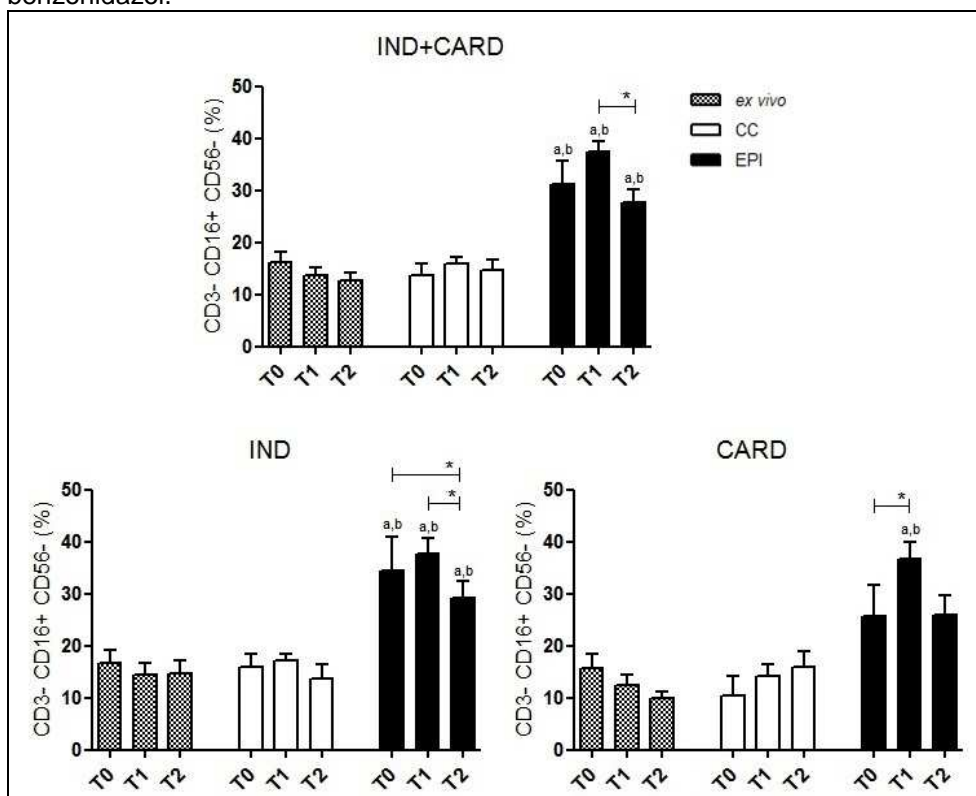
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

Os grupos IND+CARD e IND apresentaram redução tardia do percentual de células NK CD3-CD16+CD56- (IND+CARD:  $p_{T1 \times T2[EPI]} = 0,0020$ / IND:  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0391$ ;  $p_{T1 \times T2[EPI]} = 0,0039$ ). Por sua vez, nos indivíduos do grupo CARD ocorreu um aumento significativo destas células logo após o término do tratamento etiológico ( $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0391$ ) (Figura 14).

Nas comparações EPI versus *ex vivo* e EPI versus CC nos grupos IND+CARD e IND, o maior percentual celular apresentado antes do tratamento pelas culturas estimuladas com o antígeno (IND+CARD:  $p_{EX \times EPI[T0]} = 0,0038$ ;  $p_{CC \times EPI[T0]} = 0,0004$ / IND:  $p_{EX \times EPI[T0]} = 0,0179$ ;  $p_{CC \times EPI[T0]} = 0,0060$ ) foi mantido após a intervenção

(IND+CARD:  $p_{EXxEPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} < 0,0001$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} = 0,0001$ / IND:  $p_{EXxEPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0018$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0002$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} = 0,0007$ ). Já o grupo CARD demonstrou esta diferença apenas após o término do tratamento (T1:  $p_{EXxEPI} = 0,0078$ ;  $p_{CCxEPI} = 0,0078$ ) (Figura 14).

Figura 14 - Caracterização da produção de células NK CD3-CD16+CD56- em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

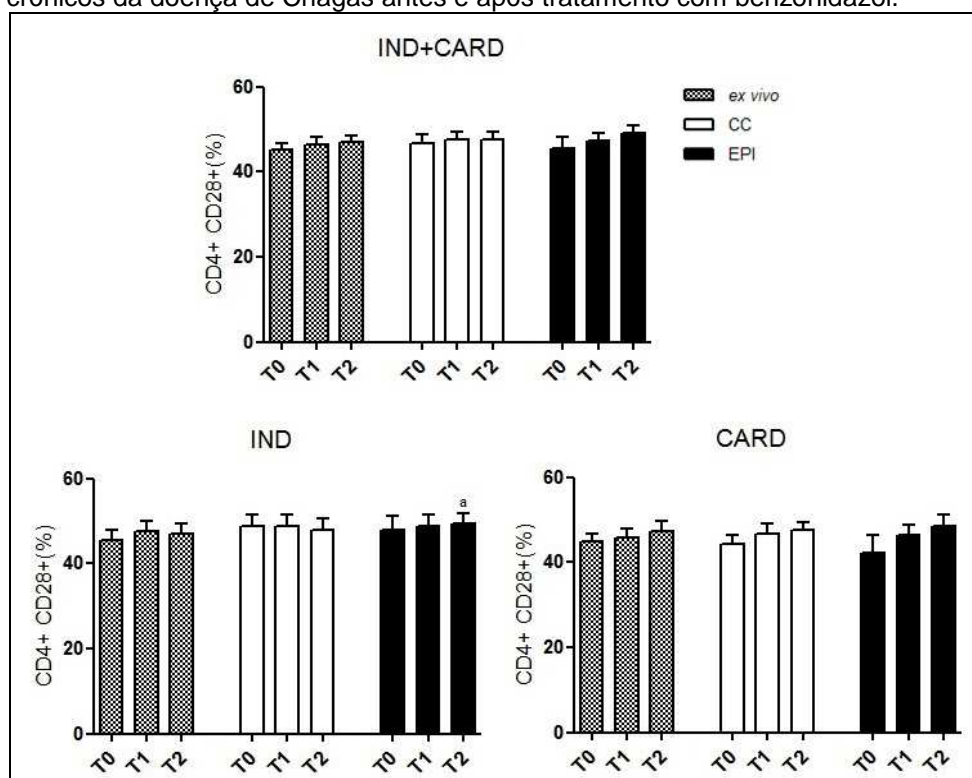
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

### 7.1.3 Expressão de CD28 e CD152 em células T CD4+ e CD8+

Realizamos a análise da produção de CD28 e CD152, moléculas relacionadas, respectivamente, ao processo de ativação e inibição do ciclo celular em linfócitos T CD4+.

Não verificamos alteração no percentual de linfócitos T CD4+CD28+ após o tratamento em nenhum dos grupos avaliados. Contudo, o grupo IND apresentou aumento significativo desta população celular após estímulo com EPI em relação a avaliação *ex vivo* no momento T2 ( $p = 0,0479$ ) (Figura 15).

Figura 15 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD28+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

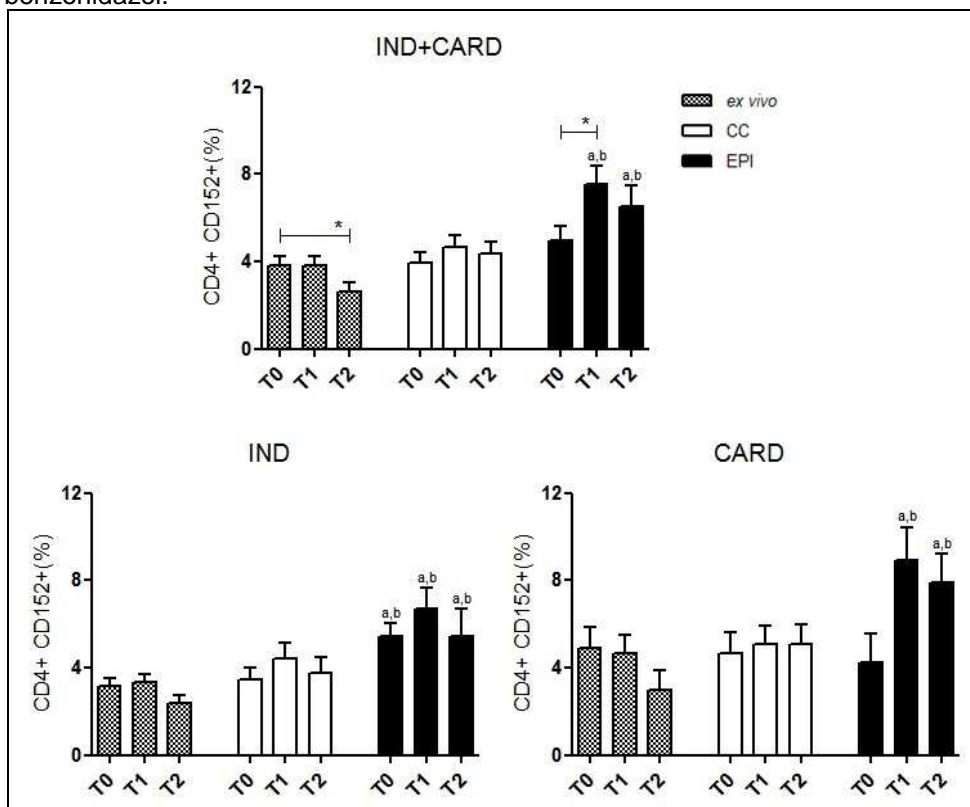
Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (*ex vivo*) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* e EPI estão indicados pela letra "a".

Quanto à população de células T CD4+CD152+, foi observado resultado divergente entre as avaliações *ex vivo* e EPI ao analisarmos os dados do grupo IND+CARD. Enquanto que na primeira houve uma redução significativa da população celular após o uso do benzonidazol ( $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0362$ ), ocorreu um aumento no percentual de linfócitos T CD4+CD152+ estimulados pelo antígeno de *T. cruzi* ( $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0261$ ) (Figura 16).

Quando analisamos os grupos de indivíduos IND+CARD e CARD, a elevada produção destas células após cultivo celular com o antígeno EPI em comparação com *ex vivo* e com CC surgiu logo após o tratamento (IND+CARD:  $p_{EX \times EPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{CC \times EPI[T1]} < 0,0001$ / CARD:  $p_{EX \times EPI[T1]} = 0,0078$ ;  $p_{CC \times EPI[T1]} = 0,0078$ ) e foi mantida na avaliação subsequente (IND+CARD:  $p_{EX \times EPI[T2]} = 0,0006$ ;  $p_{CC \times EPI[T2]} = 0,0010$ / CARD:  $p_{EX \times EPI[T2]} = 0,0156$ ;  $p_{CC \times EPI[T2]} = 0,0156$ ). Contudo, o grupo IND já demonstrava este elevado percentual de linfócitos T CD4+CD152+ mesmo antes do tratamento ( $p_{EX \times EPI[T0]} = 0,0060$ ;  $p_{CC \times EPI[T0]} = 0,0014$ ), mantendo esta diferença nas avaliações pós-tratamento etiológico ( $p_{EX \times EPI[T1]} = 0,0006$ ;  $p_{CC \times EPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{EX \times EPI[T2]} = 0,0078$ ;  $p_{CC \times EPI[T2]} = 0,0273$ ) (Figura 16).

Figura 16 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD152+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

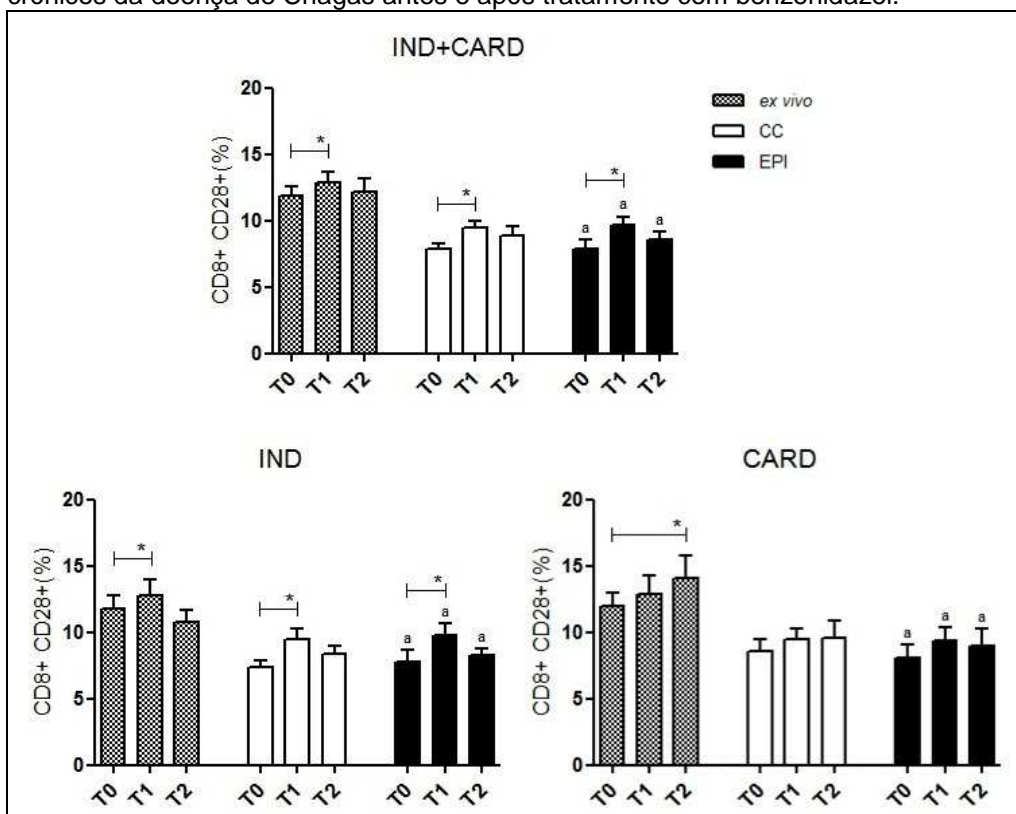
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

Também avaliamos a expressão de CD28 e CD152 em linfócitos T CD8+. Observamos aumento na produção de linfócitos T CD8+CD28+ logo após o tratamento em todas as avaliações realizadas nos grupos IND+CARD ( $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0096$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0020$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0048$ ) e IND ( $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0171$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0034$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0081$ ). Porém, o grupo CARD só demonstrou este aumento de forma significativa na avaliação *ex vivo* ( $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0313$ ) (Figura 17).

A elevada produção de células T CD8+CD28+ no contexto *ex vivo* em comparação com a avaliação após estímulo com antígeno (EPI) observada antes do tratamento (T0:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} < 0,0001$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ ), foi mantida após

a intervenção (T1:  $p_{\text{IND+CARD}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{IND}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{CARD}} = 0,0078$ / T2:  $p_{\text{IND+CARD}} = 0,0006$ ;  $p_{\text{IND}} = 0,0078$ ;  $p_{\text{CARD}} = 0,0156$ ) (Figura 17).

Figura 17 - Caracterização da produção de linfócitos T CD8+CD28+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (*ex vivo*) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota. Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* e EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a".

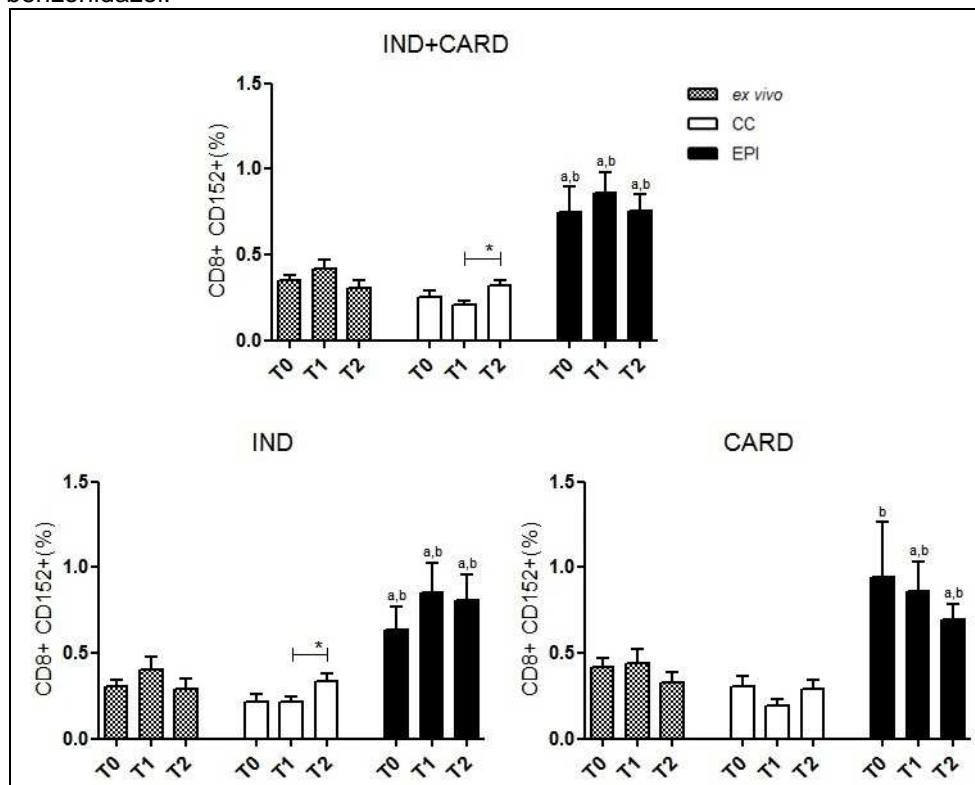
Quanto às células T CD8+CD152+, verificamos aumento tardio do percentual destes linfócitos apenas na CC dos grupos IND+CARD ( $p_{\text{T1XT2[CC]}} = 0,0165$ ) e IND ( $p_{\text{T1XT2[CC]}} = 0,0391$ ) (Figura 18).

Destacamos que no grupo CARD a elevada produção de linfócitos T CD8+CD152+ após estímulo com antígeno de epimastigota em comparação com a avaliação *ex vivo* surgiu apenas após o tratamento etiológico ( $p_{\text{EXxEPI[T1]}} = 0,0234$ /  $p_{\text{EXxEPI[T2]}} = 0,0469$ ). Enquanto que, para os grupos IND+CARD e IND, esta elevação



não sofreu alterações após a intervenção (IND+CARD:  $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0049$ ;  $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0022$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} < 0,0001$ / IND:  $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0215$ ;  $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0215$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0018$ ). O maior percentual de células T CD8+CD152+ estimuladas com EPI na comparação com CC foi mantido em todos os grupos avaliados após o tratamento (IND+CARD:  $p_{CCxEPI[T0]} < 0,0001$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} < 0,0001$ / IND:  $p_{CCxEPI[T0]} = 0,0005$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0002$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} = 0,0095$ / CARD:  $p_{CCxEPI[T0]} = 0,0078$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0078$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} = 0,0156$ ) (Figura 18).

Figura 18 - Caracterização da produção de linfócitos T CD8+CD152+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

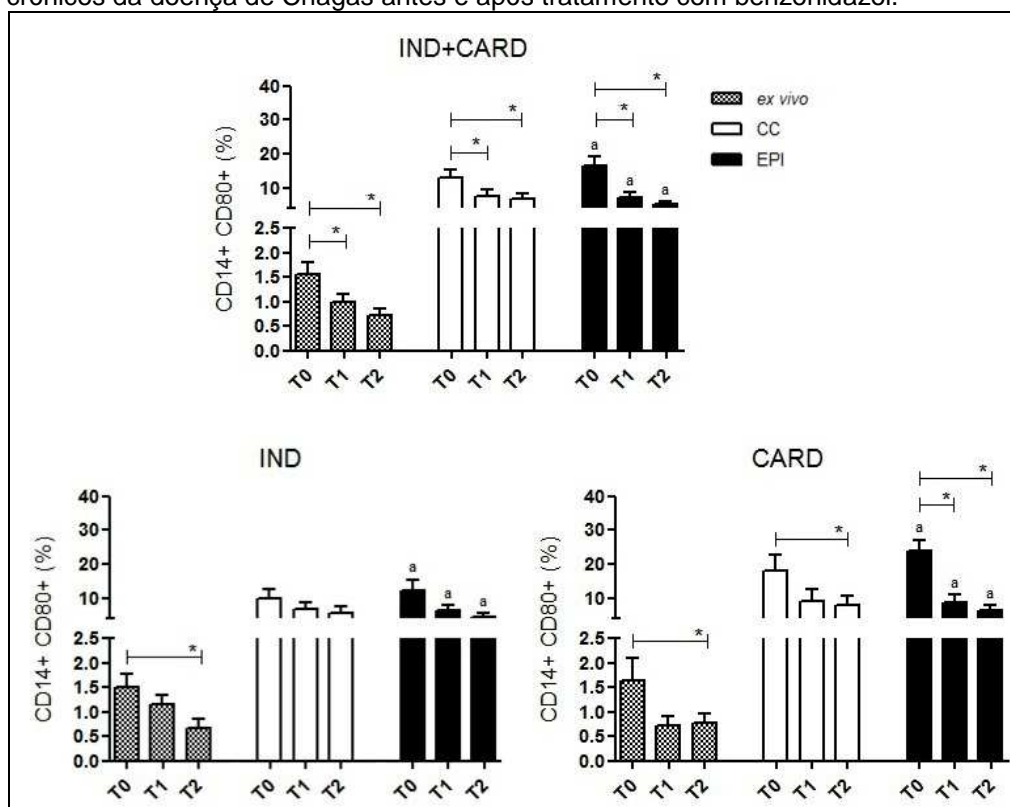
#### 7.1.4 Expressão de CD80, CD86 e HLA-DR em monócitos CD14+

No caso dos monócitos CD14+, avaliamos o percentual de células CD80+, CD86+ e HLA-DR+ antes e após o tratamento com o benzonidazol.

Todos os grupos demonstraram queda na produção de monócitos CD14+CD80+ após o tratamento (IND+CARD:  $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0298$ ;  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0057$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0488$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0039$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0049$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0025$ / IND:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0391$ / CARD:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0469$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0156$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0078$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0156$ ).

O elevada percentual celular na avaliação após estímulo com EPI *versus ex vivo* que já havia no momento T0 ( $p_{IND+CARD} = 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0017$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ ), não sofreu alteração após a intervenção (T1:  $p_{IND+CARD} = 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0012$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0021$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ) (Figura 19).

Figura 19 - Caracterização da produção de monócitos CD14+CD80+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



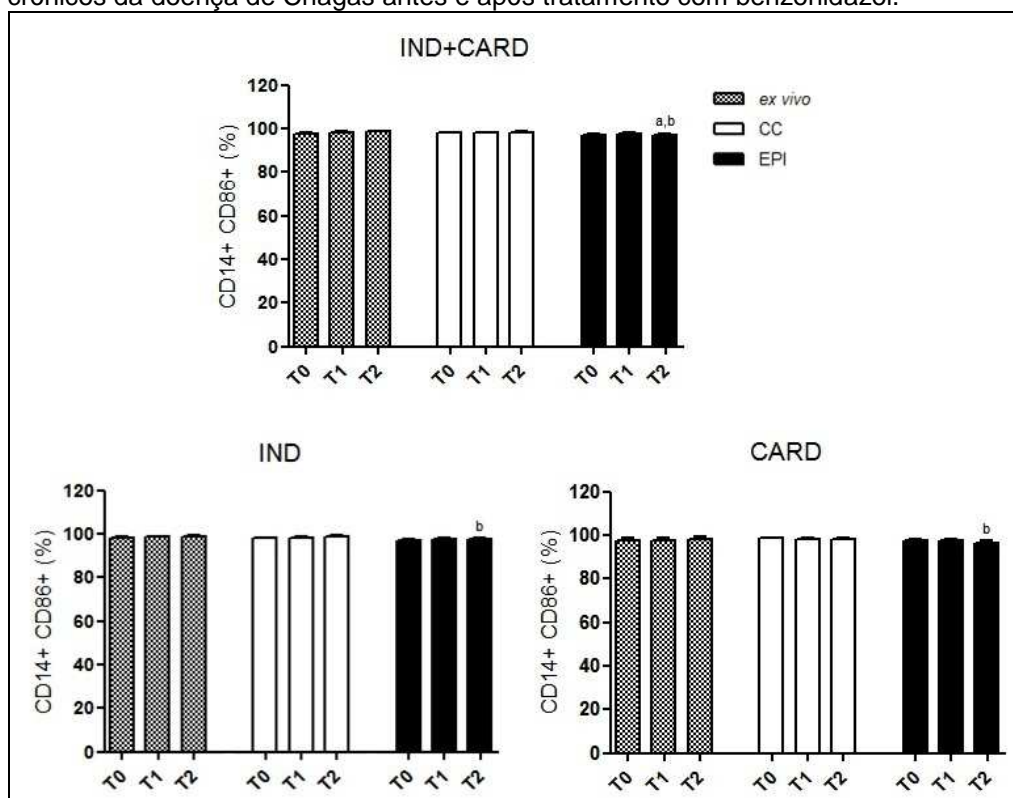
Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (*ex vivo*) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* e EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a".

Não houve diferença no percentual de monócitos CD14+CD86+ entre as avaliações antes e após o tratamento etiológico. Contudo, observamos uma maior produção celular, do contexto *ex vivo* em relação à cultura estimulada com EPI, no grupo IND+CARD após a intervenção ( $p_{EX \times EPI[T2]} = 0,0319$ ). Também surgiu, em todos os grupos avaliados, uma redução significativa de monócito CD14+CD86+ estimulados com o antígeno *versus* CC no momento T2 ( $p_{IND+CARD} = 0,0041$ ;  $p_{IND} = 0,0436$ ;  $p_{CARD} = 0,0313$ ) (Figura 20).

Figura 20 - Caracterização da produção de monócitos CD14+CD86+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

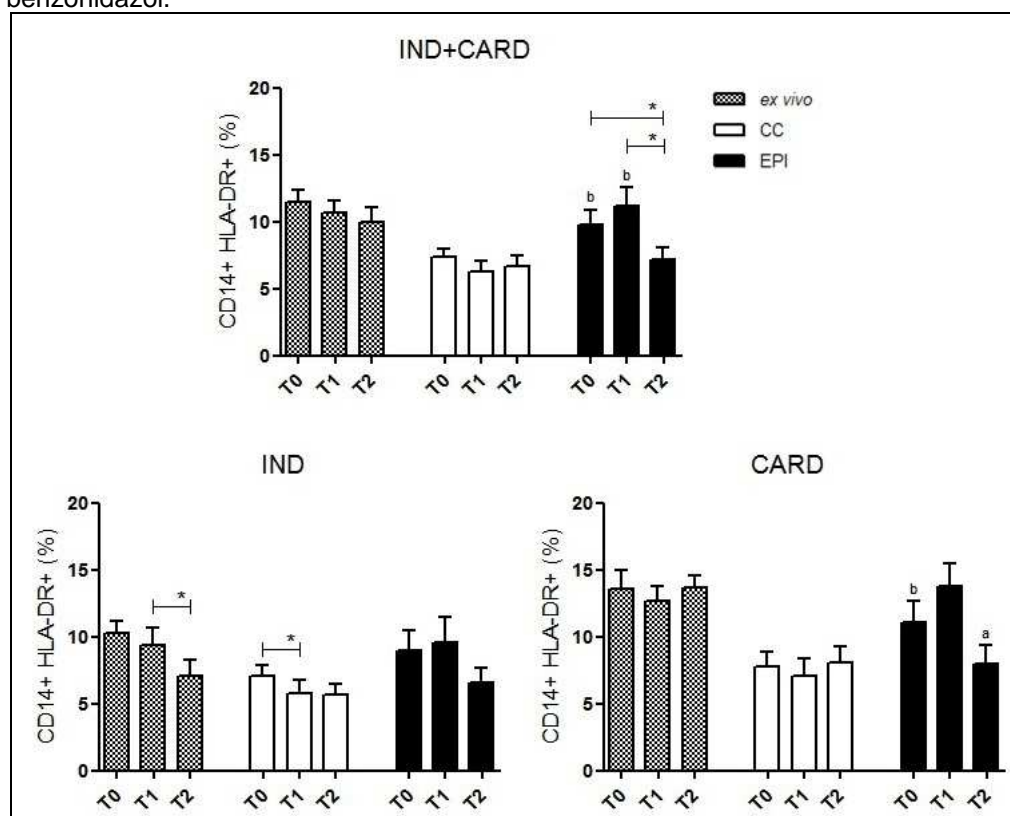
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

Quanto à produção de monócitos CD14+HLA-DR+, houve redução significativa nos grupos IND+CARD ( $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0245$ ;  $p_{T1 \times T2[EPI]} = 0,0280$ ) e IND ( $p_{T1 \times T2[EX]} = 0,0273$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0479$ ) após o tratamento.

De forma tardia (T2), o grupo CARD também demonstrou redução no percentual destes monócitos após estímulo com o antígeno de *T. cruzi* em comparação com a avaliação *ex vivo* ( $p_{EX \times EPI[T2]} = 0,0313$ ). Destacamos o fenômeno apresentado na avaliação CC versus EPI no grupo IND+CARD. O maior percentual de células CD14+HLA-DR+ estimuladas pelo antígeno (EPI) que existia antes da intervenção com o benzonidazol ( $p_{CC \times EPI[T0]} = 0,0376$ ) foi mantida logo após o tratamento ( $p_{CC \times EPI[T1]} = 0,0150$ ), mas desapareceu no momento T2. Para o grupo

CARD, nesta mesma avaliação (CC versus EPI), o maior percentual observado no momento T0 ( $p_{CC \times EPI|T0} = 0,0391$ ), também deixou de existir após o tratamento (Figura 21).

Figura 21 - Caracterização da produção de monócitos CD14+HLA-DR+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

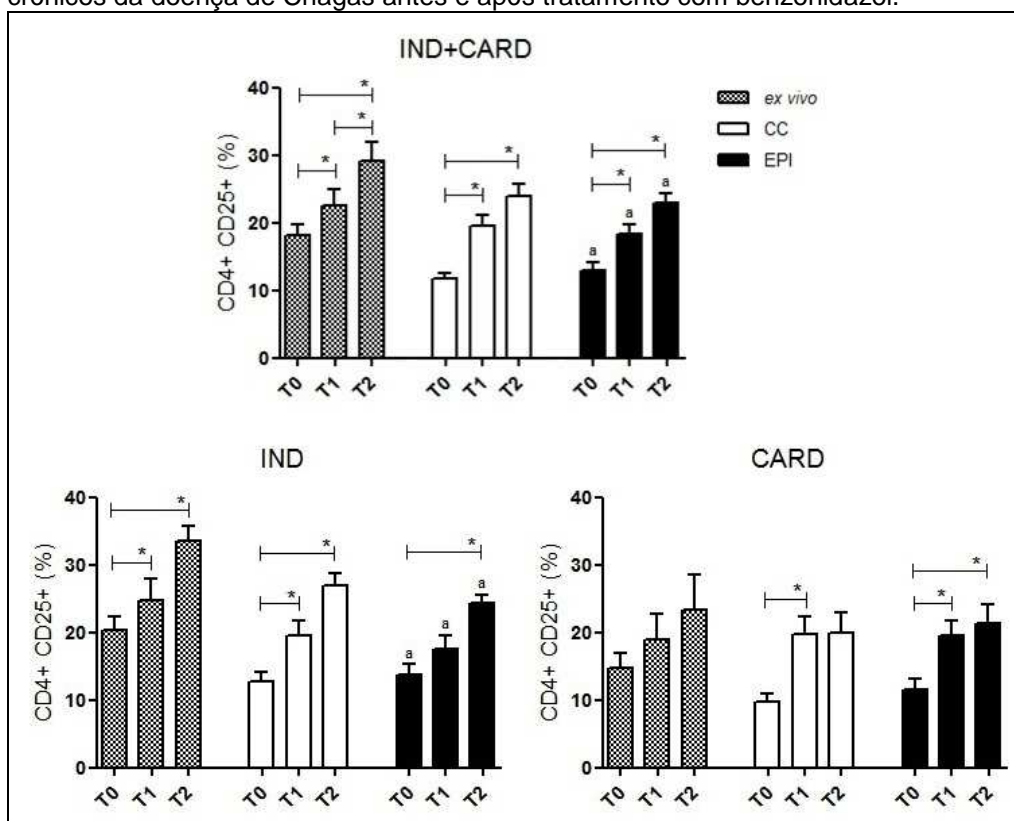
### 7.1.5 Células T regulatórias

As moléculas CD25 e FoxP3 são descritas na literatura como os principais marcadores que caracterizam os linfócitos T regulatórios. Desta forma, para avaliarmos este grupo celular, realizamos análise das populações de células T CD4+ quanto a expressão de CD25+, CD25high, FoxP3+, CD25+FoxP3+ e CD25highFoxP3+.

Na avaliação quanto à produção da molécula CD25+, observamos aumento percentual nos grupos IND+CARD ( $p_{T0XT1[EX]} = 0,0410$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0033$ ;  $p_{T1XT2[EX]} = 0,0497$ ;  $p_{T0XT1[CC]} < 0,0001$ ;  $p_{T0XT2[CC]} < 0,0001$ ;  $p_{T0XT1[EPI]} = 0,0018$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} < 0,0001$ ), IND ( $p_{T0XT1[EX]} = 0,0266$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0039$ ;  $p_{T0XT1[CC]} = 0,0005$ ;  $p_{T0XT2[CC]} = 0,0078$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0039$ ) e CARD ( $p_{T0XT1[CC]} = 0,0078$ ;  $p_{T0XT1[EPI]} = 0,0156$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0313$ ) (Figura 22).

Na comparação *ex vivo versus* EPI, a diferença que já era observada antes do tratamento foi mantida nas avaliações após a intervenção nos grupos IND+CARD ( $p_{T0} = 0,0022$ ;  $p_{T1} = 0,0408$ ;  $p_{T2} = 0,0369$ ) e IND ( $p_{T0} = 0,0051$ ;  $p_{T1} = 0,0020$ ;  $p_{T2} = 0,0078$ ). Não houve diferença estatística na comparação CC *versus* EPI (Figura 22).

Figura 22 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (*ex vivo*) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

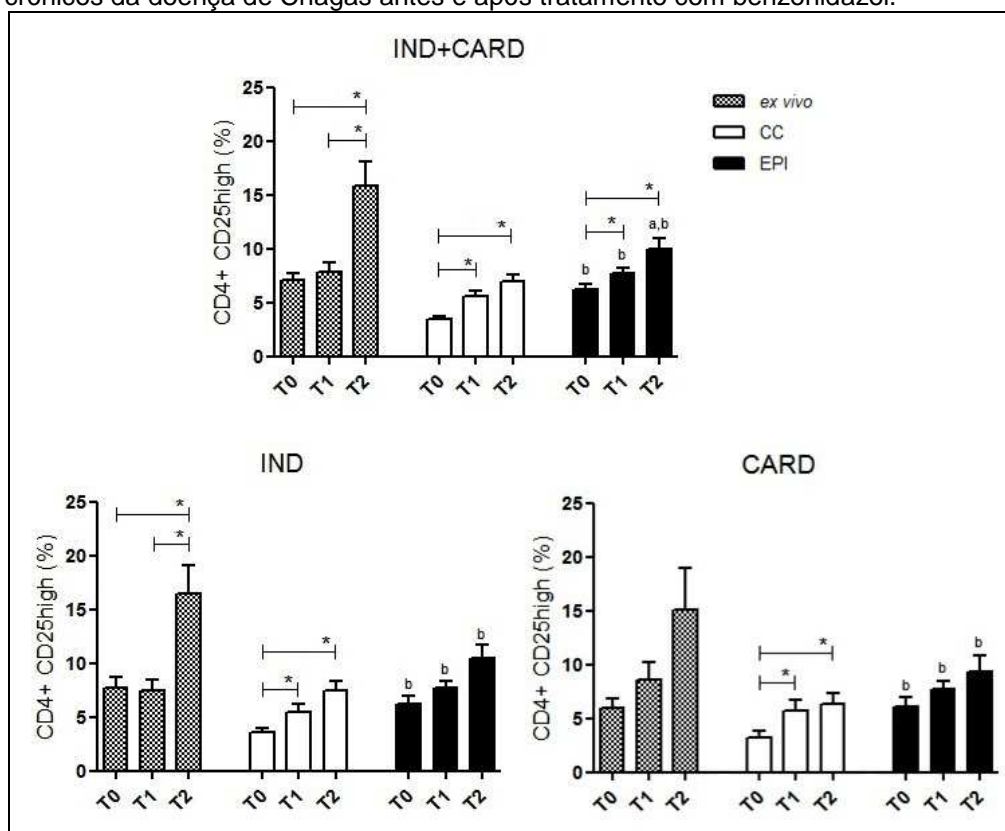
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* e EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a".

Fenômeno semelhante ao demonstrado pela população de células T CD4+CD25+ foi verificada na análise do percentual de linfócitos T CD4+CD25high. Ocorreu aumento desta população celular em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0041$ ;  $p_{T1 \times T2[EX]} = 0,0015$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0004$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} < 0,0001$ ;  $p_{T0 \times T1[EPI]} = 0,0278$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0032$ / IND:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0195$ ;  $p_{T1 \times T2[EX]} = 0,0039$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0150$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0039$ / CARD:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0156$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0156$ ) (Figura 23).

Foi verificada diferença estatística entre *ex vivo* e EPI apenas no momento T2 para o grupo IND+CARD ( $p = 0,0133$ ). A maior produção celular após cultivo na

presença do antígeno de epimastigota em comparação a CC para todos os grupos de indivíduos verificada antes do tratamento (T0:  $p_{\text{IND+CARD}} = 0,0004$ ;  $p_{\text{IND}} = 0,0017$ ;  $p_{\text{CARD}} = 0,0391$ ) foi mantida após a intervenção (T1:  $p_{\text{IND+CARD}} = 0,0003$ ;  $p_{\text{IND}} = 0,0003$ ;  $p_{\text{CARD}} = 0,0391$ / T2:  $p_{\text{IND+CARD}} = 0,0010$ ;  $p_{\text{IND}} = 0,0371$ ;  $p_{\text{CARD}} = 0,0156$ ) (Figura 23).

Figura 23 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25high em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

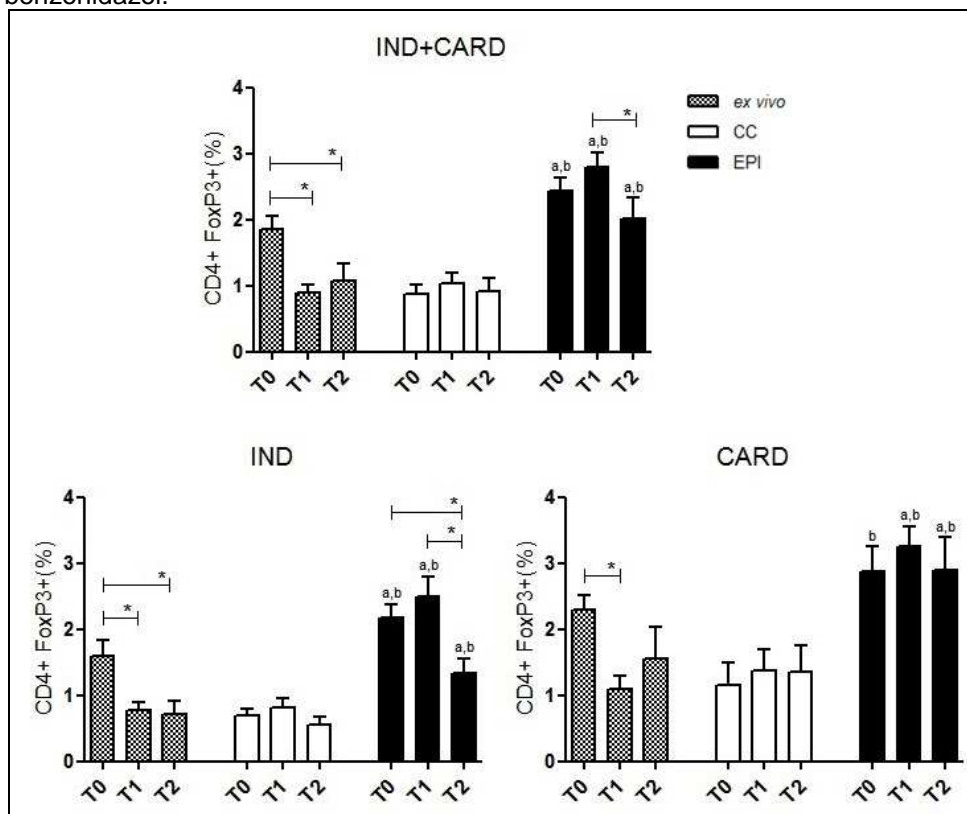
Contudo, na avaliação da expressão de FoxP3 em células T CD4+ foi verificada queda no percentual desses linfócitos em todos os grupos avaliados (IND+CARD:  $p_{\text{T0XT1[EX]}} = 0,0005$ ;  $p_{\text{T0XT2[EX]}} = 0,0105$ ;  $p_{\text{T1XT2[EPI]}} = 0,0033$ / IND:  $p$



$T_0 \times T_1 [EX] = 0,0171$ ;  $p_{T_0 \times T_2 [EX]} = 0,0078$ ;  $p_{T_0 \times T_2 [EPI]} = 0,0078$ ;  $p_{T_1 \times T_2 [EPI]} = 0,0039$ / CARD:  $p_{T_0 \times T_1 [EX]} = 0,0078$ ) (Figura 24).

A produção de linfócitos T CD4+FoxP3+ foi maior na análise EPI em comparação com a *ex vivo* para os grupos IND+CARD e IND tanto antes (T0:  $p_{IND+CARD} = 0,0018$ ;  $p_{IND} = 0,0011$ ) quanto após o tratamento (T1:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0002$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0005$ ;  $p_{IND} = 0,0039$ ). Contudo, este maior percentual só surgiu no grupo CARD após a intervenção com o benzonidazol ( $p_{T_1} = 0,0078$ ;  $p_{T_2} = 0,0156$ ). Os maiores valores percentuais demonstrados pelo cultivo na presença do antígeno EPI em comparação com a CC no momento T0 perduraram após o tratamento (T0:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} < 0,0001$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T1:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0002$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0005$ ;  $p_{IND} = 0,0039$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ) (Figura 24).

Figura 24 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+FoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

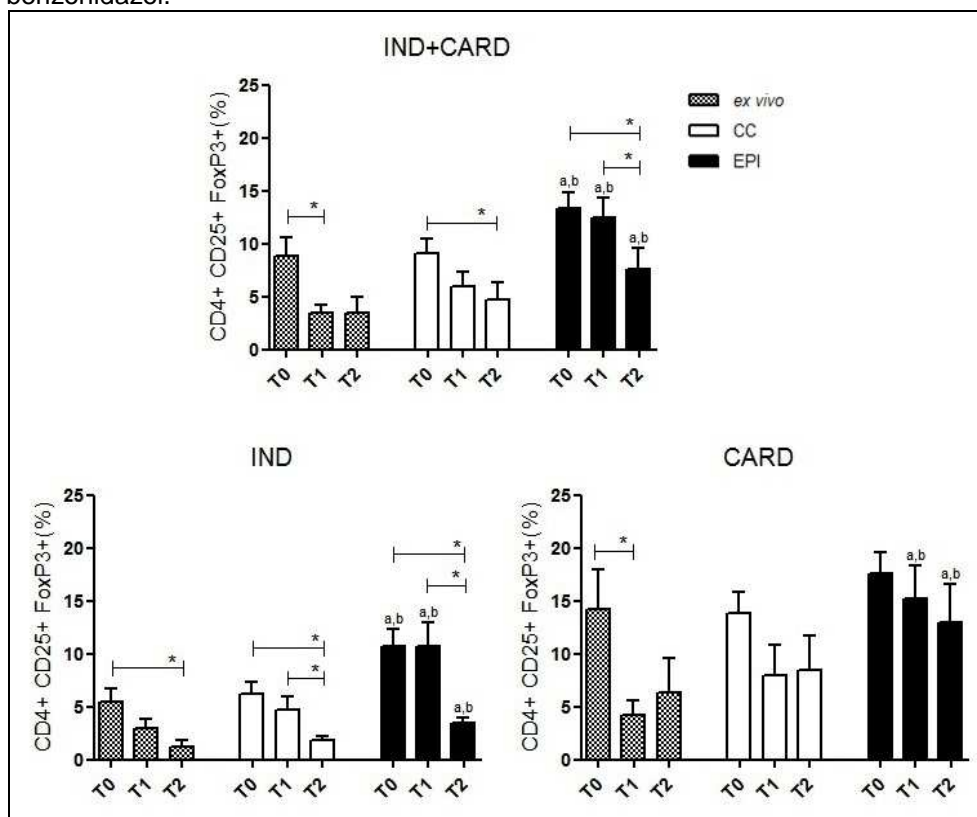
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo* versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

Esta redução no percentual celular após o tratamento também foi observada nos linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ em todos os grupos de indivíduos (IND+CARD:  $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0136$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0245$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0162$ ;  $p_{T1 \times T2[EPI]} = 0,0105$ / IND:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0391$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,078$ ;  $p_{T1 \times T2[CC]} = 0,078$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0117$ ;  $p_{T1 \times T2[EPI]} = 0,0078$ / CARD:  $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0391$ ) (Figura 25).

Comparando *ex vivo* e EPI, observamos maior produção celular após estímulo com o antígeno pelo grupo CARD após o tratamento ( $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ). Por sua vez, tal fenômeno foi verificado nos grupos IND+CARD e IND antes e após a intervenção com o benzonidazol (IND+CARD:  $p_{EX \times EPI[T0]} = 0,0031$ ;  $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ).

$p_{EXxEPI[T1]} < 0,0001$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0006$ / IND:  $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0024$ ;  $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0002$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0078$ ). Na avaliação CC *versus* EPI ocorreu diferença estatística após o tratamento etiológico para o grupo CARD ( $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ), enquanto que nos demais grupos esta diferença já estava presente no T0 ( $p_{IND+CARD} = 0,0025$ ;  $p_{IND} = 0,0081$ ) e foi mantida após o tratamento (T1:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0002$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0005$ ;  $p_{IND} = 0,0039$ ) (Figura 25).

Figura 25 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

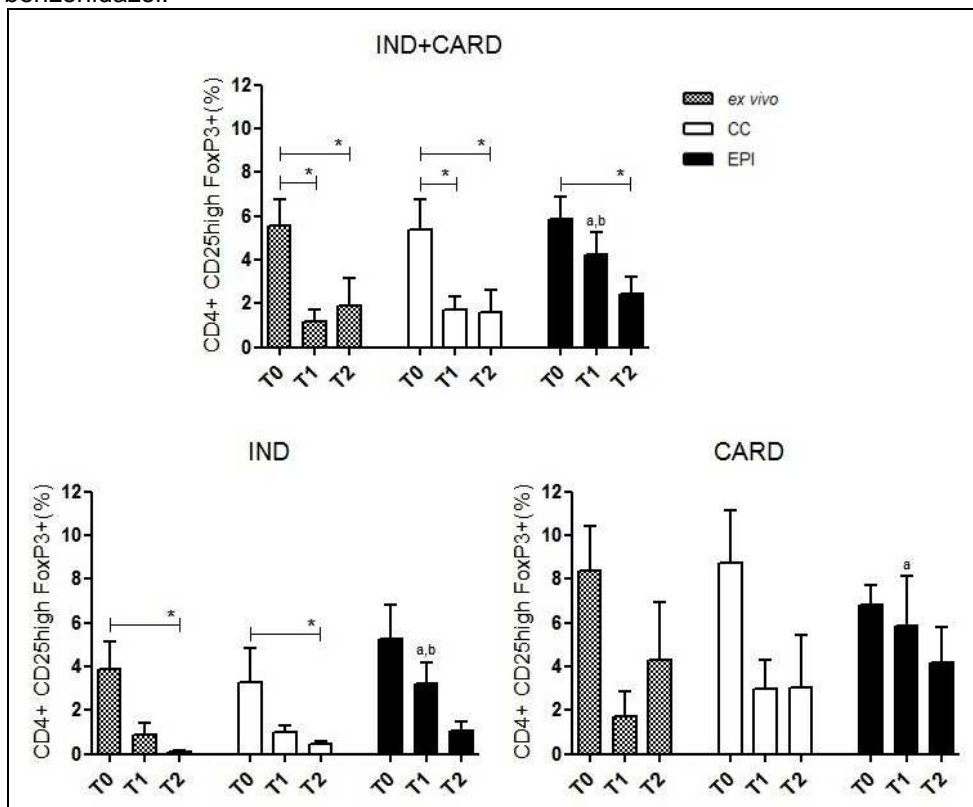
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo versus* EPI e CC *versus* EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

Na análise dos linfócitos T CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+, a redução do percentual celular após o tratamento etiológico só não foi observada no grupo CARD

(IND+CARD:  $p_{T0 \times T1[EX]} = 0,0079$ ;  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0353$ ;  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0239$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0090$ ;  $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0280$ / IND:  $p_{T0 \times T2[EX]} = 0,0313$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0195$ ) (Figura 26).

Na avaliação *ex vivo versus* EPI, houve um maior percentual das células estimuladas em todos os grupos logo após o tratamento (T1:  $p_{IND+CARD} = 0,0024$ ;  $p_{IND} = 0,0322$ ;  $p_{CARD} = 0,0313$ ). Contudo, na análise CC *versus* EPI, a exposição ao antígeno originou maior produção celular, logo após a intervenção, apenas nos grupos IND+CARD ( $p_{T1} = 0,0008$ ) e IND ( $p_{T1} = 0,0046$ ) (Figura 26).

Figura 26 - Caracterização da produção de linfócitos T CD4+CD25highFoxP3+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre *ex vivo versus* EPI e CC *versus* EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

## 7.2 Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células imunes de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*

Realizamos a avaliação do percentual de células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ quanto à produção de IFN- $\gamma$ + (Figura 27) e IL-10 (Figura 28) antes e após o tratamento etiológico.

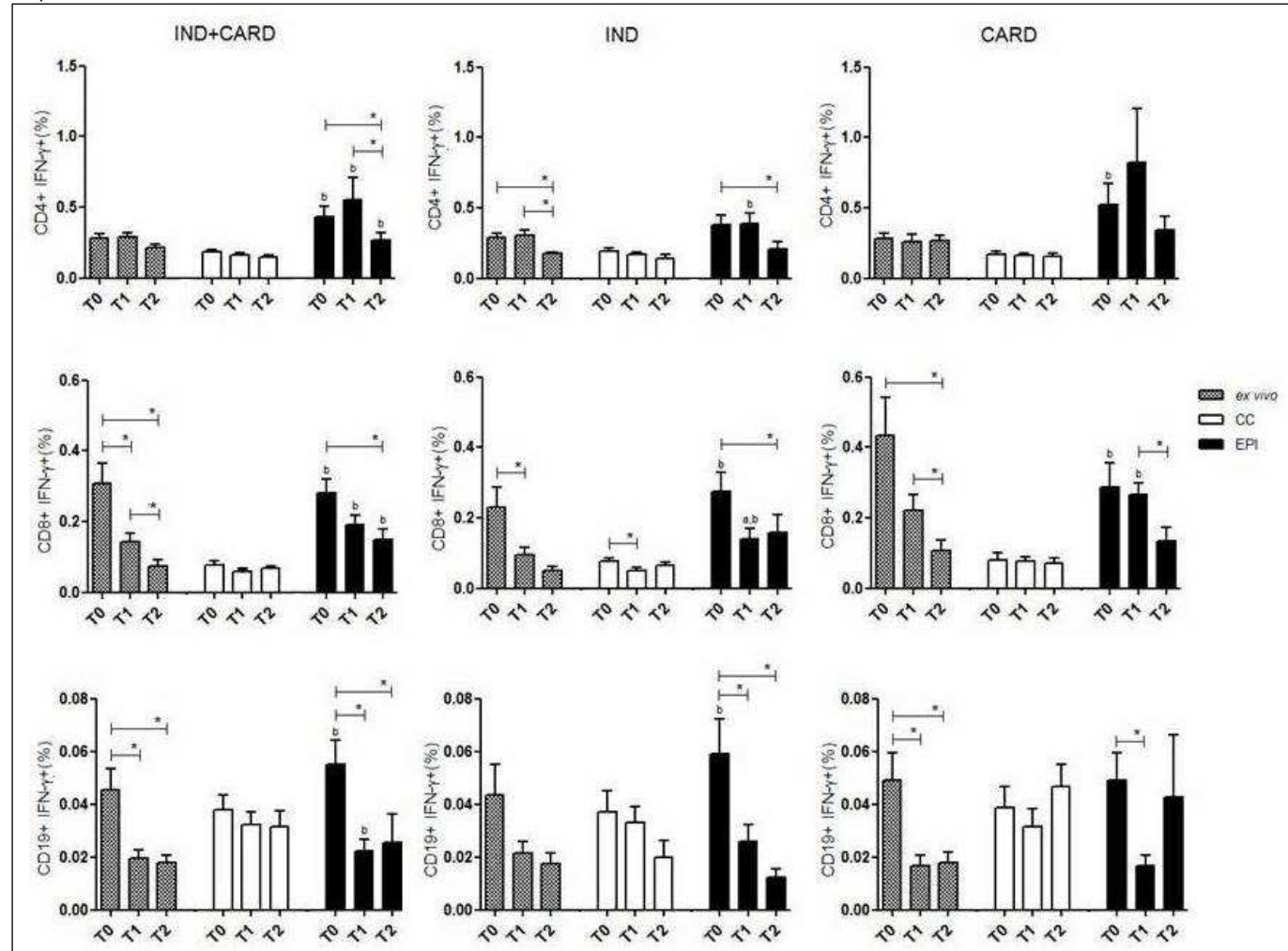
Ao avaliarmos o percentual de células CD4+IFN- $\gamma$ + antes e após o tratamento com benzonidazol, constatamos redução na sua produção entre os indivíduos dos grupos IND+CARD ( $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0105$ ;  $p_{T1XT2[EPI]} = 0,0245$ ) e IND ( $p_{T0XT2[EX]} = 0,0391$ ;  $p_{T1XT2[EX]} = 0,0117$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0273$ ). Na avaliação CC *versus* EPI do grupo IND+CARD, a elevada produção desta citocina por linfócitos T CD4+ após estímulo com o antígeno observada antes do tratamento ( $p_{T0} = 0,0018$ ) foi mantida nas análises subsequentes ( $p_{T1} = 0,0007$ ;  $p_{T2} = 0,0411$ ). No grupo IND esta diferença só foi constatada após o tratamento ( $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0045$ ). Por sua vez, no grupo CARD a diferença que havia antes do tratamento ( $p_{CCxEPI[T0]} = 0,0391$ ) deixou de ser observada.

Houve redução na produção de linfócitos T CD8+IFN- $\gamma$ + após o tratamento com o benzonidazol em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0XT1[EX]} = 0,0030$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0066$ ;  $p_{T1XT2[EX]} = 0,0056$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0066$ / IND:  $p_{T0XT1[EX]} = 0,0330$ ;  $p_{T0XT1[CC]} = 0,0266$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0195$ / CARD:  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0469$ ;  $p_{T1XT2[EX]} = 0,0156$ ;  $p_{T1XT2[EPI]} = 0,0313$ ). Logo após o término do tratamento (T1) o grupo IND demonstrou percentual significativamente superior de células T CD8+IFN- $\gamma$ + estimuladas com EPI em relação à avaliação *ex vivo* ( $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0046$ ). Já na avaliação CC *versus* EPI, todos os grupos de indivíduos demonstraram percentual celular superior antes (T0:  $p_{IND+CARD} = 0,0002$ ;  $p_{IND} = 0,0011$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ) e logo após o tratamento (T1:  $p_{IND+CARD} = 0,0006$ ;  $p_{IND} = 0,0068$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ). Porém, esta diferença só foi mantida no momento T2 nos grupos IND+CARD ( $p_{CCxEPI} = 0,0214$ ).

Quanto à produção da citocina IFN- $\gamma$  por linfócitos B CD19+, também ocorreu redução no percentual celular em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0XT1[EX]} = 0,0036$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0105$ ;  $p_{T0XT1[EPI]} = 0,0016$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0245$ / IND:  $p_{T0XT1[EPI]} = 0,0253$ ;  $p_{T0XT2[EPI]} = 0,0273$ / CARD:  $p_{T0XT1[EX]} = 0,0156$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0313$ ;  $p_{T0XT1[EPI]} =$

0,0156). O grupo IND+CARD demonstrou maior percentual celular na cultura com EPI em relação a CC antes ( $p_{EPI \times CC[T_0]} = 0,0499$ ) e logo após a intervenção com o benzonidazol ( $p_{EPI \times CC[T_1]} = 0,0317$ ). Porém, essa diferença não foi observada no momento T2. No grupo IND, nesta mesma avaliação, a produção de células B CD19+IFN- $\gamma$ + estimuladas com o antígeno deixou de apresentar o percentual significativamente maior que foi verificado no momento T0 ( $p_{EPI \times CC[T_0]} = 0,0466$ ).

Figura 27 - Caracterização da produção de IFN- $\gamma$  em células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota. Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b", respectivamente.

As células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ também foram avaliadas, antes e após o uso do benzonidazol, quanto à produção intracitoplasmática de IL-10 (Figura 28).

Não houve diferença estatística na produção de linfócitos T CD4+IL-10+ após o tratamento etiológico. Ao compararmos *ex vivo versus* EPI, a diferença observada antes do tratamento nos grupos IND+CARD ( $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0003$ ) e IND ( $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0054$ ), se manteve nas avaliações realizadas após a intervenção (IND+CARD:  $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0002$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0015$ / IND:  $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0005$ ;  $p_{EXxEPI[T2]} = 0,0022$ ). Já no grupo CARD, a diferença demonstrada antes ( $p_{EXxEPI[T0]} = 0,0391$ ) e logo após a intervenção ( $p_{EXxEPI[T1]} = 0,0391$ ) não foi mantida no momento T2. Quanto à avaliação CC *versus* EPI, os valores após exposição ao antígeno se mantiveram maiores pós-tratamento no grupo IND+CARD ( $p_{CCxEPI[T0]} = 0,0046$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0011$ ;  $p_{CCxEPI[T2]} = 0,0261$ ). Contudo, estes percentuais mais elevados não se mantiveram na avaliação mais tardia do grupo IND ( $p_{CCxEPI[T0]} = 0,0336$ ;  $p_{CCxEPI[T1]} = 0,0017$ ).

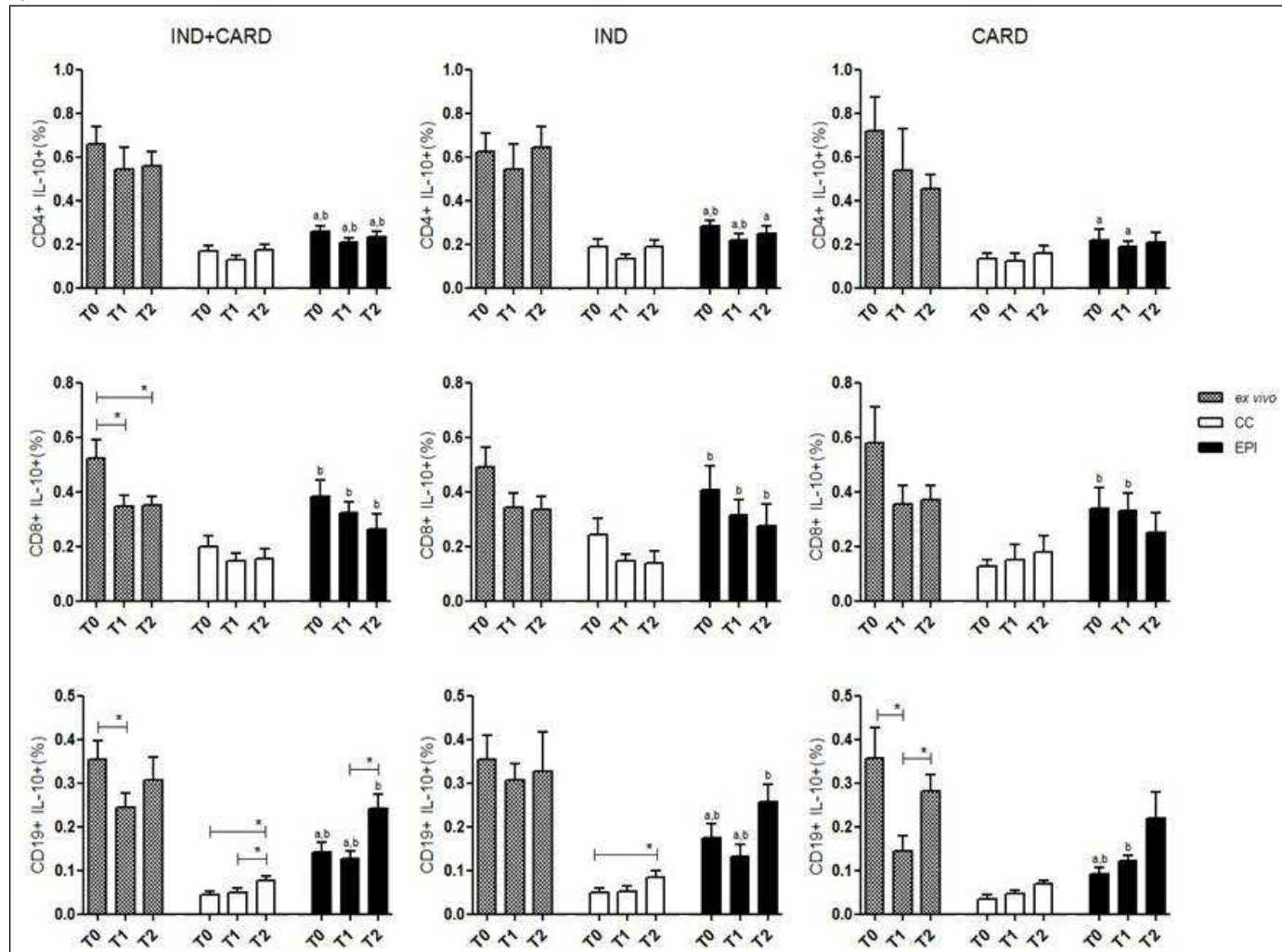
Houve redução significativa na produção de células T CD8+IL-10+ apenas no grupo IND+CARD ( $p_{T0XT1[EX]} = 0,0123$ ;  $p_{T0XT2[EX]} = 0,0437$ ). Já na avaliação CC *versus* EPI, os elevados percentuais observados antes do tratamento com o benzonidazol (T0:  $p_{IND+CARD} = 0,0022$ ;  $p_{IND} = 0,0265$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ) também foram observados após a medicação (T1:  $p_{IND+CARD} = 0,0002$ ;  $p_{IND} = 0,0025$ ;  $p_{CARD} = 0,0234$ / T2:  $p_{IND+CARD[T2]} = 0,0071$ ;  $p_{IND[T2]} = 0,0283$ ).

Destacamos o impacto do benzonidazol na produção intracitoplasmática de IL-10 pelos linfócitos B CD19+. Nos grupos IND+CARD e CARD ocorreu redução significativa do percentual celular logo após o tratamento no contexto *ex vivo* ( $p_{T0XT1[IND+CARD]} = 0,0458$ ;  $p_{T0XT1[CARD]} = 0,0078$ ). Porém, todos os grupos demonstraram crescimento no percentual celular nas comparações com o T2 (IND+CARD:  $p_{T0XT2[CC]} = 0,0009$ ;  $p_{T1XT2[CC]} = 0,0368$ ;  $p_{T1XT2[EPI]} = 0,0464$ / IND:  $p_{T0XT2[CC]} = 0,0091$ / CARD:  $p_{T1XT2[EX]} = 0,0156$ ). A baixa produção de células B CD19+IL-10+ estimuladas por EPI em relação à avaliação *ex vivo* antes e logo após a intervenção nos grupos IND+CARD ( $p_{T0} = 0,0002$ ;  $p_{T1} = 0,0165$ ) e IND ( $p_{T0} = 0,0190$ ;  $p_{T1} = 0,0024$ ), não foi observada no momento T2. Contudo, para o grupo CARD, a diferença que havia no T0 ( $p_{T0[EXxEPI]} = 0,0078$ ) desapareceu logo após o tratamento. IND+CARD e IND demonstraram maior percentual celular após estímulo antigênico em todas as avaliações CC *versus* EPI (IND+CARD:  $p_{T0} < 0,0001$ ;  $p_{T1} < 0,0001$ ;  $p_{T2} = 0,0029$ ;



IND:  $p_{T0} = 0,0011$ ;  $p_{T1} = 0,0096$ ;  $p_{T2} = 0,0078$ ). Para o CARD, entretanto, esta diferença só ocorreu em T0 ( $p_{CCxEPI} = 0,0078$ ) e T1 ( $p_{CCxEPI} = 0,0078$ ).

Figura 28 - Caracterização da produção de IL-10 em células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ em portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (ex vivo) Análise realizada com sangue total; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota. Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre ex vivo versus EPI e CC versus EPI em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a" e "b" respectivamente.

### 7.3 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue total de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com o benzonidazol após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*

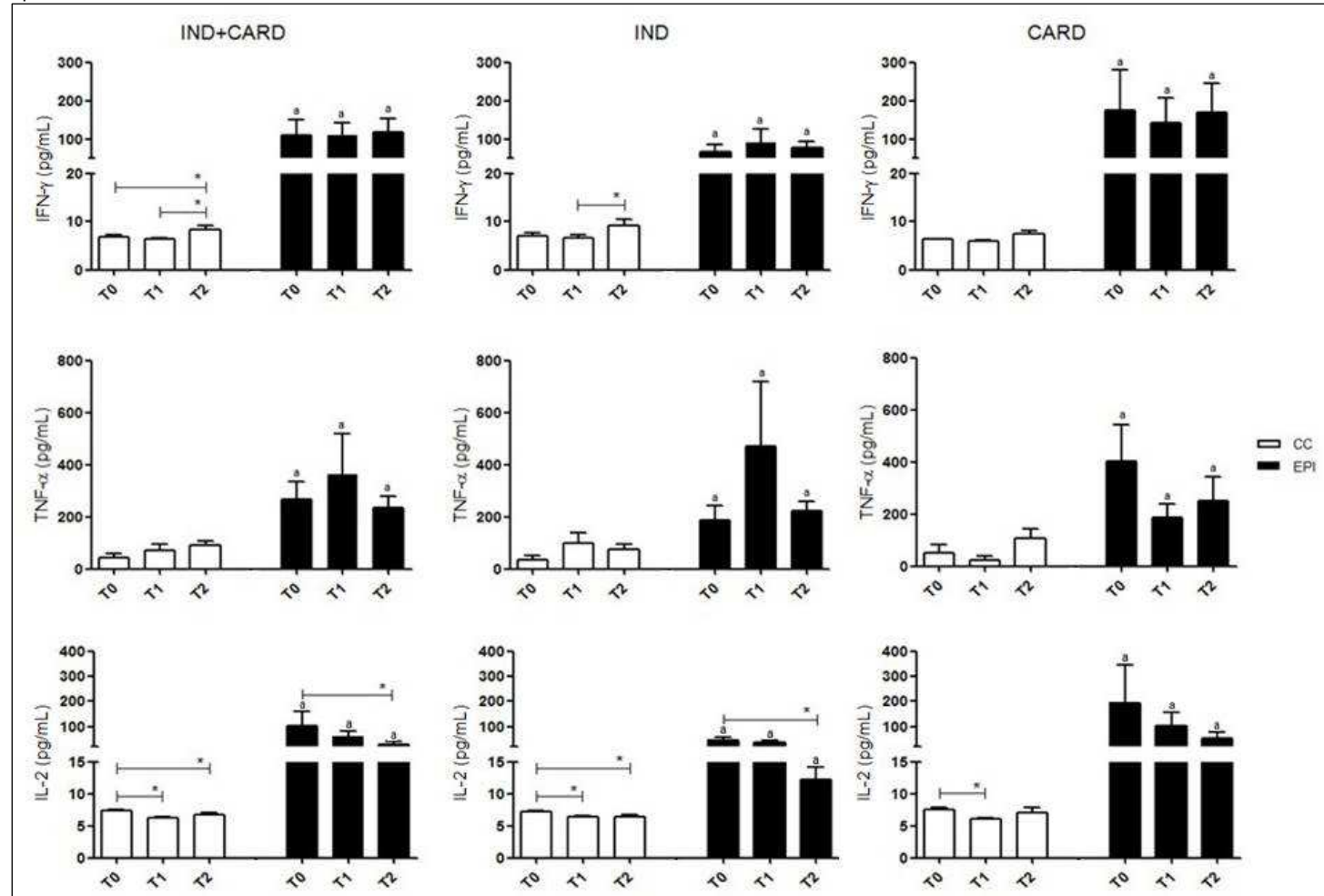
Realizamos a detecção de citocinas relacionadas a resposta imune inflamatória (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) (Figura 29) e regulatória (IL-4, IL-6 e IL-10) (Figura 30), antes e após a intervenção com o benzonidazol, no sobrenadante das culturas sem estímulo (cultura controle-CC) e na presença de estímulo com antígeno solúvel de epimastigota (EPI).

Os grupos IND+CARD e IND apresentaram aumento na produção de IFN- $\gamma$  na CC (IND+CARD:  $p_{T0 \times T2} = 0,0428$ ;  $p_{T1 \times T2} = 0,0031$ / IND:  $p_{T1 \times T2} = 0,0195$ ), não havendo mudança após o cultivo com EPI na comparação antes e após tratamento. Também não houveram alterações quanto à elevada produção de IFN- $\gamma$  após estímulo antigênico em relação a CC (IND+CARD:  $p_{T0} < 0,0001$ ;  $p_{T1} < 0,0001$ ;  $p_{T2} < 0,0001$ / IND:  $p_{T0} = 0,0002$ ;  $p_{T1} = 0,0002$ ;  $p_{T2} = 0,0078$ / CARD:  $p_{T0} = 0,0078$ ;  $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ).

Não verificamos diferença na comparação do antes com o após intervenção com o benzonidazol na quantidade de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas. A elevada produção desta molécula na presença de EPI verificada no momento T0 ( $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0024$ ;  $p_{CARD} = 0,0391$ ) foi mantida nos momentos subsequentes ao tratamento (T1:  $p_{IND+CARD} = 0,0004$ ;  $p_{IND} = 0,0081$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0003$ ;  $p_{IND} = 0,0056$ ;  $p_{CARD} = 0,0313$ ).

Na quantificação de IL-2, houve redução na análise das culturas sem estímulo em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0002$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0214$ / IND:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0010$ ;  $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0391$ / CARD:  $p_{T0 \times T1[CC]} = 0,0156$ ). Contudo, após o estímulo com antígeno de *T. cruzi*, apenas os grupos IND+CARD ( $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0140$ ) e IND ( $p_{T0 \times T2[EPI]} = 0,0117$ ) apresentaram redução pós-tratamento. A produção desta citocina foi superior nas culturas EPI, na comparação com CC, em todos os momentos avaliados (T0:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0005$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T1:  $p_{IND+CARD} < 0,0001$ ;  $p_{IND} = 0,0002$ ;  $p_{CARD} = 0,0078$ / T2:  $p_{IND+CARD} = 0,0002$ ;  $p_{IND} = 0,0413$ ;  $p_{CARD} = 0,0156$ ).

Figura 29 - Quantificação de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 no sobrenadante de cultura de células obtidas de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

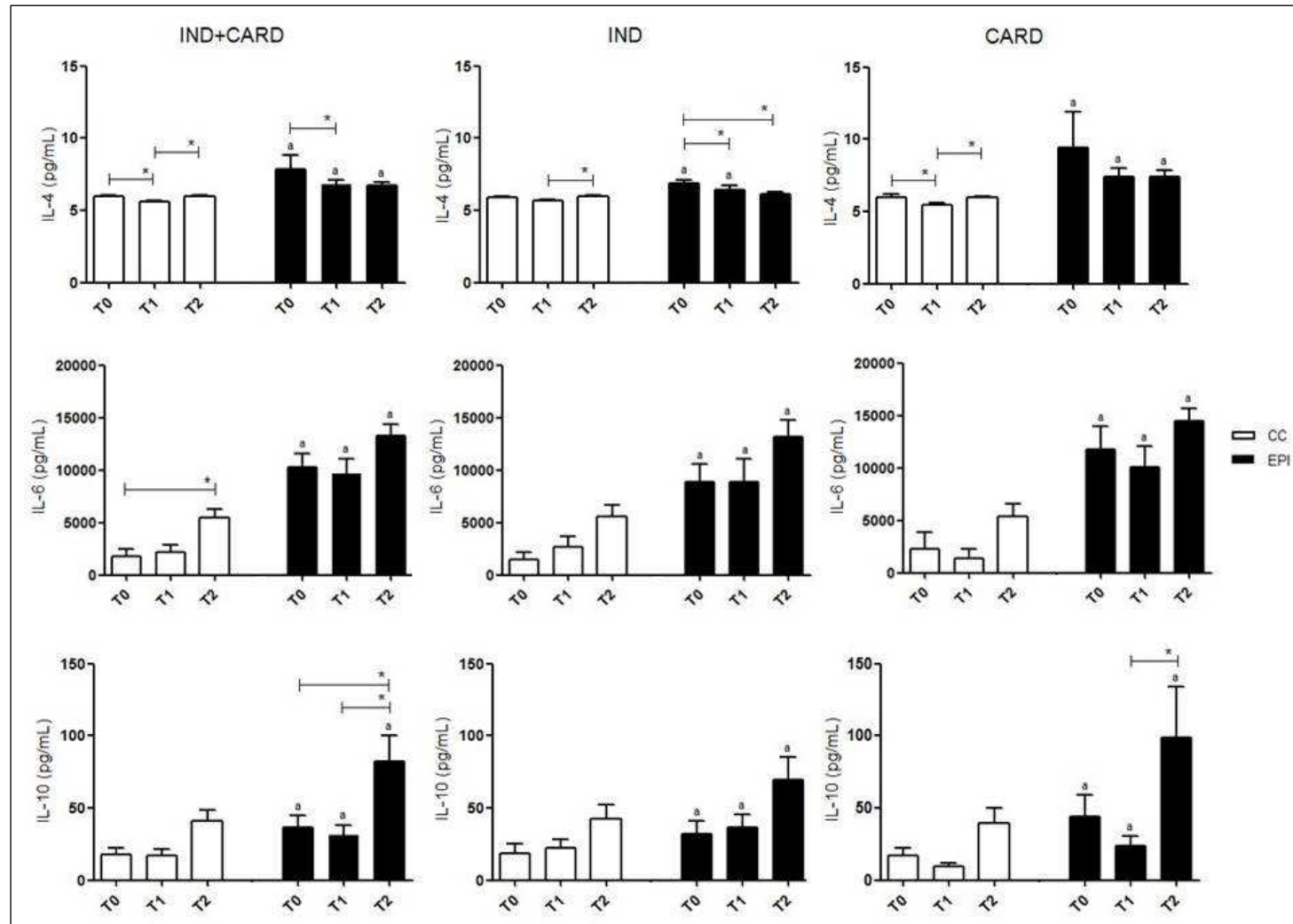
Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre CC e EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a".

Nas culturas estimuladas com EPI foi possível verificar redução na produção de IL-4 após o tratamento com o benzonidazol nos grupos IND+CARD ( $p_{T0 \times T1} = 0,0072$ ) e IND ( $p_{T0 \times T1} = 0,0068$ ;  $p_{T0 \times T2} = 0,0234$ ). Contudo, destacamos que na avaliação das culturas sem estímulo, mesmo com uma redução logo após o tratamento (IND+CARD:  $p_{T0 \times T1} = 0,0030$ / CARD:  $p_{T0 \times T1} = 0,0156$ ), houve aumento na produção de IL-4 na avaliação T2 em todos os grupos (IND+CARD:  $p_{T1 \times T2} = 0,0005$ / IND:  $p_{T1 \times T2} = 0,0391$ / CARD:  $p_{T1 \times T2} = 0,0223$ ). Elevada produção desta citocina, após o cultivo com o antígeno em comparação a CC, foi observada em todos os momentos avaliados nos grupos IND+CARD ( $p_{T0} = 0,0003$ ;  $p_{T1} = 0,0002$ ;  $p_{T2} = 0,0043$ ) e CARD ( $p_{T0} = 0,0156$ ;  $p_{T1} = 0,0156$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ). Porém, esta diferença só pode ser verificada em T0 ( $p = 0,0034$ ) e T1 ( $p = 0,0064$ ) no grupo IND.

Na quantificação da IL-6, apenas no grupo IND+CARD houve aumento significativo com o tratamento ( $p_{T0 \times T2[CC]} = 0,0362$ ). Não houve modificação quanto à elevada produção desta citocina após estímulo antigênico em relação a CC (IND+CARD:  $p_{T0} < 0,0001$ ;  $p_{T1} < 0,0001$ ;  $p_{T2} < 0,0001$ / IND:  $p_{T0} = 0,0005$ ;  $p_{T1} = 0,0048$ ;  $p_{T2} = 0,0035$ / CARD:  $p_{T0} = 0,0078$ ;  $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ).

Após o tratamento houve aumento significativo na produção de IL-10 no sobrenadante obtido das culturas estimuladas com o antígeno de epimastigota nos grupos IND+CARD ( $p_{T0 \times T2} = 0,0214$ ;  $p_{T1 \times T2} = 0,0162$ ) e CARD ( $p_{T1 \times T2} = 0,0313$ ). Também não houve mudanças quanto à elevada produção desta citocina após estímulo antigênico em relação a CC (IND+CARD:  $p_{T0} < 0,0001$ ;  $p_{T1} < 0,0001$ ;  $p_{T2} < 0,0001$ / IND:  $p_{T0} = 0,0005$ ;  $p_{T1} = 0,0058$ ;  $p_{T2} = 0,0288$ / CARD:  $p_{T0} = 0,0078$ ;  $p_{T1} = 0,0078$ ;  $p_{T2} = 0,0156$ ).

Figura 30 - Quantificação de IL-4, IL-6 e IL-10 no sobrenadante de cultura de células obtidas de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (IND+CARD) Portadores crônicos da doença de Chagas; (IND) Portadores crônicos assintomáticos; (CARD) Portadores crônicos com acometimento cardíaco. (T0) Amostras coletadas antes do tratamento etiológico; (T1) Amostras coletadas 2-3 meses após o término do tratamento etiológico; (T2) Amostras coletadas 5-6 meses após o término do tratamento etiológico; (CC) Análise realizada após cultivo celular de sangue total sem estimulação antigênica; (EPI) Análise realizada após cultivo celular de sangue total estimulado com antígeno de epimastigota.

Nota: As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Valores estatisticamente diferentes entre os tempos avaliados (T0, T1 e T2) estão indicados por \*. Valores estatisticamente diferentes entre CC e EPI, em cada tempo avaliado, estão indicados pelas letras "a".

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 Caracterização fenotípica de células da resposta imune de portadores crônicos da doença de Chagas no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*, antes e após o tratamento com o benzonidazol

Quanto a caracterização fenotípica das células, os marcadores avaliados permitiram a observação de diferentes aspectos relacionados as populações de linfócitos B, *Natural killer*, T CD4+, T CD8+, monócitos e Treg, antes e após a intervenção com o benzonidazol na fase crônica da doença de Chagas.

#### 8.1.1 Células B

Além de serem cruciais na resposta imune humoral, os linfócitos B também estão envolvidos nos mecanismos relacionados à resposta imune celular, através da apresentação de antígenos e da produção de citocinas (BERMEJO et al., 2010; CONSTANT et al., 1995; FARES et al., 2013; HARRIS, et al., 2000; LUND, 2008; TAYLOR; JENKINS; PAPE, 2012; WATANABE et al., 2007).

Para verificar o comportamento dos linfócitos B após o tratamento etiológico optamos por avaliar as moléculas CD5 e CD19 na superfície celular. A molécula CD19 eleva gradualmente sua expressão no decorrer do desenvolvimento desta linhagem celular, sendo restrita aos linfócitos B (FUJIMOTO; SATO, 2007). Por sua vez, a avaliação quanto à expressão de CD5 permite a distinção dos linfócitos B convencionais (CD5-CD19+) daqueles ditos B1 (CD5+CD19+) (MAURI; BOSMA, 2012). As células B convencionais, também conhecidas como B2, são responsáveis pela produção de anticorpos de elevada afinidade e de células de memória que oferecem proteção duradoura contra a invasão de patógenos. Já as células B1 produzem anticorpos naturais, principalmente IgM, que por sua vez reduzem a carga antigênica e removem células apoptóticas, atuando com anticorpos de baixa afinidade que proporcionam proteção imediata, porém de curto prazo (BAUMGARTH; TUNG; HERZENBERG, 2005; LUNDY, 2009; MAURI; BOSMA, 2012).

Mesmo não constatando alterações significativas na produção de linfócitos B CD5-CD19+ em nenhum dos grupos de indivíduos portadores crônicos avaliados em nosso estudo, o aumento na população de linfócitos B1 (CD5+CD19+) logo após o tratamento em todos os grupos demonstra o impacto da intervenção na resposta imune humoral.

Sathler-Avelar et al. (2008) ao avaliarem crianças classificadas como recentemente com a forma crônica indeterminada da doença de Chagas, observaram maior produção de linfócitos B1 CD5+CD19+ entre os portadores que receberam o benzonidazol em relação aqueles que não foram submetidos ao tratamento etiológico (SATHLER-AVELAR et al., 2008).

Em trabalho anterior, estes mesmos autores tinham verificado que indivíduos recentemente na fase crônica da doença de Chagas já produziam maior percentual de linfócitos B1 que aqueles na fase aguda (SATHLER-AVELAR et al., 2003). Também foi constatada maior produção de linfócitos B CD5-CD19+IL-10+ e CD5+CD19+IL-10- nas formas clínicas indeterminada e cardíaca em comparação com grupo de indivíduos controle, sugerindo que estas células estariam envolvidas com a resposta imune geral contra o *T. cruzi* (FARES et al., 2013). Contudo, Fernández et al. (2014), ao avaliarem diferentes marcadores em células B CD19+ (CD27, IgG, IgM) do sangue periférico de indivíduos crônicos assintomáticos da doença de Chagas, concluíram que a reduzida população celular em comparação ao grupo de indivíduos controle indicaria uma resposta anticórpica deficiente, o que permitiria a persistência do parasita no organismo do hospedeiro (FERNÁNDEZ et al., 2014).

Estudo experimental demonstrou que a ausência de células B acarreta aumento do parasitismo, com redução da inflamação e da produção de células T de memória na infecção pelo *T. cruzi*, indicando que os linfócitos B são cruciais para o controle da multiplicação parasitária e da resposta imune (CARDILLO et al., 2007).

Diante do que foi exposto, acreditamos que o aumento da população de linfócitos B na etapa inicial do tratamento na fase crônica da doença de Chagas surja em resposta aos elevados níveis de antígenos livres no organismo do hospedeiro, ocorrendo subsequentemente uma redução celular em decorrência da eliminação dos antígenos de *T. cruzi* circulantes. Desta forma, a elevação que constatamos em nosso estudo, e que também foi verificada por Sathler-Avelar et al. (2008), nada mais seria que uma resposta ao aumento de antígenos circulantes em



decorrência da ação tripanocida do benzonidazol. Contudo, apenas o acompanhamento do percentual destas células circulantes no organismo dos pacientes crônicos tratados por um maior espaço de tempo em associação com a mensuração da carga parasitária é que permitirá concluirmos se este aumento é um fenômeno passageiro ou se ocorreu uma modulação duradoura na população de linfócitos B1 CD5+CD19+.

### 8.1.2 Células *Natural Killer*

As células NK são caracterizadas fenotipicamente pela ausência de CD3 e presença de CD16. Por sua vez, elas podem ser subdivididas de acordo com a expressão da molécula CD56 em sua superfície, sendo as células CD3-CD16+CD56+ menos madura que as CD3-CD16+CD56dim/- (CALIGIURI et al., 2008; CHAN et al., 2007; LANIER et al., 1986; LEIBSON, 1997; ROBERTSON; RITZ, 1990). Células NK CD3- com elevada expressão de CD56 produzem altos níveis de citocinas e quimiocinas em poucos minutos de ativação, mas são pouco efetivas na eliminação de células tumorais, enquanto que as células NK CD56dim/-, mesmo apresentando baixa produção de citocinas em resposta a ativação, causam lise em células tumorais susceptíveis (COOPER et al., 2001; WALZER et al., 2007). Tais relatos demonstram que distintas vias de atuação são atribuídas aos diferentes fenótipos de células NK.

Na doença de Chagas, este grupo celular vem sendo indicado como crucial no controle da infecção pelo *T. cruzi* devido a seu caráter citotóxico. Sathler-Avelar et al. (2003) ao avaliarem crianças na fase aguda constataram uma maior ativação da imunidade inata no estágio tardio desta fase da doença devido a elevada produção de células CD16+CD56- (SATHLER-AVELAR et al., 2003). Em modelos experimentais as células NK foram associadas ao controle da infecção parasitária na fase aguda devido a produção e IFN- $\gamma$  (CARDILLO et al., 1996) e a modulação da secreção de imunoglobulinas por células B (DE ARRUDA HINDS et al., 2001).

Ao comparar as diferentes formas clínicas da fase crônica da doença (indeterminada, cardíaca e digestiva), Vitelli-Avelar et al. (2005) demonstraram que os indivíduos sem acometimento clínico apresentavam elevada produção de células NK CD3-CD16+CD56+ e CD3-CD16+CD56dim (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Crianças classificadas como estando recentemente com a forma crônica

indeterminada da doença de Chagas demonstraram elevado percentual de células NK CD3-CD16+CD56- em relação ao grupo controle (VITELLI-AVELAR et al., 2006). De acordo com os autores, esta elevação da população de células NK estaria diretamente relacionada com a permanência na forma indeterminada da doença, uma vez que ao controlar a parasitemia por este grupo celular atuaria indiretamente controlando a resposta imune deletéria aos tecidos do hospedeiro (VITELLI-AVELAR et al., 2005).

Em trabalho com indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas tratados com o benzonidazol, Sathler-Avelar et al. (2008), mesmo não verificando diferença quanto à população de células NK CD3-CD16+CD56+, constataram elevada produção de células NK CD3-CD16+CD56- em relação a população de não-tratados. Os autores sugeriram que o tratamento etiológico, ao causar a expansão destas células, atuaria na ativação de macrófagos relacionados com o controle parasitário (SATHLER-AVELAR et al., 2008).

Diante do exposto, a redução da população de células NK CD3-CD16+CD56- (maduras) estimuladas com antígenos de epimastigota nos grupos IND+CARD e IND que observamos pós-benzonidazol indicaria que o tratamento, ao reduzir a população de células NK maduras estaria permitindo uma maior replicação do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro.

Vários estudos tem demonstrado que células NK CD56dim/- (maduras) são derivadas diretamente das CD56+ (CHAN et al., 2007; LANIER et al., 1986; OUYANG et al., 2007; ROMAGNANI et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2007). Como o tratamento não interferiu na população de células NK CD3-CD16+CD56+ (naive) nestes grupos de pacientes, é possível que o benzonidazol tenha interferido na maturação destas células, atuando nos mecanismos que envolvem a supressão na expressão do CD56 na membrana das células NK oriundas dos pacientes com a forma indeterminada.

Já ao avaliarmos os pacientes com acometimento cardíaco constatamos que houve aumento significativo na produção de ambos os subtipos de células NK (CD3-CD16+CD56+/-) após o tratamento com o benzonidazol, demonstrando que a intervenção pode ter trazido algum benefício a estes indivíduos ao ativar células importantes para a eliminação do *T. cruzi*. Tal hipótese é ressaltada pelo fato de que esta elevação significativa no grupo CARD não foi mantida no momento T2. A regulação da resposta citotóxica mediada pelas células NK é de suma importância,

uma vez que sua ativação de forma descontrolada pode conduzir aos danos teciduais característicos dos quadros clínicos sintomáticos da fase crônica (D'AVILA REIS et al., 2001; REIS et al., 1993). Isto nos leva a crer que o benzonidazol causou inicialmente uma resposta citotóxica nos pacientes com a doença de Chagas em sua forma cardíaca, possibilitando uma acentuada eliminação do parasita, com subsequente controle desta resposta citotóxica. Desta forma, acreditamos que o tratamento etiológico atuou na tentativa de mediar uma redução da população parasitária de forma que não houvesse dano ao hospedeiro portador da forma cardíaca.

### 8.1.3 Expressão de CD28 e CD152 em células T CD4+ e CD8+

A ativação de linfócitos T requer o reconhecimento de peptídeos antigênicos por receptores localizados nestas células (TCRs) em associação com co-sinalização, sendo os mecanismos moleculares derivados destes sinais desencadeadores da proliferação e aquisição de função efetora (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001). A molécula CD28, constitutivamente expressa em níveis relativamente constantes na superfície de células T CD4+ e CD8+ (CHAMBERS; ALLISON, 1999; WANG; CHEN, 2004), é reconhecida como a principal molécula de co-estimulação para a ativação de células T *naive*. Sua ligação com as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7.2) situadas na células apresentadoras de antígenos (APCs) resulta em ativação, produção de citocinas, proliferação e diferenciação das células T (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002).

Contudo, a ativação celular acarretada pelo estímulo através do TCR e da CD28 também conduz a um aumento da expressão da molécula CD152 (CTLA-4) na superfície dos linfócitos T (BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002). Esta molécula é detectada apenas na superfície celular após a ativação, demonstrando maior afinidade pelos ligantes CD80/86 que a CD28. Como resultado da ligação entre CD152-B7 ocorre às suspensões do ciclo celular e da ativação de células T, com a molécula CD152 tendo atividade antagonista a molécula CD28. Desta forma, a co-estimulação celular acarretada pelo CD28 também desencadeia mecanismos reguladores, impedindo o desenvolvimento de uma ativação celular descontrolada (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001).

O tratamento com o benzonidazol, apesar de não causar impacto relevante na expressão de CD28 nos linfócitos T CD4+, aumentou a população de células CD4+CD152+ estimuladas com EPI no grupo IND+CARD. O grupo CARD também demonstrando elevação destes linfócitos após estímulo com antígeno nas comparações com *ex vivo* e CC (T1 e T2). Estudo experimental em cobaias na fase aguda constatou que o bloqueio da CD152 *in vivo* conduz a um aumento da resistência à infecção pelo *T. cruzi* (MARTINS et al., 2004), o que permite acreditarmos que o aumento na população de células T CD152+ verificado após o tratamento tenha acarretado prejuízo ao indivíduos com acometimento cardíaco por limitar a resposta contra o parasita.

No grupo IND+CARD, o fato de ter ocorrido redução tardia da população de células T CD4+CD152+ no contexto *ex vivo* (T0 versus T2) em detrimento do aumento percentual após cultivo com antígeno de epimastigota (T0 versus T1), demonstra também que o benzonidazol atua de forma diferente sobre a resposta imune basal e a de memória. Enquanto que na primeira ocorreu uma redução tardia, a população estimulada pelo antígeno de *T. cruzi* sofreu elevação percentual com valores significativamente superiores aos apresentados no contexto *ex vivo* logo após a intervenção (T1 e T2). Isto demonstra que possivelmente o benzonidazol permite o retorno da capacidade de ativação celular na resposta imune basal, mesmo mantendo a resposta imune de memória regulada pela CD152.

É importante ressaltar também que a molécula CD152 já foi identificada como marcador de células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3+ (Treg), com sua expressão nas Treg sendo essencial na sustentação da auto-tolerância e da homeostase imunológica (SAKAGUCHI et al., 2005, 2009, 2010). Como houve redução na população de linfócitos T CD25+/high FoxP3+ após o tratamento etiológico em todos os grupos de indivíduos avaliados em nosso estudo, apenas uma avaliação das células T CD4+CD152+FoxP3- permitiria mensurarmos a real interferência da população de linfócitos Treg na redução do percentual celular dentro da população de linfócitos T CD4+CD152+.

Quanto aos linfócitos T CD8+, o benzonidazol ocasionou aumento significativo da população de células T CD8+CD28+ logo após o tratamento (T1) nos grupos IND+CARD e IND. Entretanto, além desta elevação não se manter na avaliação T2, houve uma aumento tardio na população de linfócitos T CD8+CD152+ (T1 versus T2) após 24 horas de cultivo celular nestes mesmos grupos. Desta forma,

acreditamos que ocorreu uma ativação celular que subsequentemente foi controlada pelo aumento da população de células CD152+, com a resposta citotóxica modulada causada pelo benzonidazol podendo ser benéfica ao permitir o controle parasitário sem lesionar os tecidos.

Destacamos, entretanto, que o aumento tardio (T0 versus T2) na população de células T CD8+CD28 os indivíduos CARD, na ausência de alteração significativa na expressão de CD152 nestes linfócitos possivelmente aponta para uma resposta efetora desregulada contra do *T. cruzi*. Tal fenômeno indica que o tratamento etiológico possivelmente acarretou nos pacientes cardíacos um desequilíbrio nos mecanismos efetores que estão relacionados às moléculas co-sinalizadoras expressas pelos linfócitos T.

De forma resumida, levando em consideração a expressão de CD28 e de CD152 na superfície dos linfócitos T, constatamos que ocorreu uma modulação da ativação de linfócitos T CD4+ apenas no grupo CARD, com ausência de impacto relevante destes marcadores no grupo IND. Acerca da população de células T CD8+, enquanto os indivíduos assintomáticos conseguiram desenvolver uma resposta modulada após o tratamento com o benzonidazol, no grupo CARD ocorreu uma ativação desregulada destes linfócitos.

#### 8.1.4 Expressão de CD80, CD86 e HLA-DR em monócitos CD14+

Quanto à presença dos ligantes B7 na membrana das APCs, a CD86 é expressa constitutivamente em baixos níveis, mas com aumento rápido de sua expressão pós-regulação positiva. Por sua vez, a CD80 é expressa mais tardiamente na membrana celular (WANG; CHEN, 2004). Como mencionado no tópico anterior, CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) interagem com CD28 e CD152, atuando no mecanismo co-estimulação/co-inibição mediado por estas moléculas (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002). A inibição pela CD152 é dominante quando a APC, ao apresentar o antígeno, expressa baixos níveis dos receptores B7, enquanto que os sinais da CD28 são dominantes quando o antígeno é apresentado na presença de níveis elevados dos ligantes B7 (CHAMBERS; ALLISON, 1999; COLLINS; LING; CARRENO, 2005).

Contudo, existem evidências de que essas moléculas regulam de forma diferente a resposta imune. Enquanto que a CD86 liga-se preferencialmente ao

CD28, desempenhando papel importante no início da resposta imune, a maior afinidade entre CD80 e CD152 garante o feedback negativo da ativação celular (BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2002; COLLINS et al., 2002; EVANS et al., 2005; ISSAZADEH et al., 1998; JUDGE et al., 1999; MILLER et al., 1995; PENTCHEVA-HOANG et al., 2004; SCHWEITZER; SHARPE, 1998).

Diante do fato de que todos os grupos avaliados em nosso estudo não demonstraram variações contundentes nos níveis de monócitos CD14+CD86+ em associação com a elevação na população de linfócitos T CD8+CD28+, é possível que tenha ocorrido uma potencialização da resposta citotóxica pós-benzonidazol em todos os grupos. Principalmente quando levamos em consideração a redução no percentual de monócitos CD14+CD80+, mesmo na presença de elevada produção de células T CD152+. Contudo, apenas a manutenção desse perfil citotóxico por longo período de tempo é que de fato trará algum malefício, uma vez que a ativação celular sem um acentuado feedback negativo é essencial na eliminação do *T. cruzi*.

Ainda investigando a interferência do tratamento etiológico na resposta imune de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica, avaliamos a população de monócitos CD14+HLA-DR+. Como antígeno glicoproteico MHC classe II, a HLA-DR é responsável por apresentar os peptídeos antigênicos ao receptor nos linfócitos T CD4+ (LA FLAMME et al., 1997). Já havia sido constatado que indivíduos portadores crônicos assintomáticos apresentavam baixo percentual de monócitos CD14+HLA-DR+ em relação aos indivíduos não infectados, o que não foi observado entre aqueles com acometimento cardíaco (SOUZA et al., 2004).

A redução da população de monócitos CD14+HLA-DR+ observada nos grupos IND+CARD e IND ratifica nossos achados acerca das demais moléculas co-sinalizadoras (CD28/152, CD80/86), indicando que o benzonidazol causou inibição da ativação dos linfócitos T CD4+ nos indivíduos tratados. Contudo, Sathler-Avelar et al. (2008) observaram que crianças com a forma indeterminada tratadas com o benzonidazol apresentavam maior percentual de monócitos CD14+HLA-DR<sup>high</sup> que aqueles não tratados (SATHLER-AVELAR et al., 2008).

Quanto ao grupo constituído de indivíduos tratados que já apresentavam algum acometimento no coração (CARD), mesmo não demonstrando redução na população de monócitos CD14+HLA-DR+, a baixa produção celular após estímulo com antígeno de epimastigota em relação às células no contexto *ex vivo* (T2) pode

indicar o estabelecimento deste padrão de inibição dos mecanismos de sinalização entre monócitos e células T, só que de forma mais tardia.

Resumindo os dados acerca das moléculas CD28/CD152 expressas em linfócitos T bem como das moléculas CD80/CD86 e HLA-DR avaliadas nos monócitos CD14+, acreditamos que o benzonidazol causou uma inibição da ativação dos linfócitos T CD4+ em ambos os grupos de pacientes avaliados, com uma concomitante ativação da resposta citotóxica mediada pelos linfócitos T CD8+.

#### 8.1.5 Células T regulatórias

Os linfócitos T CD4+ que demonstram constitutivamente o marcador de superfície CD25 vêm sendo apontados como cruciais na regulação da resposta imunológica em diferentes patologias, como na infecção por HIV (ANDERSSON et al., 2005; KINTER et al., 2004; WEISS et al., 2004) e por *Helicobacter pylori* (LUNDGREN et al., 2003) e na diabetes do tipo 1 (GREEN et al., 2003), sendo denominados de células T regulatórias (Treg). Contudo, desde o relato feito por Sakaguchi et al. (1995) acerca da função imunoregulatória das células T CD4+CD25+, muito foi desvendado sobre seus mecanismos de atuação, além de novos marcadores celulares.

Mesmo a CD25 sendo expressa em abundância na superfície das células Treg em cobaias e humanos, foi proposto que apenas linfócitos T CD4+CD25<sup>high</sup> apresentavam papel regulatório no sistema imune humano, uma vez que esta molécula também está presente na superfície das células T convencionais (ALLAN et al., 2007; BAECHER-ALLAN et al., 2001; SAKAGUCHI, 2004; SAKAGUCHI et al., 2013).

Tais relatos nortearam os primeiros estudos sobre estas células na doença de Chagas crônica. A elevada produção de células T CD4+CD25<sup>high</sup> na forma indeterminada em relação aos pacientes com as formas clínicas crônicas sintomáticas da doença (cardíaca e digestiva) (ARAÚJO et al., 2007; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006) propôs um papel central no equilíbrio da resposta imune e na prevenção da injúria nos tecidos parasitados.

Contudo, a identificação da expressão constitutiva do fator de transcrição *forkhead Box P3* (FoxP3), crucial para o estabelecimento da atividade supressora nos linfócitos Treg, em associação com outros marcadores como CD45RA,

CD45RO, CTLA-4 (CD152), CD103 e GITR, demonstrou que a avaliação apenas das células T CD4+CD25<sup>high</sup> não permitiria uma visualização concisa da população de células Treg (SAKAGUCHI et al., 2010). Segundo Miyara et al. (2009), devido a heterogeneidade fenotípica das células Treg, a observação apenas das célula com elevada expressão de CD25 exclui aquelas CD25<sup>mid</sup>FoxP3<sup>low</sup> (CD45RA<sup>high</sup>CD45RO<sup>-</sup>), designadas de Treg naive (MIYARA et al., 2009).

Desta forma, em nosso estudo optamos por avaliar o comportamento de ambas - células T CD4+CD25<sup>+</sup> e T CD4+CD25<sup>high</sup> – após o tratamento com benzonidazol na fase crônica. O fato de ter havido um aumento progressivo no percentual destes linfócitos em todos os grupos de pacientes (IND+CARD, IND e CARD), conduz a hipótese de que o medicamento traria benefício na fase crônica por estimular a expansão de células relacionadas à redução do processo inflamatório deletério presente nos tecidos parasitados, controlando a morbidade na infecção crônica. A elevada produção de células T CD4+CD25<sup>high</sup>/+ constatada em indivíduos com a forma crônica indeterminada da doença de Chagas ratifica a importância destes linfócitos na manutenção do quadro clínico assintomático (ARAÚJO et al., 2007; BRAZ et al., 2014; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006).

Entretanto, a redução significativa das células T CD4+FoxP3<sup>+</sup>, CD4+CD25+FoxP3<sup>+</sup> e T CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> pós-tratamento que observamos em nosso estudo levantou questionamento sobre esta hipótese. Já existe relato acerca da redução na população de células T CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> no grupo de indivíduos livre de cardiomiopatia/cardiomiopatia leve tratados com o benzonidazol em relação aos não-tratados (GUEDES et al., 2012).

Entre os marcadores de células Treg, o FoxP3 é tido como sua molécula específica, sendo também crucial para a função celular. Mutações neste fator de transcrição interferem no desenvolvimento e na função destes linfócitos, desencadeando a síndrome da desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked* - IPEX) em humanos (BENNETT et al., 2001; BRUNKOW et al., 2001; FONTENOT et al., 2003). Estudos tem demonstrado que processos inflamatórios ou patogênicos podem causar a perda de FoxP3 pelas células Treg, com estes linfócitos T CD4+FoxP3<sup>-</sup> (ex-Treg) adquirindo características de células efectoras (DUARTE et al., 2009; WILLIAMS; RUDENSKY, 2007; ZHOU et al., 2009). É possível que o benzonidazol, ao causar a morte do parasita, tenha conduzido a uma resposta



inflamatória mais contundente que causou o surgimento destas células T CD4+FoxP3-.

Porém, existem evidências de que esta expressão de FoxP3 pode ser reestabelecida. Após estímulo do receptor de célula T (TCR) mediante estimulação antigênica, estas células aparentemente reexpressão o FoxP3, recuperando a atividade supressora (SAKAGUCHI et al., 2013). Além disso, IL-2 produzida por células T convencionais também atua na recuperação desta capacidade regulatória pelas células ex-Treg (DUARTE et al., 2009).

Diante disto, não podemos estabelecer até que ponto a redução desta população de células T pós- benzonidazol seria benéfica ou não, sendo necessário o seguimento destes indivíduos em um maior intervalo de tempo, relacionando os exames clínicos como o comportamento da população de células Treg.

Destacamos também o grande impacto que o tratamento teve sobre a resposta imune basal (contexto *ex vivo*) dos indivíduos portadores crônicos com acometimento cardíaco (grupo CARD). A considerável redução da população celular nos momentos T1 e T2 fez com que estes indivíduos desenvolvessem um padrão celular semelhante ao que os grupos IND+CARD e IND já demonstravam antes da intervenção, quanto à comparação *ex vivo versus* EPI. Os relatos acerca da prevenção clínica após o tratamento etiológico em indivíduos assintomáticos (FABBRO DE SUASNÁBAR et al., 2000; FRAGATA FILHO; SILVA; BOAINAIN, 1995; MACHADO-DE-ASSIS et al., 2013) nos conduzem a crer que o desenvolvimento de um padrão imune basal semelhante ao demonstrado pelo grupo IND seria positivo para os indivíduos do grupo CARD. Porém, apenas o acompanhamento, em paralelo e ao longo do tempo, da resposta imunológica destes indivíduos poderá confirmar esta hipótese.

Diante do que pudemos observar quanto às células Treg antes e após o tratamento com o benzonidazol, constatamos que houve uma supressão deste grupo celular. Este fenômeno pode ser positivo quanto levamos em considerações o controle exercido pelos linfócitos Treg sobre a resposta inflamatória, permitindo com que o organismo potencialize sua ação no sentido de eliminar o *T. cruzi*. Entretanto, a perda desta inibição da população de células regulatórias pode acentuar os danos teciduais oriundos de uma resposta imune desregulada. Acreditamos que é de grande relevância o aprofundamento das análises das diferentes linhagens de linfócitos Treg nestes pacientes tratados. Além do CD25 e do FoxP3, a detecção de

moléculas com CTLA4, CD45RA, CD45RO, GITR, CD127, CD62L, entre tantos outros marcadores presentes nestas células (SAKAGUCHI et al., 2010), permitirá não apenas a compreensão da ação do benzonidazol nas células Treg, como também a identificação de qual subtipo celular, dentro dessa linhagem de linfócitos T, sofre maior impacto após a medicação tripanocida.

## **8.2 Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células imunes de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após o tratamento com o benzonidazol no contexto *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi***

Durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi* ocorre predominância de uma resposta imune do tipo Th1 (pró-inflamatória), que é caracterizada pela produção de citocinas como a IFN- $\gamma$ . Produzida por células T CD4+ e T CD8+, a IFN- $\gamma$  é essencial para o controle da infecção na fase aguda da doença de Chagas (CHESSLER et al., 2009; MELO; MACHADO, 2001; TARLETON et al., 1994; UNE et al., 2003). Contudo, com o estabelecimento da fase crônica ocorrem mudanças no padrão de citocinas, existindo distinções na resposta imune nas diferentes formas clínicas. Enquanto que indivíduos portadores da forma cardíaca demonstram predominância de um perfil inflamatório (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) indivíduos com a forma crônica assintomática podem apresentar um equilíbrio na produção de citocinas regulatórias (IL-4, IL-6, IL-10) e inflamatórias (DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010; SOUZA et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Tais achados demonstram que a observação dos padrões de expressão das diferentes moléculas envolvidas na resposta imunológica pode auxiliar na compreensão da patologia da doença de Chagas crônica.

Diante disso, avaliações que aprofundem o conhecimento acerca do impacto do benzonidazol na produção de citocinas por células da resposta imune de indivíduos portadores da doença de Chagas crônica são pertinentes. Em nosso estudo optamos por avaliar as células T CD4+, T CD8+ e B CD19+ quanto à produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, antes e após a intervenção com o benzonidazol em indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas.

Sathler–Avelar et al. (2006), ao avaliarem crianças classificadas como recentemente na forma indeterminada da doença de Chagas antes e um ano após o tratamento, observaram o surgimento de perfil Th1 modulado, com elevada produção de células T CD4+ e T CD8+ produtoras tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-10+ (SATHLER-AVELAR et al., 2006). Contudo, em estudo posterior, os mesmo autores observaram que indivíduos na forma indeterminada sete anos após o tratamento com benzonidazol demonstravam menor percentual de células T CD4+IFN- $\gamma$ +, CD4+IL-10+ e CD8+IL-10+ em relação ao grupo de indivíduos assintomáticos que não haviam utilizado o benzonidazol, afirmando que a medicação teria causado uma inibição na produção de citocinas inflamatórias e regulatórias (SATHLER-AVELAR et al., 2012).

Em nosso estudo, ao avaliarmos adultos com as formas crônicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, observamos redução dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ produtores de IFN- $\gamma$  em todas os grupos, indicando uma redução da resposta inflamatória pós-benzonidazol. Quanto à produção de IL-10, apenas o grupo IND+CARD demonstrou redução significativa na população de linfócitos T CD8+IL-10+, não havendo alteração no percentual de células T CD4+IL-10+. Diante destes achados, acreditamos que esta relativa manutenção da produção de IL10 pelos linfócitos T CD4+ na presença de redução de células T IFN- $\gamma$ + indica que o tratamento pode ter controlado a resposta inflamatória, porém sem o envolvimento dos mecanismos relacionados à produção de IL-10 por linfócitos T CD4+.

Entre as demais células envolvidas na produção de citocinas na doença de Chagas crônica, os monócitos já foram designados como a principal célula produtora de IL-10 entre os indivíduos portadores crônicos assintomáticos, mediando o controle da patologia presente na doença de Chagas (GOMES et al., 2003). Diante disto, estas células poderiam estar relacionadas com a redução na população de células T IFN- $\gamma$ + demonstrada em nosso estudo. Entretanto, monócitos CD14+IL-10+ também apresentaram reduzido percentual celular na forma indeterminada tratada com benzonidazol (SATHLER-AVELAR et al., 2012). Desta forma, acreditamos que o tratamento etiológico não só reduz à produção de moléculas cruciais na eliminação do *T. cruzi* (IFN- $\gamma$ ) pela população de linfócitos T, como também inibe a expressão de moléculas regulatórias da resposta imune por linfócitos T CD8+ (IL-10), indicando uma possível regulação negativa de ambas às citocinas.

Como dito anteriormente, as células B também produzem citocinas, estando envolvidas na resposta imune celular e humoral (GROS; NAQUET; GUINAMARD, 2008; SHAH; QIAO, 2008). Atualmente existe uma divisão funcional de subtipos de linfócitos B, com aqueles produtores de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (B1) e de IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-6 (B2) sendo designados de células B efectoras, enquanto que as IL-10+ e TGF- $\beta$ + são conhecidas por B regulatórias (Breg) (LUND et al., 2005; MIZOGUCHI; BHAN, 2006).

Em nosso estudo ocorreu redução da população de células B CD19+IFN- $\gamma$ + pós-tratamento em todos os grupos de indivíduos avaliados, o que discorda do aumento que observamos na população de linfócitos B1 (CD5+CD19+), células relacionadas à resposta tipo Th1 (LUND et al., 2005; LUND, 2008). Esta redução na produção de IFN- $\gamma$  causada pelo tratamento etiológico pode ter acarretado benefício aos indivíduos que já demonstram dano tecidual decorrente da reposta inflamatória. Contudo, a baixa expressão de IFN- $\gamma$  pode facilitar a manutenção do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro (CHESSLER et al., 2009; MELO; MACHADO, 2001; TARLETON et al., 1994; UNE et al., 2003).

É importante ressaltar, entretanto, que esta redução da expressão de IFN- $\gamma$  pode ser reflexo da regulação oriunda dos linfócitos B regulatórios (Breg). Linfócitos B produtores de IL-10, as células Breg exercem função supressora, atuando na inibição das respostas Th17 e Th1, além de induzirem a diferenciação e manutenção das células Treg (LUND et al., 2005; LUNDY, 2009; MAURI; BOSMA, 2012; MIZOGUCHI; BHAN, 2006). Elevação na população de linfócitos B CD19+IL-10+ após cultivo celular, mesmo que tardia, foi demonstrada pelos grupos IND e CARD.

Já havia relato de aumento da produção de IL-10 em linfócitos B CD19+ oriundos de crianças com a forma crônica assintomática um ano após o tratamento etiológico (SATHLER-AVELAR et al., 2006). Porém, indivíduos com a forma indeterminada não-tratados demonstraram maior percentual de células B CD19+IL-10+ que aqueles tratados com o benzonidazol (SATHLER-AVELAR et al., 2012).

Ressaltamos, mesmo com esse aumento das células Breg, a redução na população de linfócitos Treg apresentada por todos os grupos avaliados em nosso estudo, o que levanta questionamentos sobre o papel dos linfócitos Breg na sustentação da população de células Treg na doença de Chagas crônica. Enquanto a queda no percentual de linfócitos T CD4+CD25high/+FoxP3+ foi detectada na

primeira avaliação após a intervenção (T1), o aumento da população de células B CD19+IL-10+ só surgiu de forma significativa na avaliação subsequente (T2). Desta forma, é possível que a ação positiva dos linfócitos Breg sobre a população de células Treg só seja detectada nas avaliações mais tardias entre os portadores crônicos da doença de Chagas tratados com o benzonidazol.

### **8.3 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de sangue total de portadores crônicos da doença de Chagas antes e após tratamento com o benzonidazol após estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi***

Prosseguindo com a avaliação quanto à produção de citocinas após o tratamento com o benzonidazol, realizamos a detecção das moléculas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 no sobrenadante de cultura celular. Mesmo não observando alterações contundentes ao avaliarmos os grupos clínicos separadamente (IND e CARD), nossos achados quanto ao total de indivíduos (IND+CARD) permitiram que construíssemos algumas hipóteses.

A citocina IL-4 regula a proliferação celular e apoptose, bem como a expressão de genes em vários tipos celulares, como linfócitos, macrófagos e fibroblastos (LAPORTE et al., 2008; MUELLER et al., 2002; NELMS et al., 1999), tendo sido relacionada com o controle da resposta inflamatória e da patologia na doença de Chagas crônica (LORENA et al., 2010; SOARES et al., 2001; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Em nosso estudo observamos uma redução de IL-4 logo após o tratamento pelo grupo IND+CARD, o que indicaria perda da regulação celular mediada por esta molécula. Contudo, esta desregulação ocorreu de forma temporária, havendo aumento significativo em seus níveis na comparação T1 *versus* T2.

Também avaliamos a expressão de IL-6 antes e após o tratamento com o benzonidazol. Esta citocina, quando em associação com o TGF- $\beta$  induz a geração de células Th17 a partir de células T imaturas, enquanto inibe a diferenciação de linfócitos Treg induzida por TGF- $\beta$ , mediando o equilíbrio entre Th17/Treg. Dado o papel crucial da IL-6 no equilíbrio entre estas duas populações celulares, o excesso ou desregulação na produção de IL-6 pode conduzir a processos auto-imunes (BETELLI et al., 2006; KIMURA, KISHIMOTO, 2010). Diante disto, a elevação na

produção desta citocina que observamos após o tratamento pode ser prejudicial. Destacamos o fato de ter ocorrido redução da população de células T reg CD4+CD25+/highFoxP3+ em nosso estudo, demonstrando um possível relação entre a elevação da IL-6 e a redução na produção destes linfócitos.

Acerca da secreção de IL-10 no sobrenadante de cultura, acreditamos que a elevação na produção desta citocina pode estar relacionada a elevação da população de linfócitos Breg (CD19+IL-10+) após a intervenção com o benzonidazol. Desta forma, os dados que obtivemos na avaliação através do CBA ratificam a importância do aprofundamento quanto aos demais marcadores celulares para linfócitos B na população de portadores crônicos da doença de Chagas submetidos ao tratamento etiológico.

Ademais estas colocações, o aumento tardio de IL-4, IL-6 e IL-10 indicaria o surgimento de um padrão de citocinas que caracterizam a resposta Th2 (regulatória). Em associação com o aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  que observamos no grupo IND+CARD (T0 *versus* T2 e T1 *versus* T2), tais dados podem indicar que o benzonidazol originou uma resposta Th1-modulada no grupo IND+CARD, só que de forma tardia. Um perfil modulado, com elevada produção de células T e B produtoras de IL10+ em conjunta com linfócitos T CD8+IFN- $\gamma$  já havia sido observado em crianças com a forma indeterminada um ano após o tratamento com o benzonidazol (SATHLER-AVELAR et al., 2008). Entretanto, Guedes et al. (2012) observaram que os indivíduos tratados com o benzonidazol que foram classificados no grupo livre de cardiomiopatia/cardiomiopatia leve apresentavam reduzida expressão de IL-10 e elevada produção de IFN- $\gamma$  em detrimento dos não tratados (GUEDES et al., 2012).

Ainda sobre a produção de IFN- $\gamma$ , mesmo com a redução do percentual de células T e B IFN- $\gamma$ + após o tratamento etiológico, houve aumento desta citocina no sobrenadante de cultura, levantando questionamento sobre qual seria a origem desta elevação nos grupos IND+CARD e IND. Alguns trabalhos constataram que portadores com a forma indeterminada que haviam sido tratados com o benzonidazol demonstravam elevada população de células NK IFN- $\gamma$ + após estímulo com antígeno de epimastigota, em relação aqueles que não receberam a medicação (SATHLER-AVELAR et al., 2006, 2012).

Contudo, outros estudos demonstraram redução na produção desta citocina após o tratamento etiológico (CUTRULLIS et al., 2011; LAUCELLA et al., 2009), afirmando que o benefício seria oriundo da redução da resposta inflamatória deletéria aos tecidos do hospedeiro. Entretanto, a redução dos níveis parasitários, mesmo na ausência de cura, demonstrou ser importante para manutenção do quadro assintomático (BRENER; GAZZINELLI, 1997; GARCÍA et al., 2005), indicando que uma produção modulada de IFN- $\gamma$  seria o melhor perfil imunológico a ser apresentado na fase crônica da doença de Chagas.

A ausência de alterações significativas nos níveis de TNF- $\alpha$  após o tratamento etiológico demonstra ser um ponto positivo quanto ao impacto do benzonidazol na produção de citocinas devido ao fato de que a patologia cardíaca na doença de Chagas crônica é relacionada à produção de TNF- $\alpha$  (FERREIRA et al., 2003; LORENA et al., 2010; SOUZA et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008). A elevada expressão de TNF- $\alpha$  estando associada a disfunção cardíaca e a um prognóstico desfavorável (TALVANI et al., 2004). Indivíduos com a forma indeterminada tratados com o benzonidazol demonstraram elevado percentual de células NK, T CD8+, B CD19+ produtoras de TNF- $\alpha$ , porém reduzida população de monócitos e linfócitos T CD4+ positivos para esta molécula quando comparados ao grupo de não-tratados (SATHLER-AVELAR et al., 2006, 2012). Diante de tais dados, acreditamos que apenas uma avaliação conjunta da produção intracitoplasmática e no sobrenadante de cultura permitirá a identificação do impacto do benzonidazol sobre a produção do TNF- $\alpha$ .

Destacamos a redução de IL-2 após a intervenção não só no grupo IND+CARD, como também na avaliação das formas clínicas em separado (IND e CARD). Esta citocina conduz a diferenciação e expansão de células T, aumento da atividade citolítica das células NK, indução da diferenciação de células Treg, além de mediar à morte celular induzida por ativação (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). Diante do que foi exposto, acreditamos que a baixa secreção de IL-2 no sobrenadante de cultura pós-benzonidazol pode estar diretamente relacionada com a baixa produção dos linfócitos Treg CD4+CD25+/highFoxP3+ e das células NK CD56- que observamos em nosso estudo.

Quando analisamos os grupos IND e CARD de forma separada, mesmo não verificando as diferenças estatísticas demonstradas pela população total, foi possível identificar alguns dados interessantes. O grupo IND demonstrou elevada produção

de IFN- $\gamma$  após o tratamento etiológico. Em associação com a redução de citocinas relacionadas à mecanismos de regulação da resposta imune (IL-2 e IL-4), causa preocupação por ser um padrão de resposta que pode originar dano tecidual quando mantido por longo período de tempo. Por sua vez, a elevada produção de IL10 só foi demonstrada pelo grupo CARD. Diante do fato de que estes pacientes já apresentam dano no tecido cardíaco, o aumento na produção de IL-10 é benéfica no sentido de controlar a resposta e conseqüentemente prevenir a evolução clínica.

Porém, o fato de não ter sido observado o padrão modulado de citocinas no sobrenadante de cultura nos grupos clínicos em separado (IND e CARD) impede concluirmos sobre o real impacto do benzonidazol na secreção destas citocinas.



## 9 CONCLUSÕES

- a) A elevação temporária da população de linfócitos B1 (CD5+CD19+) em todos os grupos de indivíduos avaliados demonstra que o tratamento etiológico pode atuar promovendo a eliminação dos antígenos parasitários através desta população celular;
- b) O tratamento etiológico beneficiou os portadores crônicos com acometimento cardíaco no que diz respeito à resposta citotóxica mediada pelas células NK. Contudo, a forma indeterminada apresentou redução na produção de células NK CD3-CD16+CD56- após a intervenção;
- c) Relacionando o impacto do benzonidazol nas populações de células T CD28+ e CD152+ e de monócitos CD80+, CD86+ e HLA-DR+, acreditamos que ocorreu inibição da ativação dos linfócitos T CD4+ através destes receptores, com concomitante elevação da resposta citotóxica mediada pelas células T CD8+;
- d) O tratamento etiológico acarretou redução da população de linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ em todos os grupos avaliados, sugerindo que o benzonidazol provoca perda na regulação da resposta imune por estas células;
- e) A manutenção da produção de IL-10 pelos linfócitos T CD4+ na presença de redução de células T IFN- $\gamma$ + indica que o tratamento controla este mecanismo inflamatório por outra via que não a relacionada à produção de linfócitos T CD4+IL-10+;
- f) A redução da população de células B CD19+IFN- $\gamma$ + com expansão tardia de linfócitos B CD19+IL-10+ sugere que o benzonidazol promoveu o surgimento de um padrão de citocinas favorável à manutenção do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro;
- g) O estabelecimento tardio de uma resposta Th1-modulada no grupo IND+CARD, com elevação na produção tanto de IFN- $\gamma$  (citocina inflamatória) quanto de IL-4, IL-6 e IL-10 (citocinas regulatórias), indica que o tratamento originou uma resposta imune que atua contra o parasita sem causar dano ao tecido do hospedeiro.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho é pioneiro ao realizar estudo longitudinal do impacto do benzonidazol sobre aspectos relacionados a ativação, a regulação, a citotoxicidade e a inflamação celular em um grupo de indivíduos adultos enquadrados na fase crônica da doença de Chagas.

Pudemos observar que o benzonidazol atuou inibindo populações celulares relevantes para a prevenção das injúrias teciduais características da fase crônica da doença de Chagas, como na produção de células Treg, além de interferir na expressão de moléculas de co-sinalização entre monócitos (CD80, CD86 e HLA-DR) e linfócitos T (CD28 e CD152). Também houve redução na população de células NK, T IFN- $\gamma$ + e B IFN- $\gamma$ +, fenômeno favorável à manutenção do *T. cruzi*. Neste sentido, poderíamos afirmar que o uso do benzonidazol não seria uma boa abordagem para o tratamento destes indivíduos.

Contudo, o aumento dos linfócitos B1 logo após o tratamento (T1) demonstra que o benzonidazol estimula a resposta imune no sentido de eliminar os antígenos do *T. cruzi*. Isto, em associação com os eventos tardios de elevação na produção de células B CD19+IL-10+ (T2) e de uma resposta Th1 modulada (elevada produção de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10) no grupo IND+CARD indica que as alterações celulares que observamos podem ser transitórias. Porém, não foi observado este mesmo padrão de citocinas nas formas clínicas indeterminada e cardíaca em separado.

De forma resumida, nossos dados indicam que o tratamento etiológico ocasionou um desequilíbrio da resposta imune basal e de memória. Contudo, a avaliação em separado das formas clínicas tratadas com o benzonidazol por um maior intervalo de tempo, assim como a quantificação dos parasitas circulantes durante este seguimento, trará respostas aos questionamentos originados neste estudo. Também ressaltamos que as alterações imunológicas que observamos entre os pacientes tratados indicam potenciais marcadores imunológicos para o acompanhamento após o tratamento etiológico, o que permitirá novas abordagens quanto à intervenção na fase crônica desta parasitose.

## 11 PERSPECTIVAS

- a) Continuar as coletas amostrais dos indivíduos avaliados em intervalos de um ano após o tratamento etiológico no decorrer de dez anos, bem como expandir o n amostral;
- b) Realizar a quantificação dos parasitas circulantes nas amostras de sangue coletadas antes e após o tratamento com o benzonidazol através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.

## REFERÊNCIAS

- ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 1, n. 3, p. 220-228, 2001.
- ALLAN, S. E. et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. **International immunology**, Oxford, v. 19, p. 345-354, 2007.
- ANDERSSON, J. et al. Cutting edge: the prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 174, p. 3143-3147, 2005.
- ANDRADE, S. G. et al. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bulletin of the World Health Organization**, Genève, v. 69, n. 2, p. 191-197, jan. 1991.
- ANDRADE, J. P. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 1-48, 2011.
- AÑEZ, N. et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 5, p. 726-732, 1999.
- ARAÚJO, F. F. et al. Potencial role of CD4+CD25high regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, New York, v.12, p. 2797-2806, 2007.
- ARAÚJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e992, jan. 2011.
- ARAÚJO, F. F. et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 217, n. 8, p. 768-77, ago. 2012.
- BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 167, p. 1245-1253, 2001.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN-g in human Chagas' disease : protection or pathology ? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, p. 127-131, 1998.
- 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, abr. 2004.

BAUMGARTH, N.; TUNG, J. W.; HERZENBERG, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. **Springer seminars in immunopathology**, Berlin, v. 26, p. 347–362, 2005.

BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 406-412, ago. 2006.

BENNET, C. L. et al. The Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature genetics**, New York, v. 27, p. 20-21, 2001.

BERMEJO, D. A. et al. BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. e679, 2010.

BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.

BERN, C. et al. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, p. 2527–2534, 2011.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, London, v. 441, p. 235–238, 2006.

BOUAZIZ, J. D.; YANABA, K.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. **Immunology Reviews**, Copenhagen, v. 224, p. 201-214, 2008.

BOUR-JORDAN, H. BLUESTONE, J. CD28 Function: A balance of costimulatory and regulatory signals. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2002.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso brasileiro em doença de chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília: SBMT, v. 38, supl. 3, 2005.

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

BRAZ, S. C. M. et al. Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 318-323, jun. 2011.

- BRAZ, S. C. M. et al. Increase in the Expression of CD4 + CD25+ Lymphocytic T Cells in the Indeterminate Clinical Form of Human Chagas Disease After Stimulation With Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 34, n. 8, p. 991-998, 2014.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, New York, v. 114, p. 103-110, 1997.
- BRICEÑO-LEÓN, R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 71-82, 2009.
- BRITTO, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Chagasic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization. **Experimental Parasitology**, New York, v. 81, n. 4, p. 462-471, 1995.
- BRITTO, C. et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 823-826, ago. 2001.
- BRUNNER, M. C. et al. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 162, n. 10, p. 5813-5820, 1999.
- BRUNKOW, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature genetics**, New York, v. 27, p. 68-73, 2001.
- BUSCAGLIA, C. A.; NOIA, J. M. D. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and infection**, Paris, v. 5, n. 5, p. 419-427, 2003.
- 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**, New York, v. 14, n. 5, p. 542-550, 2008.
- CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, Washington, v. 112, n. 3, p. 461-469, 2008.
- CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 331-335, 1999.
- CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10 : role of NK cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 64, n. 1, p. 28-36, 1996.
- CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favor T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, Oxford, v. 122, p. 584-595, 2007.

- CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, p. 1538-1543, 2000.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. N. esp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAN, A. et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 179, p. 89-94, 2007.
- CHAMBERS, C. A.; ALLISON, J. P. Costimulatory regulation of T cell function. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, v. 11, n. 2, p. 203-210, 1999.
- CHESSLER, A. D. et al. *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 182, p. 2288-2296, 2009.
- COLLINS, A. et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity**, Cambridge, v. 17, p. 201-210, 2002.
- COLLINS, M.; LING, V.; CARRENO, B. M. The B7 family of immune-regulatory ligands. **Genome biology**, London, v. 6, n. 6, p. 223, jan. 2005.
- CONSTANT, S. et al. B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 155, p. 3734-3741, 1995.
- COOPER, M. A. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. **Blood**, Washington, v. 97, n. 10, p. 3146-3151, 2001.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 253-255, 1999.
- COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 171-176, abr. 2002.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.
- 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, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, p. 641–645, 2011.

COUTINHO, M.; DIAS, C. J. P. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciências e Tecnologia**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 11-51, 1999.

CUTRULLIS, R. A. et al. Benznidazole Therapy Modulates Interferon- $\gamma$  and M2 Muscarinic Receptor Autoantibody Responses in *Trypanosoma cruzi*-Infected Children. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e27133, 2011.

D'AVILA REIS, D. et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 2, p. 177-178, 2001.

DE ARRUDA HINDS, L. B. et al. Increased immunoglobulin secretion by B-lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected mice after B lymphocytes-natural killer cell interaction. **Parasite immunology**, Oxford, v. 23, p. 581-586, 2001.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas Disease in Brazil. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 3, n. 11, p. 336-341, 1987.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.

DIAS, J. C. P. Chagas disease: successes and challenges. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, out. 2006.

DUARTE, J. H. et al. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenesis helper cells in lymphopenic conditions. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 39, p. 948-955, 2009.

DUTRA, W. O. et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **International immunology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 499-506, abr. 1994.

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.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.

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, v. 104, p. 208-218, 2009.

EVANS, E. J. et al. Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. **Nature immunology**, New York, v. 6, p. 271-279, 2005.

FABBRO DE SUASNÁBAR, D. et al. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 99-109, 2000.

FARES, R. C. G. et al. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 35, p. 214–223, 2013.

FEHÉRVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. Review series CD4 + Tregs and immune control. **Journal of Clinical Investigation**, Durham, v. 114, n. 9, p. 1209-1217, 2004.

FERNANDES, C. D. et al. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 27-32, 2009.

FERNÁNDEZ, E. R. et al. Altered Distribution of Peripheral Blood Memory B Cells in Humans Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Public Library of Science one**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. e104951, 2014.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 407–411, 2003.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, New York, v. 4, p. 330-336, 2003.

FRAGATA FILHO, A. A.; SILVA, M. A. D.; BOAINAIN, E. Etiologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 113, n. 2, p. 867-872, 1995.

FRAGATA FILHO, A. A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 2-5, 2009.

FUGIMOTO, M.; SATO, S. B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. **Journal of dermatological science**, Amsterdam, v. 46, p. 1-9, 2007.

GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

GODFREY, D. I. et al. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 21, n. 11, p. 573-83, 2000.

GODFREY, D. I.; KRONENBERG, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. **Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 114, n. 10, p. 1379-88, 2004.

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**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GONTIJO, E. D. et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 243-254, 2009.

GREEN, E. A. et al. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF- $\beta$ -TGF- $\beta$  receptor interactions in type 1 diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 10878-10883, 2003.

GROS, M. J.; NAQUET, P.; GUINAMARD, R. R. Cell intrinsic TGF- $\beta$ 1 regulation of B cells. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 180, p. 8153–8158, 2008.

GUEDES, P. M. M. et al. Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. **Tropical Medicine and International Health**. Oxford, v. 17, n. 9, p. 1057-1065, 2012.

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

HARRIS D. P. et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. **Nature immunology**, New York, v. 1, p. 475–482, 2000.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England journal of medicine**, Melbourn, v. 357, p.1018-1027, 2007.

HUDSON, T. H.; GRILLO, F. G. Brefeldin-A enhancement of ricin A-chain immunotoxins and blockade of intact ricin, modeccin, and abrin. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 28, p. 18586-18592, 1991.

- ISRAELSKI, D. M.; SADLER, R.; ARAUJO, F. G. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 39, p. 445-455, 1985.
- ISSA, V. S.; BOCCHI, E. A. Antitrypanosomal agents: treatment or threat? **Lancet**, London, v. 376, n. 768, p. 768–769, 2010.
- ISSAZADEH, S. et al. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 161, p. 1104–1112, 1998.
- JUDGE, T. A. et al. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 162, p. 1947–1951, 1999.
- JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 12, p. e29, 2010.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 40, n. 7, p. 1830–1835, 2010.
- KINTER, A. L. et al. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses *in vitro* and are associated with favorable clinical markers of disease status. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 200, p. 331-343, 2004.
- KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance Against *Trypanosoma Cruzii* Associated To Anti-Living. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, 1982.
- KROPF, S. P. **Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.
- LA FLAMME, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi* infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 27, p. 3085–3094, 1997.
- LANIER, L. L. et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 136, p. 4480-4486, 1986.
- LAPORTE, S. L. et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. **Cell**, Cambridge, v. 132, p. 259–272, 2008.
- LAUCELLA, S. A. et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 49, n. 11, p. 1675-1684, dez. 2009.

LAURIA-PIRES, L. et al. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 63, n. 3-4, p. 111-118, 2000.

LEIBSON, P. J. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of killer. **Immunity**, Cambridge, v. 6, p. 655-661, 1997.

LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 23, n. 5, p. 598–604, 2011.

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.

LUND, F. E. et al. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. **Current directions in autoimmunity**, New York, v. 8, p. 25–54, 2005.

LUND, F. E. Cytokine-producing B lymphocytes — key regulators of immunity. **Current opinion in immunology**, London, v. 20, p. 332–338, 2008.

LUNDGREN, A. et al. *Helicobacter pylori*-specific CD4+CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H.pylori* infected individuals. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, p. 1755-1762, 2003.

LUNDY, S. K. Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. **Inflammation research**, Basel, v. 58, p. 345–357, 2009.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F. et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p. 873-80, 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arquivos Brasileiros em Cardiologia**, São Paulo, v. 79, p. 623–627, 2002.

MARIN-NETO, J. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American heart journal**, St. Louis, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 319-24, 2009.

MARTINS, G. A. et al. CTLA-4 Blockage Increases Resistance to Infection with the Intracellular Protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 172, p. 4893-4901, 2004.

MARTINS-FILHO, O. A et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 2, n. 5, p. 569-573, 1995.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune Regulatory Function of B Cells. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 30, p. 221–241, 2012.

MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. The 'short' history of regulatory B cells. **Trends immunology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 34-40, 2007.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative biochemistry and physiology. **Molecular and integrative physiology**, New York, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological research**, Santiago, v. 43, n. 3, p. 323-331, 2010.

MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

MELO, R. C.; MACHADO, C. R. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Experimental parasitology**, Orlando, v. 97, n. 1, p. 15–23, 2001.

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

MILLER, S. D. et al. Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. **Immunity**, Cambridge, v. 3, p. 739–745, 1995.

MIYARA, M. et al. Function delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, Cambridge, v. 30, p. 899-911, 2009.

MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p. 705-710, 2006.

MOLICA, A. M. **Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

- MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosom cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 125, p. 23-31, 2013.
- MUELLER, T. D. et al. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1592, p. 237–250, 2002.
- MURTA, S. M. et al. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 535-544, 1999.
- NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 17, p. 701–738, 1999.
- NUNES, M. C. P. et al. Chagas Disease: Na Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of American College of Cardiology**, Mexico, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.
- OLIVEIRA FILHO, A. M. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides - implications for Chagas disease vector control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 425-8, 1999.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of Chagas disease. **World Health Organization technical report series**, Genève, v. 905, p. 1-109, 2002.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: conclusiones de reunión de especialistas, OPC/HPC/HCT/140/99.32p. **Revista de Patologia Tropical**, Goiania, v. 28, n. 2, p. 247-79, 1999.
- OSTERMAYER, A. L. et al. The National Survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, Brasília, v. 44, supl. 2, p. 108-121, 2011.
- OUYANG, Q. et al. Telomere length in human natural killer cells subsets. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1106, p. 240-252, 2007.
- PENTCHEVA-HOANG, T. et al. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. **Immunity**, Cambridge, v. 21, p. 401-413, 2004.
- PEREIRA, V. R. A. et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. **Imunodiagnóstico da doença de Chagas crônica utilizando os antígenos Tc 46 e Tc 58. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 367-370, 2000.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 64, n. 6, p. 1139-1147, 2009.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria-Executiva de Vigilância em Saúde. **Programa Sanar**. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/ses-apresenta-balanco-de-acoes-do-sanar/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

PETHERICK, A. et al. Country by country. **Nature**, London, p. 10-11. 2010.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 11, p. 4896-4899, 2010.

PINTO, A. Y. DAS N. et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region . Study of 233 cases from Pará , Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

PINTO, A. Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 25, n.1, p. 77-83, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet**, London, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

RASSI Jr, A.; RASSI, A. Predicting prognosis in patients with Chagas disease: why are the results of various studies so different? **International journal of cardiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 64-5, 2010.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clinical Cardiology**, New York, v. 23, p. 883-889, 2000.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S. J. R. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  cells and dominance of granzyme A+. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 637-44, 1993.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, p. 301–314, 1998.

RIBEIRO, A. L., et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, London, v. 9, p. 576–589, 2012.

ROBERTSON, M. J., RITZ, J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. **Blood**, New York, v. 76, p. 2421-2438, 1990.

- ROMAGNANI, C. et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor-NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 178, p. 4947-4955, 2007.
- SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor alpha-Chains (CD25). **Journal of Immunology**, Baltimore, p. 1151-1164, 1995.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune reponses. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 22, p. 531-562, 2004.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature immunology**, New York, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.
- SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, Cambridge, v. 133, n. 5, p. 775-787, 2008.
- SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **International Immunology**, v. 21, n. 10, p.1105-11, 2009.
- SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature**, London, v. 10, p. 490-500, 2010.
- SAKAGUCHI, S., et al. The plasticity and srability of regulatory T cells. **Nature**, London, v. 13, p. 461-467, 2013.
- SATHLER-AVELAR, R. et al. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 58, p. 655-663, 2003.
- SATHLER-AVELAR, R. et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 64, n. 5, p. 554-563, nov. 2006.
- SATHLER-AVELAR, R. et al. 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**, Paris, v. 10, p. 103-113, 2008.
- SATHLER-AVELAR, R. et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC infectious diseases**, London, v. 12, p. 1-12, jan. 2012.
- SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. Souther cone initiative against Chagas disease. **Advances in parasitology**, London, v. 42, p.1-27, 1999.



SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 161, p. 2762–2771, 1998.

SHAH, S.; QIAO, L. Resting B cells expand a CD4+CD25+Foxp3+ Treg population via TGF- $\beta$ 3. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 38, p. 2488–2498, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and Interferon Gama Regulation of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVEIRA, A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3<sup>+</sup> cells in chagasic patients with and without megacolon. **Human immunology**, New York, v. 70, p. 65-67, 2009.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 2, p. 35-42, 2000.

SOARES, M. B. P. et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4. dissociation between inflammation and tissue parasitism. **American journal of pathology**, Philadelphia, v. 159, p. 703–709, 2001.

SONDERGAARD, S. R.; ULLUM, H.; PEDERSEN, B. K. Proliferative and cytotoxic capabilities of CD16+CD56- and CD16+/-CD56+ natural killer cells. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 108, n. 12, p. 831-837, 2000.

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.

- SOUZA, P. E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 75, n. 4, p. 1886-1894, 2007.
- STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.
- TAKAHASHI, E. et al. Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16-CD56bright NK cells but also from CD16-CD56dim NK cells. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 65, p. 126-138, 2007.
- TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 38, p. 943-50, 2004.
- TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P. Chagas disease has now gone global. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. 1136, jan. 2011.
- TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1820-1829, 1994.
- TAYLOR, J. J.; JENKINS, M. K.; PAPE, K. A. Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. **Trends in immunology**, Oxford, v. 33, p. 590-597, 2012.
- UNE, C.; ANDERSSON, J.; ORN, A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 134, p. 195-201, 2003.
- VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; NETO, H. F. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 395-398, 1999.
- VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American heart journal**, St. Louis, v. 127, n. 1, p. 151-162, 1994.
- VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 144, p. 724-734, 2006.
- VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v. 7, n. 2, p. 157-163, 2009.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 145, n. 1, p. 81-92, 2006.

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, n. 5, p. 516-525, 2008.

YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 7, n. 3, sup. 7, p. e488, 2009.

WALZER, T. et al. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 19, p. 365-372, 2007.

WANG, S.; CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cellular and molecular immunology**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 37-42, 2004.

WATANABE, R., et al. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. **American journal of pathology**, Philadelphia, v. 171, p. 560-570, 2007.

WEISS, L., et al. Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells which suppress HIV-specific CD4-T cell responsis in HIV-infected patients. **Blood**, Washington, v. 104, p. 3249-3256, 2004.

WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the FoxP3-dependent development program in mature regulatory T cells requires continued expression of FoxP3. **Nature immunology**, New York, v. 8, p. 277-284, 2007.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 180, n. 2, p. 480-486, ago. 1999.

ZHOU, X. et al. Instability of the transcription factor FoxP3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo*. **Nature Immunology**, New York, v. 10, p. 1000-1007, 2009.

ZIRGLER, S. F. FOXP3: of mice and men. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 24, p. 209-226, 2006.

## APÊNDICE A

Quadro 1 - Efeitos colaterais apresentados pelos portadores crônicos da doença de Chagas tratados com o benzonidazol.

| <b>Paciente</b> | <b>Duração do tratamento (dias)</b> | <b>Efeitos colaterais</b>                                 |
|-----------------|-------------------------------------|---|
| <b>BENZ 01</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 02</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema palmar/plantar)                   |
| <b>BENZ 04</b>  | 60                                  | Epigastralgia   |
| <b>BENZ 05</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 06</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema palmar)                           |
| <b>BENZ 07</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 08</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 09</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 10</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema)                                  |
| <b>BENZ 11</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 12</b>  | 48                                  | Parestesia, dor no corpo, tontura, febre                  |
| <b>BENZ 13</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema palmar/plantar)                   |
| <b>BENZ 14</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 16</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema)                                  |
| <b>BENZ 18</b>  | 9                                   | Dermatológico grave (exantema generalizado, edema), febre |
| <b>BENZ 19</b>  | 11                                  | Dermatológico (exantema)                                  |
| <b>BENZ 20</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 22</b>  | 60                                  | Ausente   |
| <b>BENZ 23</b>  | 9                                   | Dermatológico (exantema, edema, eritema)                  |
| <b>BENZ 24</b>  | 60                                  | Dermatológico (exantema)                                  |
| <b>BENZ 25</b>  | 10                                  | Dermatológico (exantema), cefaleia, febre                 |

Fonte: A autora.

**APÊNDICE B**

Quadro 2 – Características dos indivíduos tratados com o benzonidazol

| <b>Paciente</b> | <b>Sexo</b> | <b>Idade</b> | <b>Naturalidade</b>      | <b>Tempo de infecção crônica (anos)</b> | <b>Classificação clínica</b> |
|-----------------|-------------|--------------|--------------------------|---|------------------------------|
| <b>BENZ 01</b>  | M           | 54           | Flores-PE                | 4                                       | A                            |
| <b>BENZ 02</b>  | M           | 49           | Sertânea-PE              | 10                                      | B1                           |
| <b>BENZ 04</b>  | M           | 35           | São Benedito do Sul-PE   | 1                                       | B1                           |
| <b>BENZ 05</b>  | F           | 55           | Floresta-PE              | 2                                       | A                            |
| <b>BENZ 06</b>  | M           | 54           | Aliança-PE               | 1                                       | B1                           |
| <b>BENZ 07</b>  | F           | 43           | Ibimirim-PE              | 4                                       | A                            |
| <b>BENZ 08</b>  | F           | 58           | Pilões-PB                | 13                                      | B1                           |
| <b>BENZ 09</b>  | F           | 41           | Custódia-PE              | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 10</b>  | F           | 34           | Maraial-PE               | 4                                       | B1                           |
| <b>BENZ 11</b>  | M           | 44           | Custódia-PE              | 1                                       | B1                           |
| <b>BENZ 12</b>  | M           | 34           | Custódia-PE              | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 13</b>  | F           | 38           | Ibimirim-PE              | 2                                       | C                            |
| <b>BENZ 14</b>  | F           | 31           | Recife-PE                | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 16</b>  | F           | 48           | Lagoa dos Gatos-PE       | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 18</b>  | F           | 35           | Inajá-PE                 | 7                                       | A                            |
| <b>BENZ 19</b>  | M           | 37           | Sertânea-PE              | 3                                       | A                            |
| <b>BENZ 20</b>  | F           | 56           | Capela-AL                | 1                                       | C                            |
| <b>BENZ 22</b>  | F           | 42           | Nova Olinda-PB           | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 23</b>  | F           | 53           | Sertânea-PE              | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 24</b>  | M           | 49           | Monteiro-PB              | 1                                       | A                            |
| <b>BENZ 25</b>  | F           | 32           | Afogados da Ingazeira-PE | 1                                       | A                            |

Fonte: A autora.

Legenda: (A) Forma indeterminada; (B1) Forma cardíaca sem disfunção ventricular; (C) Forma cardíaca com disfunção ventricular.

**APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título de projeto:** Investigação da ação do Benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas frente a antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, residente na \_\_\_\_\_,

n. \_\_\_\_\_, bairro \_\_\_\_\_, município \_\_\_\_\_,

Estado \_\_\_\_\_, usuário do telefone ( ) \_\_\_\_\_, fui convidado a

participar desse estudo, cujo objetivo é investigar a ação do medicamento utilizado para o tratamento da doença de Chagas (Benzonidazol) sobre as células do sangue que defendem o organismo. Fui informado que sete colheres de chá de meu sangue (35 ml) serão coletadas através de um tubo adaptado a uma agulha. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável e só utilizado em mim. Porém, poderá causar dor quando a agulha penetrar na minha pele ou deixar uma mancha vermelha/roxa (hematoma) após a coleta. Fui informado que esta coleta será realizada antes do início do meu tratamento com o Benzonidazol; 2, 6 e 12 meses após o término do tratamento; e anualmente por 10 anos (2 vezes por ano) e entendo que minha responsabilidade neste estudo é vir para as minhas consultas quando o médico marcar. Fui informada que meu sangue será usado para obtenção do soro (parte líquida do sangue) para avaliar proteínas de defesa (anticorpos). Também fui informado que o meu sangue será avaliado quanto à presença de células e citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças). Além disso, estou ciente que serão realizados exames para verificar a presença do *Trypanosoma cruzi* (parasita causador da doença de Chagas) antes e após o tratamento com o Benzonidazol. Fui informado ainda que o tratamento com este medicamento pode não ser capaz de me curar da doença de Chagas mas que este estudo será de grande auxílio para geração de conhecimento sobre o tratamento com o Benzonidazol, servindo futuramente como orientação para ajudar os médicos sobre o tratamento de outros pacientes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Também fui informado que os resultados dos meus exames clínicos, como raio-X, eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através de meu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores juntamente com meu médico (a). Além disso, também colaborarei respondendo algumas perguntas de um formulário de pesquisa. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa e autorizo que sejam armazenadas amostras biológicas para utilização posterior em outros estudos. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento de participar da pesquisa sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Além disso, fui informado que participando ou não dessa pesquisa meu atendimento no ambulatório, bem como meu tratamento continuará acontecendo normalmente.

Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador 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: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Portador da doença de Chagas

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo projeto

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**Responsáveis principais pelo projeto:**

Yara M. Gomes (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2559/ 2101-2674

Virginia M. B. Lorena (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9965-1663

Adriene S. Melo (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9734-4694

Ana Karine Soares (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 8692-1419

Suellen C. M. Braz (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9127-1868

Maria da Glória de Melo (HUOC/UPE) Telefone: 2101-1441/ 9976-5398

## APÊNDICE D – Artigo publicado

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(3):318-323, mai-jun, 2011

DOI: 10.1590/S0037-86822011005000038



## Article/Artigo

## Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series

Doença de Chagas no Estado de Pernambuco, Brasil: análise de séries históricas das internações e da mortalidade

Suellen Carvalho de Moura Braz<sup>1,2</sup>, Myllena de Fátima Alheiros Dias Melo<sup>1,2</sup>, Virginia Maria Barros de Lorena<sup>1,2</sup>, Wayner Vieira de Souza<sup>1</sup> and Yara de Miranda Gomes<sup>1,2</sup>

## ABSTRACT

**Introduction:** A time series study of admissions, deaths and acute cases was conducted in order to evaluate the context of Chagas disease in Pernambuco. **Methods:** Data reported to the Information Technology Department of the Brazilian National Health Service between 1980 and 2008 was collected for regions and Federal Units of Brazil; and microregions and municipalities of Pernambuco. Rates (per 100,000 inhabitants) of hospitalization, mortality and acute cases were calculated using a national hospital database (SIH), a national mortality database (SIM) and the national Information System for Notifiable Diseases (SINAN), respectively. **Results:** The national average for Chagas disease admissions was 0.99 from 1995 to 2008. Pernambuco obtained a mean of 0.39 in the same period, with the highest rates being concentrated in the interior of the state. The state obtained a mean mortality rate of 1.56 between 1980 and 2007, which was lower than the national average (3.66). The mortality rate has tended to decline nationally, while it has remained relatively unchanged in Pernambuco. Interpolating national rates of admissions and deaths, mortality rates were higher than hospitalization rates between 1995 and 2007. The same occurred in Pernambuco, except for 2003. Between 2001 and 2006, rates for acute cases were 0.56 and 0.21 for Brazil and Pernambuco, respectively. **Conclusions:** Although a decrease in Chagas mortality has occurred in Brazil, the disease remains a serious public health problem, especially in the Northeast region. It is thus essential that medical care, prevention and control regarding Chagas disease be maintained and improved.

**Keywords:** Chagas disease. Pernambuco. Hospitalization. Mortality. Acute cases.

## RESUMO

**Introdução:** Foi realizado estudo de séries históricas de internações, óbitos e casos agudos por doenças de Chagas objetivando avaliar o contexto desta enfermidade em Pernambuco. **Métodos:** Foram coletados dados notificados de 1980 a 2008 ao Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS/MS) para regiões e unidades federativas do Brasil, microrregiões e municípios pernambucanos. As taxas (por 100.000 habitantes) de internações, mortalidade e casos agudos foram obtidas por consulta ao Sistema de Informações Hospitalares (SIH), Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), respectivamente. **Resultados:** A média de internações nacional por doença de Chagas ficou em 0,99 no período de 1995 a 2008. Pernambuco, neste intervalo, apresentou média de 0,39, com as maiores taxas concentradas no interior do estado. Este estado obteve média de óbitos 1,56 entre 1980 e 2007, valor inferior a brasileira (3,66). O país demonstrou declínio de óbitos na análise de tendência, com Pernambuco encontrando-se em estado estacionário para esta taxa. Interpolando os dados referentes a internações e óbitos, evidenciou-se mortalidade em valores superiores as taxas de internações nacionais, entre 1995 e 2007. O mesmo fato ocorreu em Pernambuco, exceto em 2003. Entre 2001 e 2006, a taxa de casos agudos foi de 0,56 e 0,21 respectivamente para Brasil e para Pernambuco. **Conclusões:** Mesmo o Brasil demonstrando redução na mortalidade, a doença permanece como grave problema de saúde pública, principalmente no nordeste. Desta forma, é fundamental a manutenção e melhoria das ações de atenção médica, controle e prevenção já existentes.

**Palavras-chaves:** Doença de Chagas. Pernambuco. Internações hospitalares. Mortalidade. Casos agudos.

1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. 2. Programa Integrado de Doença de Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

**Address to:** Dra. Yara de Miranda Gomes. CPqAM/FIOCRUZ. Caixa Postal 7472. Av. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Phone: 55 81 2101-2500 ramal 2593; Fax: 55 81 3453-1911

e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Received in 25/11/2010

Accepted in 07/02/2011

## INTRODUCTION

Despite significant advances in vector control, Chagas disease still represents a worldwide public health problem. The disease, whose causative agent is *Trypanosoma cruzi*, occurs from the Southern United States to Southern Argentina and Chile and infects 15 to 16 million individuals in Latin America, with approximately 75 to 90 million exposed to infection<sup>1</sup>. In 2005, it was estimated that nearly 2 million individuals were infected in Brazil, which was the expected number for the whole of Central America<sup>2</sup>.

The epidemiological context in the Northeastern states of Brazil presents a number of specific features. National surveys of prevalence and distribution of vectors, conducted between 1975 and 1980, have shown that the region has the second highest number of infected individuals and the highest triatomine infestation rates<sup>3-5</sup>. In 1996, the Chagas Disease Control Program of the National Health Foundation (*Fundação Nacional de Saúde*) of the Ministry of Health (*Ministério da Saúde*, FNS/MS) collected 290,576 triatomines in Brazil, 69.2% (201,156 triatomines) of which were found in the northeast region. In the State of Pernambuco, 2.43% of the 8,431 insects collected as part of this survey were infected with *T. cruzi*<sup>6</sup>. In a serological survey of human Chagas disease, the Superintendents of Public Health Campaigns (*Superintendências de Campanhas de Saúde Pública*, SUCAM) determined a prevalence of 4.2% in Brazil from 1975 to 1981, with Pernambuco showing a prevalence of 2.8%<sup>4</sup>. Another serological survey conducted among schoolchildren between 1997 and 1998 determined a prevalence of 0.08% in the Northeast region and 0.05% in the State of Pernambuco<sup>6</sup>. Relevant data have been provided by a survey at the Pernambuco Blood Center (*Hemocentro de Pernambuco*, HEMOPE), where 0.17% of blood donation candidates tested positive for anti-*T. cruzi* IgG between 2002 to 2007<sup>7</sup>. Despite the decline in prevalence, these data indicate that the parasite remains in circulation in human hosts and suggests the need for continuous surveillance.



In an effort to combat the dissemination of Chagas disease in the 1990s, Southern Cone countries implemented the *Action to eliminate Triatoma infestans*<sup>8</sup>. This reinforced the actions to control transmission of the disease that had been in existence since 1975 in Brazil<sup>9</sup>. As a result, in 2006, the Pan American Health Organization/World Health Organization considered Brazil free of transmission of Chagas disease via its main vector (*T. infestans*) and transfusion of blood and blood products<sup>10</sup>. However, the presence of secondary vector species such as *Triatoma sordida*, *Triatoma brasiliensis* and *Panstrongylus megistus*<sup>11</sup>, together with other forms of transmission, such as the ingestion of contaminated food<sup>12-14</sup> and congenital transmission<sup>15</sup>, have given rise to concern that the disease may re-emerge.

This study aims to evaluate Chagas disease in Pernambuco and Brazil. For this, data regarding hospital admissions, deaths and acute cases of this disease reported to the Information Technology Department of The Brazilian National Health Service (*Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, DATASUS/MS*) between 1980 and 2008 were collected.

## METHODS

This is a descriptive study using data from the following national databases: the Hospital Information System (*Sistema de Informações Hospitalares, SIH*), the Mortality Information System (*Sistema de Informação sobre Mortalidade, SIM*) and the Information System for Notifiable Diseases (*Sistema de Informações de Agravos de Notificação, SINAN*) of the DATASUS/MS.

Information regarding hospital admissions for American trypanosomiasis includes the Hospital Admission Authorizations (*Autorizações de Internações Hospitalares, AIH*) for acute and chronic cases according to place of residence, from 1995 to 2008. The AIH reports all authorizations for SUS cash reimbursements for hospitalization. The available mortality data by acute and chronic Chagas disease, also according to place of residence, cover the period from 1980 to 2007. SIH and SIM data were grouped according to the ninth and tenth editions of International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-9 and ICD-10). Cases of acute Chagas disease according to place of residence, reported to SINAN, cover the period from 2001 to 2006. The evaluation period for hospital admissions, mortality and acute cases includes the available ranges in SIH, SINAN and SIM, respectively.

The analysis considered rates for hospital admissions, mortality and detection of acute cases of Chagas disease occurring in regions and federal units of Brazil, and in microregions and municipalities of Pernambuco, per 100,000 inhabitants. Rates were calculated using population data provided by DATASUS/MS. In order to provide time series of mortality rates for Brazil, the Northeast region and Pernambuco, linear regression models were constructed for tendency analysis, where  $y$  (mortality rate) =  $\alpha + \beta \times \text{year}$ . Additionally, the hospitalization and mortality rates for Chagas disease were compared.

The Hospital Information System (SIH) and the Mortality Information System (SIM) were consulted regarding 18 microregions of the State of Pernambuco: Alto Capibaribe, Araripina, Brejo Pernambucano, Garanhuns, Itamaracá, Itaparica, Mata Meridional, Mata Setentrional, Médio Capibaribe, Petrolina, Recife, Salgueiro, Sertão do Moxotó, Suape, Vale do Ipanema, Vale do Ipojuca, Vale do Pajeú and Vitória de Santo Antão.

The data were collected in December 2009, tabulated and analyzed using TabWin 32, statistical package for the Social Sciences (SPSS) 8.0 and Excel Office 2007.

Since this study uses secondary data from the public domain, it does not disclose the individual identity of the individuals involved, thus no ethical considerations arise.

## RESULTS

According to SIH data, 24,130 hospital admissions for trypanosomiasis were reported between 1995 and 2008 in Brazil. Of these, 3,555 occurred in the northeast and 443 in Pernambuco. The mean national rate for admissions in this period was 0.99 per 100,000 inhabitants. The increase in this rate, which reached 2.09 in 2003, should be highlighted; however, rates have declined strongly in recent years, with only 0.76 reported admissions/100,000 inhabitants in 2008. The Northeast had an average rate of 0.5 and, like other regions, showed a peak in 2003, with 1.3 admissions (**Figure 1**).

Of the Northeastern states, Pernambuco ranked eighth in terms of average hospitalizations, with 0.39/100,000 inhabitants from 1995 to 2008. Pernambuco, like the other states in this region and the country as a whole, showed a decline in reported admissions subsequent to 2003. It is worth noting that the State of Alagoas did not follow this tendency, showing a rate rising from 2.16 to 6.1 admissions in 2005, which declined sharply in subsequent years (**Table 1**).

In the Pernambuco microregions, the municipality of Sertão do Moxotó showed highest hospitalization rate, with 1.15/100,000 inhabitants in the period between 1995 and 2008. Among the others, Vale do Pajeú and Salgueiro, located in same microregion, deserve a mention, with rates of 1.03 and 0.61, respectively. Itapetim (3.88) and Brejinho (1.96), both in the Vale do Ipojuca microregion, together with Itacuruba (3.86) and Sertânia (2.03), located in the Itaparica and Moxotó microregions, respectively, had the highest rates among the towns of Pernambuco (data not shown).

According to SIM, 156,224 deaths presenting Chagas disease as the basic cause occurred between 1980 and 2007 in Brazil, as measured by individual's place of residence. The Northeast region reported 20,472 of these deaths, with 3,144 occurring in Pernambuco. The average mortality rate for the Northeast over the same period was 1.66 deaths from Chagas disease/100,000 inhabitants, lower than in Brazil as a whole, the Central-Western and southern regions, with rates of 3.66, 12.59 and 4.9, respectively. Over the same period, Pernambuco registered 1.53 deaths/100,000 inhabitants between 1980 and 2007. Even though the Northeastern region ranks third in terms of mortality, the figure has remained constant over the years, while in Brazil as a whole and the central-western and Southern regions, it has seen a substantial decline (**Figure 2A**). The Central-Western region experienced an particularly marked decrease in mortality over the period studied. This region registered 18 deaths/100,000 inhabitants in the early 1980s, falling to 7.2 in 2007 (data not shown).

Tendency analysis for Brazil as a whole, the Northeastern region and Pernambuco shows a decline in mortality to 0.104/100,000 inhabitants per year for the period between 1980 and 2007, which means a mean reduction of 160 deaths per year. However, the northeast did not show the same decline in mortality rate over this period, rather an average growth of 0.013/100,000 inhabitants per year. Pernambuco showed a mortality rate tendency to remain constant, as illustrated in **Figure 2B**.

Rev Soc Bras Med Trop 44(3):318-323, mai-jun, 2011

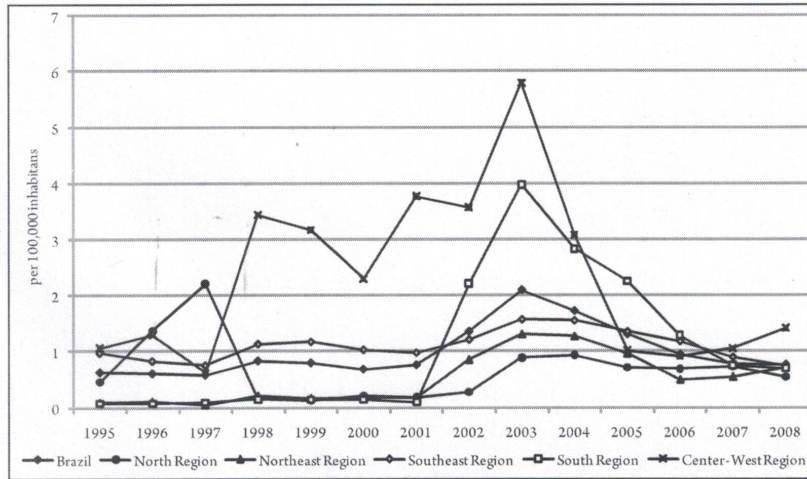


FIGURE 1 - Hospitalization rate for Chagas disease per 100,000 inhabitants - Macroregions of residence (Brazil) - 1995 to 2008.

TABLE 1 - Hospitalization rates for Chagas disease per 100,000 inhabitants from 1995 to 2008 in Northeast second the federal unit of residence.

|    | Year of hospitalization |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Average |
|----|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|
|    | 1995                    | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |         |
| NE | 0.09                    | 0.11 | 0.05 | 0.21 | 0.17 | 0.17 | 0.18 | 0.85 | 1.30 | 1.27 | 0.96 | 0.49 | 0.55 | 0.70 | 0.52    |
| MA | 0.08                    | 0.02 | 0.02 | 0.07 | 0.07 | 0.04 | 0.02 | 1.28 | 2.67 | 2.42 | 1.69 | 0.63 | 0.13 | 0.24 | 0.69    |
| PI | 0.07                    | 0.07 | 0.00 | 0.11 | 0.04 | 0.14 | 0.17 | 1.55 | 2.02 | 1.63 | 0.20 | 0.10 | 0.29 | 0.13 | 0.47    |
| CE | 0.00                    | 0.04 | 0.06 | 0.11 | 0.14 | 0.08 | 0.11 | 1.03 | 1.19 | 0.84 | 0.36 | 0.62 | 0.56 | 0.82 | 0.44    |
| RN | 0.04                    | 0.08 | 0.08 | 0.11 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 1.23 | 1.70 | 1.27 | 3.10 | 2.10 | 3.60 | 2.61 | 1.21    |
| PB | 0.12                    | 0.03 | 0.00 | 0.24 | 0.15 | 0.29 | 0.26 | 0.49 | 0.43 | 0.34 | 0.11 | 0.11 | 0.30 | 0.27 | 0.23    |
| PE | 0.03                    | 0.11 | 0.05 | 0.16 | 0.12 | 0.23 | 0.17 | 0.45 | 1.87 | 1.00 | 0.20 | 0.18 | 0.27 | 0.57 | 0.39    |
| AL | 0.19                    | 0.34 | 0.04 | 0.22 | 0.26 | 0.14 | 0.25 | 2.11 | 2.16 | 5.63 | 6.10 | 0.46 | 0.29 | 1.25 | 1.43    |
| SE | 0.00                    | 0.06 | 0.06 | 0.00 | 0.12 | 0.00 | 0.11 | 0.76 | 0.85 | 1.00 | 0.51 | 1.15 | 0.74 | 2.00 | 0.56    |
| BA | 0.19                    | 0.18 | 0.08 | 0.40 | 0.29 | 0.28 | 0.31 | 0.42 | 0.30 | 0.43 | 0.32 | 0.30 | 0.38 | 0.46 | 0.31    |

NE: Northeast, MA: Maranhão, PI: Piauí, CE: Ceará, RN: Rio Grande do Norte, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, AL: Alagoas, SE: Sergipe, BA: Bahia  
Data source: DATASUS; SINAN.

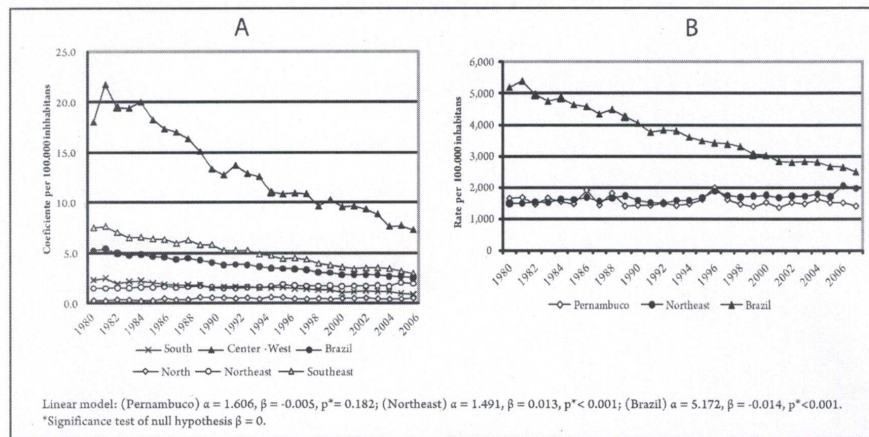


FIGURE 2 - Mortality rates for Chagas disease per 100,000 inhabitants - 1980 to 2007. A: Mortality for Chagas disease (macroregions of residence). B: Mortality rates for Chagas disease per 100,000 inhabitants and parameters of tendency models to Pernambuco, Northeast and Brazil.

As for admission rates, mortality is concentrated in the rural areas of the State of Pernambuco. The microregions with highest mean rates between 1980 and 2007 were Pajeú and Moxotó, with 5.9 and 3.85 deaths/100,000 inhabitants respectively. Sertânia (11.14), a city in the Sertão do Moxotó; Tuparenatama (11.14), Tabira (8.74), Triunfo (8.59) and Afogados da Ingazeira (8.23), all located in the Vale do Pajeú district, are the five towns in the State of Pernambuco with the highest mortality rates (data not shown).

Comparison of the rates for Chagas disease admissions with mortality rates in the period from 1995 to 2007 shows that the number of reported deaths was higher than number of hospitalizations in the country as a whole and in Pernambuco, every year, except for 2003 (Figure 3).

A total of 2,250 cases of acute Chagas disease were confirmed by SINAN between 2001 and 2006 in Brazil. Pernambuco registered 274 such reports, ranking second in terms of absolute numbers. However, when the mean rate of occurrence was calculated, Pernambuco ranked fifth among the 24 Brazilian States for reports of acute cases, with 0.56/100,000 (Table 2). The present study shows that the states with the highest acute cases rates in this period are located in the northern and northeastern regions of Brazil. Comparing rates in Pernambuco with those for the country as a whole, the state has an above-average rate over this period.

TABLE 2 - Acute case rates for Chagas disease per 100,000 inhabitants - 2001 to 2006.

| Federal unit        | Total | Population (12/31/2003) | Average rate |
|---------------------|-------|-------------------------|--------------|
| Brazil              | 2,249 | 177,988,694             | 0.21         |
| Rondônia            | 39    | 1,467,878               | 0.44         |
| Amazonas            | 20    | 3,065,413               | 0.11         |
| Pará                | 183   | 6,635,189               | 0.46         |
| Amapá               | 64    | 543,884                 | 1.96         |
| Maranhão            | 14    | 5,908,622               | 0.04         |
| Piauí               | 148   | 2,936,386               | 0.84         |
| Ceará               | 53    | 7,810,080               | 0.11         |
| Rio Grande do Norte | 226   | 2,905,634               | 1.30         |
| Paraíba             | 106   | 3,530,367               | 0.50         |
| Pernambuco          | 274   | 8,200,248               | 0.56         |
| Alagoas             | 59    | 2,932,659               | 0.34         |
| Sergipe             | 102   | 1,888,777               | 0.90         |
| Bahia               | 441   | 13,496,480              | 0.54         |
| Minas Gerais        | 84    | 18,657,577              | 0.08         |
| Espirito Santo      | 31    | 3,274,284               | 0.16         |
| Rio de Janeiro      | 42    | 14,956,032              | 0.05         |
| São Paulo           | 36    | 38,973,449              | 0.02         |
| Paraná              | 20    | 9,960,970               | 0.03         |
| Santa Catarina      | 73    | 5,646,692               | 0.22         |
| Rio Grande do Sul   | 159   | 10,562,009              | 0.25         |
| Mato Grosso do Sul  | 27    | 2,184,124               | 0.21         |
| Mato Grosso         | 12    | 2,674,414               | 0.07         |
| Goiás               | 35    | 5,354,165               | 0.11         |
| Distrito Federal    | 1     | 2,211,594               | 0.01         |

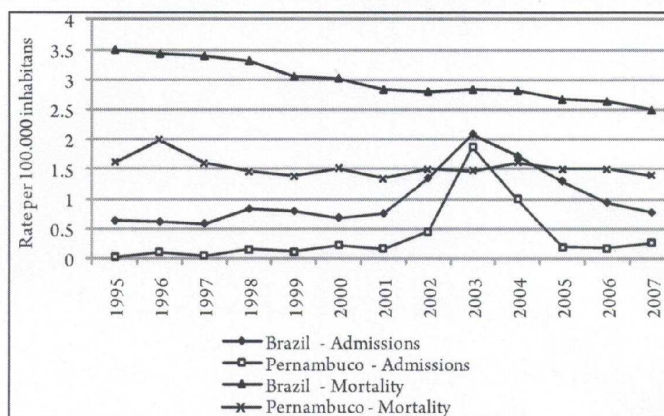


FIGURE 3 - Rates of hospitalizations and mortality for Chagas disease per 100,000 inhabitants in Pernambuco and Brazil - 1995 to 2007.

## DISCUSSION

The peak admissions rate in 2003 in Brazil can be explained by the emphasis placed on Chagas disease in the 21<sup>st</sup> century, a period during which the country received certification for having eliminated the transmission of the disease by *T. infestans*<sup>10</sup>. This may have triggered a greater commitment on the part of health professionals for accurate reporting of the cause of admissions to DATASUS/MS. However, one-off assessments in States and municipalities need to be conducted

to clarify what other factors could be responsible for this increase in the reporting of admissions for Chagas disease.

Owing to the difficulty in diagnosing Chagas disease in its acute phase, the majority of reported hospitalizations probably represent individuals who acquired Chagas disease many years previously. Thus, the concentration of admissions in rural parts of Pernambuco indicates the importance of this region for the transmission of this disease in the state as a whole. However, AIH presents a number of disadvantages, since the main purpose of the database is to ensure

payment for admissions to SUS hospitals. One of these is the possible failure to complete the form, leading to under-reporting and incorrect registration of the cause of hospitalization or absence of information relating to repeated hospitalizations.

In view of the period that has elapsed since the introduction of policies to control transmission, along with slow disease progress, a decline in the number of deaths would be expected. This profile can be confirmed nationally, but Pernambuco and the Northeastern region have not shown reductions in reports of deaths from the disease. This suggests a hypothesis that the control and prevention of Chagas disease in this region has been negligent, resulting in the emergence of new cases and a tendency for the mortality rate to remain constant in the long-term.

Given the fact that Chagas disease has a slow chronic progression, reported deaths are mostly related to an infection acquired many years previously. This suggests that number of new cases in the northeast may have remained constant or even increased. Dias et al highlighted the high number of vector species present in the Northeast, corresponding to 50% of those registered in Brazil<sup>6</sup>. Possible failures or difficulties in controlling secondary vector species, together with oral and congenital routes of infection, could be contributing to the maintenance of *T. cruzi* transmission in this region.

It should be noted that deaths reported in Pernambuco according to patient place of residence will probably not reveal the true values for local populations, since compiling deaths according to place of residence means that data will not include individuals who acquired Chagas disease in their home state and who died in another Federal Unit. Neither will it exclude deaths from Chagas disease of patients who came to reside in that state during the period studied. While investigating mortality rates for the disease from 1981 to 1998 in Brazil, Drumond & Marcopolo<sup>16</sup> verified that 32% of those who died were born in states other than their state of residence, which reflects the extensive internal migration that occurred during the period. Data analysis by place of infection may allow this bias to be corrected; however, many carriers only discover that they have the disease long after they initially acquired the parasite and vast majority does not have precise information concerning the circumstances of their contact with *T. cruzi*.

It is important remember that interpretation of mortality data provided by DATASUS must consider important interferences: a) underreporting; b) errors in the completion of death certificates; c) failures in the coverage system and transmission information, which varies according to the region and state; d) and percentage of deaths due to undefined causes, which also varies according to the Federal Unit<sup>17,18</sup>, leading to the diminished reliability of these data. However, the mortality database, SIM, has undergone improvements since its implementation in 1975, including reducing the amount of ignored or incomplete information<sup>19</sup>, making the results obtained in this study worthy of note.

Regarding the data obtained after comparing rates for admissions with mortality, it is improbable that such a large number of patients died without receiving hospital care. These data suggest the presence of errors in AIH completion, leading to under-reporting of SIH data on admissions to hospital for Chagas disease. These reported hospitalizations still show a bias of not informing cases of repeated patient admissions in the period studied.

It is significant that, during 9<sup>th</sup> Meeting of the Intergovernmental Commission for the Southern Cone Initiative, analysis of FUNASA

proposals regarding vector transmission of Chagas disease, Pernambuco numbered among the states that should receive certification by end of 2000<sup>20,21</sup>, while Brazil as a whole only received certification in 2006<sup>10</sup>.

All the databases SIM and SIH, SINAN have failures. These included duplicate registers and lack of table standardization, which were attenuated by the replacement of SINAN-DOS by the SINAN-Windows program<sup>22</sup>, which was implanted in 2007 in the SINAN NET. However, failures in the preparation and the lack of knowledge of the users of this and other DATASUS information systems endures, forming the greatest obstacle to optimizing the use of these tools.

Importantly, acute Chagas disease became a notifiable disease for Municipal and State Health Departments and the Ministry of Health in 2003 (Portaria 2.325/GM, 2003, December, 8)<sup>23</sup>. Thus, the number of cases reported to SINAN in the years prior this ordinance probably does not express wholly accurate values.

Examination of the data collected for this study has shown that data for Pernambuco does not reflect that for Brazil as a whole, regarding the control of Chagas disease. The state shows a much higher acute cases rate than the national rate for the period. Even more alarming is the fact that the decline in national mortality rate for Chagas disease has failed to emerge in the State of Pernambuco and the northeastern region. Data presented and discussed in this paper therefore demonstrate significant shortcomings in the public system for the control, prevention and treatment of Chagas disease. Thus, even with successful transmission control campaigns, monitoring for this disease is still required in the northeastern region, particular in Pernambuco.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### FINANCIAL SUPPORT

This research received support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and from the Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes and W.V. Souza are fellows of CNPq, n° 306427/2006-0 and n° 307484/2007-6, respectively. V.M.B. Lorena is a postdoctoral fellow of CNPq. S.C.M. Braz is a candidate for Master's degree in Public Health (CPqAM-Fiocruz) and is a CNPq fellow (n 133106/2009-8). M.F.A.D. Melo was Capes fellow for duration of this research.

#### REFERENCES

1. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:31-40.
2. Schmunis GA. Enfermedad de Chagas em um mundo global. In: AC Silveira, editor. La enfermedad de Chagas a La puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano; 2007. p. 251-266.
3. Castro Filho J, Silveira AC. Distribuição da doença de Chagas no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1984; 31:85-97.
4. Fiusa-Lima JT, Silveira AC. Controle da transmissão e inquérito sorológico nacional. In: JR Cançado, M Chuster, editors. *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas; 1984. p. 371-380.
5. Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos domiciliados no período 1975/1983 no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1984; 36:15-312.

6. Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica* 2000; 16:13-34.
7. Melo AS, Lorena VMB, Moraes AB, Pinto MBA, Leão SC, Soares AKA, et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009; 31: 69-73.
8. Dias JCP. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today* 1987; 3:336-341.
9. Schofield CJ, Dias JCP. Souther cone initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 1999; 42:1-27.
10. Dias JCP. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica* 2006; 22:2020-2021.
11. Oliveira Filho AM. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides- implications for Chagas disease vector control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:425- 428.
12. Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 2002; 18:171-176.
13. World Health Organization. Guia para Vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas Aguda transmitida por alimentos. Geneva: Organização Pan Americana de Saúde; 2009.
14. Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, César MJB, Santos MP, Miranda COS, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2009; 103:291-297.
15. Gontijo ED, Andrade GMQ, Santos SE, Galvão LMC, Moreira EF, Pinto FS, et al. Triagem Neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol Serv Saude* 2009; 18:243-254.
16. Drumond JAG, Marcopilo LF. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brasil, 1981/1998. *Cad Saude Publica* 2006; 22:2131-2140.
17. Mello Jorge MHP. Registro dos eventos vitais: sua importância em saúde pública. Série divulgação n°5. São Paulo: Centro da Organização Mundial de Saúde para Classificação de Doenças em Português; 1996.
18. Mameri CP. Tendências populacionais: óbitos por causas mal definidas. *Conjuntura demográfica* 1990; 10:7-10.
19. Mello Jorge MHP, Laurenti R, Gotlieb SLD. Análise da qualidade das estatísticas vitais brasileiras: a experiência de implantação do SIM e do SINASC. *Cienc Saude Colet* 2007; 12:643-654.
20. World Health Organization. Brazil to be declared free of Chagas disease. *TDR News* 2000a; 62:14.
21. World Health Organization. Chagas disease, Brazil - Interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec* 2000b; 75:153-155.
22. Laguardia J, Domingues CMA, Carvalho C, Lauerman CR, Macário E, Glatt R. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN): desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde. *Epidemiol Serv Saude* 2004; 13:135-146.
23. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.325/GM. Dispõe a relação de doenças de notificação compulsória para todo território brasileiro (Dec 8, 2003). Available from: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2003/GM/GM-2325.htm/>.

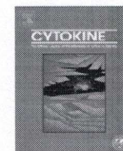
## APÊNDICE E – Artigo publicado

Cytokine 58 (2012) 207–212



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/issn/10434666](http://www.elsevier.com/locate/issn/10434666)

## IL-10 and IFN- $\gamma$ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*

Adriene Siqueira de Melo<sup>a</sup>, Virginia Maria Barros de Lorena<sup>a,c</sup>, Suellen Carvalho de Moura Braz<sup>a</sup>, Cássia Docena<sup>b</sup>, Yara de Miranda Gomes<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Plataformas Tecnológicas, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Fiocruz Program for Research and Technological Development on Chagas Disease (PIDC), Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 June 2011

Received in revised form 7 December 2011

Accepted 15 January 2012

Available online 9 February 2012

## Keywords:

Chagas disease

Cytokines

Gene expression

Biological markers

Recombinant antigens

## ABSTRACT

Along with several other aspects of Chagas disease, the mechanisms responsible for the different clinical outcomes observed in chronic infected individuals have not yet been clarified. It is believed that the host immune response to the parasite plays an important role in the development of the pathology. Therefore, the aim of this study was to evaluate the relationship between IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression profile, after in vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens CRA (cytoplasmic repetitive antigen) and FRA (flagellar repetitive antigen), and the clinical forms of chronic Chagas disease. Twenty patients with the cardiac form of the disease (CARD), of whom 10 had the mild cardiac form (CARD 1) and 10 the severe cardiac form (CARD 2), and 20 patients with the indeterminate form (IND), were selected at the Chagas Disease Unit of the Oswaldo Cruz University Hospital, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. The PBMCs of these individuals were cultured in the presence of CRA or FRA for 3 days and IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression was evaluated by detection of its messenger RNA using Real Time Quantitative PCR. Although no significant difference was observed between the groups of individuals studied, we found that most patients with IND displayed high levels of IFN- $\gamma$  gene expression, while the majority of patients with CARD 1 presented high levels of IL-10. The results of this study thus highlight the important role that inflammatory cytokines play in patients with the IND group controlling for parasite replication, and that anti-inflammatory cytokines play in determining susceptibility to progression to symptomatic clinical forms of the disease.

© 2012 Elsevier Ltd. Open access under the Elsevier OA license.

## 1. Introduction

Known as American trypanosomiasis, Chagas disease follows a systemic and chronic course, with the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* being the etiological agent. Considered a serious public health problem, it is distributed throughout Latin America and its prevalence is estimated to be 15–16 million cases, in addition to 75–90 million individuals at risk of infection [1]. The chagasic cardiopathy, a major cause of congestive heart failure in Latin America [2], and the anatomical and functional changes in the esophagus and colon, are the main clinical manifestations of the chronic form of the disease. Despite the serious tissue damage observed in the cardiac (CARD) and digestive (DIG) forms of the disease, about 50% of chronically infected individuals remain in a

long period of latency, characterized by the absence of clinical manifestations and known as indeterminate form (IND) [3,4]. The mechanism which causes infected individuals to present different clinical manifestations in chronic forms of the disease remains unclear. In addition, IND patients may remain asymptomatic throughout their lives, or may, after 10–20 years, begin to show symptoms related to the heart or digestive system [5]. As yet, there is no prognostic tool for predicting the clinical evolution of the disease.

Studies of the role immunity plays in Chagas disease have documented the existence of a specific immune response to *T. cruzi*. It has therefore been proposed that the absence of clinical symptoms in IND patients is related to their ability to control the immune response to the parasite, which does not occur in individuals with symptomatic forms. Despite the fact that these symptomatic patients respond effectively to the parasite, this results in exacerbated inflammation with consequent deleterious effects on tissues [6–8].

Previous reports have observed a high frequency of activated CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cell in the peripheral blood of patients with Chagas

\* Corresponding author at: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 2101 2674; fax: +55 81 2101 2584.

E-mail address: [yara@cpqam.fiocruz.br](mailto:yara@cpqam.fiocruz.br) (Y. de Miranda Gomes).

disease associated with expression of TNF- $\alpha$  and IL-10 in patients with CARD and IND, respectively, suggesting different functional roles for this cell in these individuals. [9,10]. Furthermore, activated CD8<sup>+</sup> T cells with expression of granzyme A and TNF- $\alpha$  were predominant in the inflammatory lesions associated with heart disease [11]. Moreover, the levels of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells and NKT cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) were found to be high in the peripheral blood of IND patients, suggesting that the absence of regulatory populations could lead to exacerbation of cytotoxic mechanisms, culminating in tissue damage [12].

It has also been shown a clear association between IFN- $\gamma$  production and the occurrence of severe heart disease, suggesting, in the chronic phase, a relationship between this cytokine and morbidity [13]. Besides this, it has been shown that T-cell clones derived from the inflammatory infiltrate of CARD patients are excellent producers of IFN- $\gamma$  [14].

However, different patterns of immune response have also been found. Although IL-10 correlates with the establishment of a modulatory profile in IND patients [15], this cytokine is also produced by PBMC from CARD patients [16]. In addition, it has been shown that there is an inverse correlation between levels of IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T cells and the severity of Chagas cardiomyopathy [17]. Another study in mice suggested that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells are ineffective in regulating the anti-*T. cruzi* immune response, since the depletion of these cells did not alter the course of acute or chronic infection by the parasite [18].

Therefore, the use of specific and purified *T. cruzi* antigens may prove to be better for identification of important molecules in parasite-host interaction studies, thereby contributing to an understanding of the immunopathology of Chagas disease [19]. In the present study, the immune response in chronic Chagas disease patients was evaluated after “in vitro” stimulation of PBMCs with two *T. cruzi* recombinant antigens (Ags-Recs), CRA (cytoplasmatic repetitive antigen) present in epimastigotes and amastigotes, and FRA (flagellar repetitive antigen) present in evolved forms of epimastigotes and trypomastigotes [20,21]. The role of these antigens in the immune response in chronic Chagas disease patients was studied by our research group and this has generated promising results [22–26].

This paper describes the gene expression profiles for IL-10 and IFN- $\gamma$  in chronic Chagas disease patients, after *in vitro* stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi*, which may improve our understanding of the development of symptomatic clinical forms of the disease.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Recombinant antigens of *T. cruzi*

The CRA and FRA antigens were obtained as described by Krieger [21]. The genes encoding CRA and FRA were cloned and their expression induced using isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG). After centrifugation, proteins were purified using nickel affinity chromatography according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). The antigens were analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulphate [27] and by silver coloration [28] to evaluate contamination by *Escherichia coli*.

### 2.2. Study population

Patients diagnosed with chronic Chagas disease were selected at the Chagas Disease Unit of Oswaldo Cruz University Hospital (HUOC), which is associated with the University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brazil. Selection was based on the following criteria: (1) characterization of the clinical form using the World Health Organization classification [29] and an echocardiogram;

(2) two positive serum tests for Chagas disease; and (3) the absence of previous etiological treatment. Patients underwent a standard screening process that included medical history, physical examination, electrocardiogram, laboratory and chest X-ray examinations and echocardiography. After screening, they were grouped as follows: the IND group ( $n = 20$ , 32–68 years old; 11 women and 9 men), consisting of patients with the chronic asymptomatic form of Chagas disease, i.e., individuals without alteration in the electrocardiography, chest X-ray, echocardiogram, esophagogram and barium enema (suspicious cases); and the CARD group, consisting of patients with chronic Chagas-related cardiopathy, with or without symptomatic cardiomyopathy and different degrees of alterations in the echocardiogram. The CARD group was subdivided into CARD group 1 ( $n = 10$ , 50–74 years old; 6 women and 4 men) including patients who exhibited no cardiac dilatation and an ejection fraction >55% in the echocardiogram, and CARD group 2 ( $n = 10$ , 43–73 years old; 4 women and 6 men) including patients with clinical and/or echocardiographic and radiological signs of heart enlargement and an ejection fraction <40% in the echocardiogram. A group of non-infected volunteers (NI) ( $n = 10$ , 32–65 years old; 8 women and 2 men) who had never received blood transfusion and presented negative serological tests for Chagas disease was included as a control. Individuals signed an informed consent form before entering the study, which was conducted according to the principles outlined in the 1975 Helsinki Declaration and subsequent amendments, and approved by the local ethics committee of CPqAM/Fiocruz (No. 032009).

### 2.3. Serological confirmation of *T. cruzi* infection and culture of PBMCs

Blood from patients was collected in tubes (BD Vacutainer™, Franklin Lakes, NJ, USA) without anticoagulant to obtain serum for confirmation of *T. cruzi* infection and in tubes (BD Vacutainer™) containing sodium heparin for cell culture tests. Serology was performed employing two different enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), one that uses a mixture of total extracts of *T. cruzi* (ELISA test Chagas III Ingenieria Genetica SA Bioschile), and another that uses only recombinant antigens (Immuno-ELISA Chagas Wama Diagnostica). Positive results were recorded when both tests were reactive, and a non-reactive response recorded when neither test was reactive [4].

PBMCs were obtained from the tubes containing sodium heparin using density centrifugation in a Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) as described previously [23]. Cell culture was performed in 14 mL polypropylene culture tubes (Beckinton Dickinson®, San Jose, CA, USA) to a final concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH®, St Louis, MO, USA) supplemented with L-glutamine, 1% antibiotic (stock of 10,000 U of penicillin, 10,000 U of streptomycin; SIGMA-ALDRICH®) and 10% of fetal bovine serum (SIGMA-ALDRICH®). Culture tubes were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 3 days, and stimulated with either phytohemagglutinin-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5  $\mu$ g/mL) (positive control), CRA or FRA (2  $\mu$ g/mL). Cultures without stimuli were used as a control.

### 2.4. Total RNA isolation, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was isolated from the PBMCs using the TRIzol Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Thereafter, total RNA was incubated with deoxyribonuclease I using a Deoxyribonuclease I Amplification Grade Kit (Invitrogen™) to a final RNA concentration of 100 ng/ $\mu$ l. Reverse transcription (RT) into cDNA was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) with random primers, according to the supplier's instructions. No products were observed in the control

(RT-) samples, in which the reverse transcriptase was omitted. Real-time RT-PCRs were carried out using 2 µl of cDNA as the starting material in a total volume of 25 µl with TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®). The thermal-cycling conditions included 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C. Thermal cycling proceeded with 40 cycles of 95 °C for 0.5 min and 60 °C for 2 min. All reactions were performed in the Model ABI PRISM 7500 Sequence Detector (PE Applied Biosystems®). The sequences of primers (400 nM) and probes (200 nM) used for amplification of the desired genes, have been described by Mocellin et al. [30] and follow: IL-10 sense 5'-GCCGTGGAGCAGGTGAAG-3', anti-sense 5'-GAAGATGTCAAACCTACTCATGGCT-3', probe 6FAM-TCTTGGCTGTACTGCCAG-GACCCA-TAMRA; IFN-γ sense 5'-AGCTCTGCATCGTTTTGGGTT-3, anti-sense 5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3', probe 6FAM-TCTTGGCTGTACTGCCAGG ACCCA-TAMRA; β-actin (housekeeping gene) sense 5'GGCACCCAGCACAAATGAAG-3', anti-sense 5'-GCCG-ATCCACACGGAGTACT-3', probe 6FAM-T CAAGATCATTGCTCCTCCT-GAGAGCCG-TAMRA. The standard curves of the target and reference genes showed similar results for efficiency (>90%). Thus, the relative quantification was calculated by the 2<sup>-DDCT</sup> method [31]. In this method, relative quantification was given by the ratio between the mean CT (cycle threshold) values of the target genes and the reference gene (β-actin) in each stimulated sample in relation to a reference sample (not stimulated). Further, efficiency correction was performed as described [32].

### 2.5. Data analysis

Statistical analysis was carried out using the D'Agostino-Pearson normality test followed by Student's *t*-test to confirm the normality of data sets. When the presumption of homogeneity was not confirmed, the Mann-Whitney test was used. To compare the average cytokine production among groups a one-way ANOVA test was carried out, followed by Tukey's test, and when homogeneity was not confirmed, the Kruskal-Wallis test was used, followed by the Mann-Whitney test, whenever the averages differed. To evaluate 'low' and 'high' cytokine expression, a chi-square test was performed as previously described [33]. A 5% significance level was assumed for all analyses. The software packages utilized were Excel 2000 and GraphPad Prism 5.0.

## 3. Results

### 3.1. IL-10 and IFN-γ gene expression after in vitro stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi*

The evaluation of differences in the fold changes of gene expression for the IL-10 and IFN-γ cytokines was performed by comparing the mean CT values obtained after in vitro stimulation of cells with Ags-Recs CRA and FRA of *T. cruzi* to values of cultures without stimulation. For IL-10 gene expression, the distribution was homogeneous for all groups of patients (IND, CARD 1 and CARD 2) and for NI individuals after stimulation with FRA and CRA. No statistical difference in expression was observed for any of the groups evaluated (Fig. 1A). Similarly, with respect to gene expression for IFN-γ, there was a homogeneous distribution around the mean value for each group after stimulation with both Ag-Recs, with no statistically significant difference in expression between groups of patients and NI individuals (Fig. 1B).

### 3.2. Low and high fold change for IL-10 and IFN-γ gene expression after in vitro stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi*

In order to improve detection of fold changes in gene expression for cytokines IL-10 and IFN-γ, a cut-off was established

corresponding to the median of expression values for all groups (IND, CARD 1, CARD 2 and NI). The individual values in each group were plotted above or below the cut-off value. Although there was no statistically significant difference in expression between groups of patients and NI individuals, it was observed that most CARD 1 patients presented "high" expression levels of IL-10 after antigen stimulation with both Ags-Recs, with a frequency of 70% after stimulation with CRA and 80% after stimulation with FRA. With regard to gene expression for IFN-γ, a "high" expression of this cytokine was observed, mostly in IND patients, but there was no statistically significant difference. The frequencies obtained for this group were 70% after stimulation with CRA and 65% after stimulation with FRA (Table 1).

## 4. Discussion

### 4.1. IL-10 and IFN-γ gene expression after in vitro stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi*

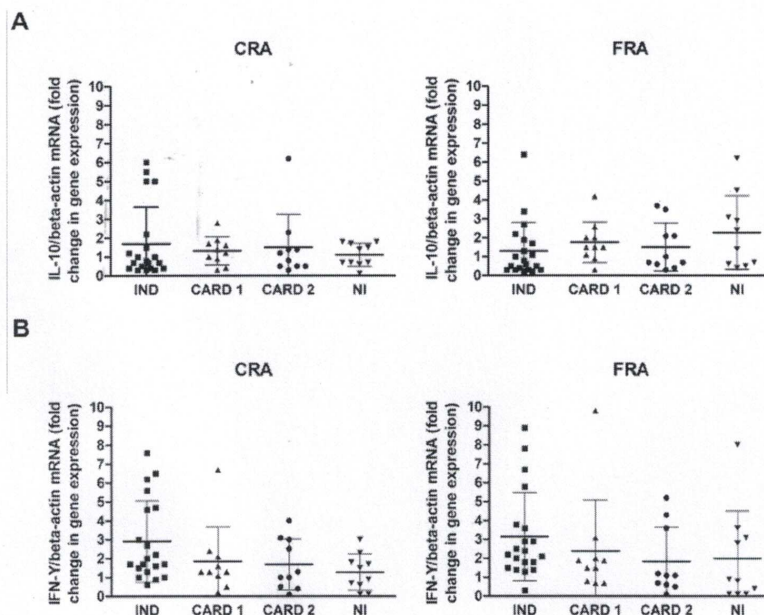
The different clinical outcomes observed in the course of chronic Chagas disease and variations within a single clinical form suggest that the host's immune system, particularly the action of T cell subsets and their cytokine production, plays a central role in the development of pathology [6,8]. These immunological characteristics could lead to the development of prognostic markers for severe clinical forms. The use of such biological markers in identifying different outcomes could help physicians to redirect treatment [25]. In the current study, we evaluated the IL-10 and IFN-γ gene expression in patients with chronic Chagas disease after in vitro stimulation of PMBCs with CRA and FRA *T. cruzi* Ags-Recs. Our results thus revealed a homogeneous distribution in the expression of these cytokines across all three groups of patients (IND, CARD 1 and CARD 2) and NI individuals, with no statistical difference in gene expression and consequently no identification of a possible prognostic marker.

Although an assortment of studies suggest an association between the IND form and a high level of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, and the CARD form shows high levels of pro-inflammatory cytokines, such as IFN-γ and TNF-α [13,15,16,34], this study was unable to demonstrate a correlation between a particular cytokine expression profile and the clinical manifestations found in chronic Chagas disease. This corroborates the findings of other studies [15,22,35–37]. Perhaps, differences in study population and methodology did not allow the differential detection of these cytokines expression in the current study.

### 4.2. Low and high fold change in gene expression for IL-10 and IFN-γ after in vitro stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi*

The categorization of patients, in relation to the production of cytokines has been used to assess those individuals in each group who present high levels of cytokines [15,25,33]. Gomes et al. [15], studying the production of IFN-γ, used more sensitive clinical trials and divided the group of patients with cardiac abnormalities according to severity of disease. It was thus possible to establish a correlation between high and low levels of IFN-γ and the patient's clinical status. Other studies have established a cut-off point using the median or overall mean for all study subjects, thereby enabling them to distinguish "high" and "low" producers of cytokines [25,33]. In the present study, we evaluated IL-10 and IFN-γ gene expression patterns in relation to the establishment of a cut-off and according to severity of disease in order to identify the high expression values and correlate it with the patient's clinical status. Despite the lack of statistically significant differences,





**Fig. 1.** Detection of fold change in gene expression for the IL-10 (A) and IFN- $\gamma$  (B) cytokines by PBMCs of Chagas disease patients and individuals not infected after stimulation with *T. cruzi* cytoplasmic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA). Patients with the cardiac clinical form without dilatation (CARD 1) ( $n = 10$ ), cardiac clinical form with dilatation (CARD 2) ( $n = 10$ ), indeterminate clinical form (IND) ( $n = 20$ ), and non-infected individuals (NI) ( $n = 10$ ). The horizontal bars represent the arithmetic mean and the standard deviation. The ANOVA test was carried out, followed by Tukey's test or the Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney test. Differences were taken to be statistically different when  $p < 0.05$ .

**Table 1**

Frequency of high cytokine producing subjects based on the overall median cytokine cut-off detected after stimulation with CRA and FRA recombinant antigens.

| Cytokine/stimulus | Global median cut-off | High cytokine-producers (%) |                     |                     |                 |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
|                   |                       | IND ( $n = 20$ )            | CARD 1 ( $n = 10$ ) | CARD 2 ( $n = 10$ ) | NI ( $n = 10$ ) |
| IL10-CRA          | 1.0 (0.1–6.2)         | 45                          | 70                  | 50                  | 50              |
| IL10-FRA          | 1.1 (0.3–6.4)         | 40                          | 80                  | 40                  | 60              |
| IFN $\gamma$ -CRA | 1.6 (0.1–7.6)         | 70                          | 40                  | 40                  | 40              |
| IFN $\gamma$ -FRA | 1.85 (0.1–9.8)        | 65                          | 50                  | 30                  | 40              |

CRA, cytoplasmic repetitive antigen. FRA, flagellar repetitive antigen. Data are expressed as the percentage of individuals exhibiting a fold change in gene expression greater or equal to the overall median (cut-off) calculated for each cytokine/stimulus. Patients with the cardiac clinical form without dilatation (CARD 1), the cardiac clinical form with dilatation (CARD 2), indeterminate (IND) clinical form, and non-infected individuals (NI). The chi-square test was used and differences were taken to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

higher expression of IFN- $\gamma$ , of 70% and 65% after stimulation with CRA and FRA, respectively, was observed for the majority of IND patients. With regard to IL-10, it was observed that CARD 1 patients were the most prolific, with frequencies of 70% and 80% after stimulation with CRA and FRA, respectively.

The most widely accepted concept regarding the development of chronic *T. cruzi* infection is that the specific immune response to the persistence of parasites in the affected target organs results in exacerbated inflammation with a consequent deleterious effect on tissue [7]. In inflammation, the presence of high levels of IFN- $\gamma$  appears to be explained by a lack of immunomodulatory capacity exerted by cytokines such as IL-10.

However, an effective anti-parasite response would be critical for controlling infection and thus preventing progression to severe clinical forms of the disease [38]. In this regard, some studies that assessed the CD8 $^+$  and CD4 $^+$  T cell population producing IFN- $\gamma$  in individuals with chronic Chagas disease, stratified by degree of

cardiac involvement, have observed an inverse correlation between the frequency of these cells and the severity of the disease [17,39].

In addition, there was a gradual decline in expression of surface markers CD27 $^+$  and CD28 $^+$  with low expression of CD57 $^+$  T cells from these CD8 $^+$  and CD4 $^+$  T cells producing IFN- $\gamma$ , with respect to the severity of clinical disease. This suggests that the effector population of T cells in chronic *T. cruzi* infection is characterized by a high proportion of newly recruited T cells. Thus, over time the population of parasite-specific memory T cells producing IFN- $\gamma$  begins to show signs of senescence and loss of differentiated cells, leading to progression to more severe cardiac involvement [40].

These studies therefore support the idea that chronic persistence of the parasite in tissues would lead to a continuous antigenic stimulation, resulting in the exhaustion of the T cell population. Individuals begin to exhibit low frequencies of CD8 $^+$

and CD4<sup>+</sup> parasite-specific T cells producing IFN- $\gamma$ , which would predispose them to progression of the disease, i.e., the permanence of the parasite in tissues could lead to a failure of the host's immune response to control parasite replication; thereby bringing on severe symptoms of the disease. Moreover, the intensity of parasite infestation, which is influenced by genetic factors in the parasite and in host's immune response may determine the level of exhaustion of the immune system and even the extent to which the disease progresses [17,39,40].

Conversely, even considering the regulatory role of IL-10, as IND patients had a higher frequency of IL-10<sup>+</sup> cells in the subpopulation of regulatory T cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> [12], a recent study in mice suggests that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells do not have an effective role in regulation of the anti-*T. cruzi* immune response, since depletion of these did not alter the course of acute or chronic infection by the parasite [18]. Moreover, the presence of cytokines with immunoregulatory properties, such as IL-10 and TGF- $\beta$ , in the course of *T. cruzi* infection was found to be related to increased susceptibility to infection, possibly inhibiting IFN- $\gamma$  trypanocidal activity [41,42].

Vitelli-Avelar et al. [33], when assessed the cytokine patterns of circulating leukocytes from chagasic patients without stimulus, demonstrated that most IND individuals presented a dominant regulatory cytokine profile, whereas CARD individuals displayed a dominant inflammatory cytokine pattern. Although, after stimulation in vitro with *T. cruzi* trypomastigotes, the cytokine profile was the opposite, i.e., CARD patients began to show higher cytokine production of regulatory status, whereas IND patients began to exhibit a cytokine predominantly inflammatory profile. A similar inversion could be found by them after in vivo treatment of IND and CARD individuals with benznidazole. Thus, the antigenic stimulation may mimicry what is occurring in tissues microenvironment, where are taking place the antigen exposure.

Previous results obtained by our group regarding the immune response of cells from Chagas patients using CRA and FRA *T. cruzi* antigens found substantial production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by Chagas patients in comparison with NI, after stimulation with the CRA, but not among the clinical forms [23]. Lorena et al. in 2010 [25], carried out an evaluation of cytokine production using flow cytometry and observed that CARD 2 patients presented high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  produced by CD8<sup>+</sup> T cells compared to CARD 1 patients after stimulation with CRA, indicating an association between severity of heart damage and high levels of inflammatory cytokines.

In the study above mentioned, were highlighted the importance of analysis of cytokine production by specific cell populations for improving understanding of the role of a specific cell subtype in the development and maintenance of the immune response to the parasite. Nevertheless, the development of the disease may not be related solely to the effector function of isolated cell groups, but also to the set of all responses that occur. Thereby, overall analysis of cytokine production is also an important approach to understanding the immune response in these patients.

Therefore, as in the current study, approaches that analysis cytokines and others immunological factors by gene expression could provide a broad view of what is occurring. There are a few studies conducted using qPCR and microarray approaches in mouse models of *T. cruzi* infection as well as in hearts of chronically chagasic patients. In these studies were found correlations between some cytokine expression and disease outcomes [43,44], no correlation [45] and as in our study some inversely correlations [46,47]. Thus, the differences between our results and those of previous investigators could be attributed to the different samples used, to the use of mammalian cell lines, human cells or whole-animal models, different parasite strains used or stimulus, or other differences in experimental design.

Therefore, since the present study found a higher frequency of gene expression for IFN- $\gamma$  in IND patients, along with a higher frequency of gene expression for IL-10 in CARD 1 patients, although these differences were not statistically significant, we must draw attention to the important role cytokines such as IFN- $\gamma$  play in IND patients in producing an effective immune response to the parasite and preventing its multiplication, thereby avoiding tissue damage and allowing these patients to remain without clinical symptoms. On the other hand, CARD 1 patients may be experiencing a deficiency in this effective immune response, both because of the exhaustion of the immune system and the production of immunosuppressive cytokines such as IL-10, since this is one of the release mechanisms used by the parasites, effecting a low specific immune responses and facilitating their permanence and multiplication, which may lead to heart tissue damage in these patients.

Finally, understand the delicate balance of multiple factors involved in the pathogenesis of Chagas disease is a complex task, the mechanisms involved in the interaction of immune cells and the differential genetic susceptibility of the host, may give rise to a highly complex disease, making it difficult to detect a specific immune response.

## 5. Conclusion

In conclusion, evaluation of IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression in chronic Chagas disease was unable to find any differences between the IND, CARD 1 and CARD 2 groups of individuals. It was therefore not possible to identify a prognostic marker that could aid treatment and improve management of these patients. Moreover, although this was not statistically different, we observed a higher frequency of IFN- $\gamma$  gene expression in IND patients and a higher frequency of IL-10 gene expression in CARD 1 patients, after in vitro stimulation with recombinant *T. cruzi* antigens. We therefore believe that the role of cytokines in determining Chagas disease outcomes requires further investigation that takes into account other variable factors, such as the genetic history of the parasite and the host.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

## Acknowledgments

We are thankful to the doctors Glória Melo, Cristina Tavares and Marisa Melo from HUOC/UPE for selecting the patients included in this study and to Mineo Nakazawa at CPqAM/Fiocruz for technical assistance. 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. For the duration of the study, VMB Lorena received a CNPq Ph.D. scholarship, AS Melo and SCM Braz received a CAPES (06407432421) and CNPq (No. 133106/2009-8) M.Sc. scholarship, respectively. The authors thank the Program for Technical Development of Health Inputs-PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities.

## References

- [1] Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:31–40.
- [2] Petherick A. Chagas disease. Nature Outlook 2010;465(7301):S10–1.
- [3] Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. Rev Soc Bras Med Trop 1998;31:301–14.

- [4] Brasil. Ministério da Saúde, Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 38 (2005) 29.
- [5] Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol 2009;31:673–85.
- [6] Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Curr Opin Infect Dis 2008;21:287–92.
- [7] Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:246–51.
- [8] Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, Costa GC, Silveira ABM, Reis DA, et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:208–18.
- [9] Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brenner Z, Gazzinelli G, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. Scand J Immunol 1996;43:88–93.
- [10] Menezes CAS, Rocha MOC, Souza PEA, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin Exp Immunol 2004;137:129–38.
- [11] Reis DD, Jones Elizabeth M, Tostes S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$ ' cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes. Am J Trop Med Hyg 1993;48:637–44.
- [12] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, Pascoal VPM, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, 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. Scand J Immunol 2005;62:297–308.
- [13] Correa-Oliveira R, Gomes JAS, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:253–5.
- [14] Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity 2006;39:41–54.
- [15] Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun 2003;71:1185–93.
- [16] Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CAS, Chaves ACL, Gollob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infect Immun 2004;72:5283–91.
- [17] Laucella SA, Postan M, Martin D, Fralish BH, Albareda MC, Alvarez MG, et al. Frequency of interferon- $\gamma$ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J Infect Dis 2004;189:909–18.
- [18] Menezes CAS, Teixeira MM, Dutra WO. A resposta imunológica dos pacientes chagásicos; 2009. Available from: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163> [accessed 20 May 2010].
- [19] Lorca M, Gonzalez A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Am J Trop Med Hyg 1992;46:44–9.
- [20] Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padrón T, Wanderley S, Goldenberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Mol Biochem Parasitol 1989;35:127–36.
- [21] Krieger MA. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1992;46:427–34.
- [22] Vercosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL, Melo MFAD, Cavalcanti MGA, Silva ED, et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. J Clin Lab Anal 2007;21:271–6.
- [23] Lorena VMB, Vercosa AFA, Machado RCA, Moinho-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;21:1–8.
- [24] Vasconcelos RHT, Amaral FN, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreira AGP, Morais CNL, et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. Hum Immunol 2010;71:964–7.
- [25] Lorena VMB, Lorena IMB, Braz SCM, Melo AS, Melo MFAD, Melo MGAC, et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. Scand J Immunol 2010;72:529–39.
- [26] Vasconcelos RHT, Azevedo EAN, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreirad AGP, Morais CNL, et al. Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. Hum Immunol 2011;72:402–5.
- [27] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;5:227–680.
- [28] Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal Biochem 1981;117:307–10.
- [29] World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 2002;905:109.
- [30] Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Lise M. Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment. J Immunol Methods 2003;280:1–11.
- [31] Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. Chembiochem 2003;4:1120–8.
- [32] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001;45:1–29.
- [33] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. Scand J Immunol 2008;68:516–25.
- [34] Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Rocha OC. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? Braz J Med Biol Res 1998;31:127–35.
- [35] Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Scand J Immunol 1997;45:74–80.
- [36] Cuna WR, Encina JLR, Cuna CR. Interferon- $\gamma$  or IL-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. J Parasitol 2000;86:295–9.
- [37] Araújo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al. Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Front Biosci 2007;12:2797–806.
- [38] Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton R. CD8<sup>+</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Curr Opin Immunol 2009;21:385–90.
- [39] Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas' disease patients. Int Immunol 2006;18:465–71.
- [40] Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4<sup>+</sup> T cells to immune senescence. J Immunol 2009;183:4103–8.
- [41] Hall BS, Pereira MA. Dual role for transforming growth factor  $\beta$  dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. Infect Immun 2000;68:2077–81.
- [42] Waghbi MC, Coutinho CMLM, Soeiro MNC, Pereira MCS, Feige JJ, Keramidias M, et al. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor  $\beta$  levels in mice deficient in  $\alpha$ 2-macroglobulin. Infect Immun 2002;70:5115–23.
- [43] Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. Am J Pathol 2005;167:305–13.
- [44] Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, Santos RR, et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. J Infect Dis 2010;202:416–26.
- [45] Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Scand J Immunol 1997;45:74–80.
- [46] Bilate AMB, Salemia VM, Ramiresa FJ, Brito T, Russod M, Fonsecaa SG, et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. Microbes Infect 2007;9:1104–13.
- [47] Manque PA, Probst C, Pereira MCS, Rampazzo RCP, Ozaki LS, Pavoni J DP, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. Infect Immun 2011;79:1855–62.

## APÊNDICE F – Artigo publicado

Short Communication

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(3):362-366, May-Jun, 2013  
http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1323-2013

## Evaluation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte response time kinetics in patients with chronic Chagas disease after *in vitro* stimulation with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens

Suellen Carvalho de Moura Braz<sup>[1]</sup>, Virginia Maria Barros de Lorena<sup>[1],[2]</sup>,  
Adriene Siqueira Melo<sup>[1]</sup>, Maria da Glória Aureliano Melo Cavalcanti<sup>[3]</sup>  
and Yara de Miranda Gomes<sup>[1],[2]</sup>

[1]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. [2]. Programa Integrado de Doença de Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. [3]. Pronto-socorro Cardiológico de Pernambuco, Universidade de Pernambuco, Recife, PE.

## ABSTRACT

**Introduction:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes have been implicated in the regulation of host inflammatory response against *Trypanosoma cruzi*, and may be involved in the clinical course of the disease. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic Chagas disease were cultured in the presence of *T. cruzi* recombinant antigens and assayed for lymphocytes at distinct time points. **Results:** It was possible to differentiate clinical forms of chronic Chagas disease at days 3 and 5 according to presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in cell cultures. **Conclusions:** Longer periods of cell culture proved to be potentially valuable for prospective evaluations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with chronic Chagas disease.

**Keywords:** Chronic Chagas disease. Recombinant antigens. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes.

The clinical course of chronic Chagas disease (ChD) varies from absence of symptoms (indeterminate form - IND) to severe manifestations with cardiovascular (cardiac form - CARD) and/or digestive (digestive form) impairment<sup>1</sup>. It has been widely accepted in the scientific community that symptomatic forms of chronic ChD are associated with the establishment of an exacerbated cytotoxic cellular immune response that leads to inflammatory tissue damage and development of symptoms<sup>2,3</sup>. Nevertheless, there is evidence of a specific CD4<sup>+</sup> T lymphocyte lineage, characterized by expression of CD25 surface markers and the FoxP3 transcription factor, that is involved in the regulation of the cytotoxic response in chronic ChD<sup>4,6</sup>. Furthermore, developmental or functional disturbances in these cells have been linked to autoimmune and inflammatory diseases in humans and animals<sup>7</sup>. Higher percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes are observed in peripheral blood from patients with IND forms of ChD<sup>4,6</sup>, which indicates that these cells have a role in controlling development of the morbidities common to human ChD. These lymphocytes produce cellular factors such as interleukin 10 (IL10) and transforming growth factor beta (TGF-β), which are among the host immunosuppression

mechanisms employed during the host immune response to *Trypanosoma cruzi*<sup>4</sup>. While the role of these cytokines in immune modulation guided by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells has been reported<sup>4,8,9</sup>, there is still no consensus about their mechanisms of action.

The development of specific recombinant antigens of *T. cruzi* represents an important step in better understanding the role of the cellular responses in ChD<sup>10</sup>. Our group has been evaluating the use of the recombinant antigens CRA (cytoplasmic repetitive antigen) and FRA (flagellar repetitive antigen) as immunological markers of the clinical evolution of ChD<sup>11-13</sup>, demonstrating significant results for the differentiation of distinct clinical manifestations of the chronic phase of ChD.

This study aimed to evaluate detection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> T cells, and TGF-β in patients with chronic ChD at different cell culture time points after stimulation with CRA and FRA antigens. Eleven patients from the Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca, PROCAPE-Universidade de Pernambuco/UPE who were diagnosed with chronic ChD (IND=06/CARD=05) were selected. Forty milliliters of blood were collected in heparin tubes (Vacuette) to obtain the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) through a concentration gradient technique (Ficoll-Paque™ Plus - Amersham Biosciences). Approximately 5 × 10<sup>6</sup> cells/mL were cultured (RPMI 1640 medium/Sigma with 10% of fetal bovine serum/Sigma) in the presence of Phytohemagglutinin (PHA - GIBCO™/Invitrogen Corporation) (5 μg/mL) (positive control), CRA, or FRA (2 μg/mL), or with no stimulatory agent (negative control). Culture flasks were then incubated

Address to: Dra. Yara de Miranda Gomes. CPqAM/FIOCRUZ. Caixa Postal 7472. Av. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil.  
Phone: 55 81 2101-2500; Fax: 55 81 3453-1911  
e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br  
Received 23 August 2011  
Accepted 06 February 2012

at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 1, 3, and 5 days. Four hours before the end of the respective incubation period, Brefeldin A (Sigma) (10 µg/mL) was added to the cultures. Cells were washed by centrifugation (300 × g/5 min) with PBS-Wash (Phosphate-Buffered Saline with 0.5% bovine serum albumin/Sigma and 0.1% sodium azide/Sigma) and incubated for 30 min with surface antibodies (anti-CD4-fluorescein isothiocyanate/Caltag; anti-CD25-allophycocyanin/Invitrogen). The steps that followed were cell fixation (Human FoxP3 Buffer Set/BD Biosciences®; BD Cytotfix™/BD Biosciences®), centrifugation (300 × g/5 min), and permeabilization (Human FoxP3 Buffer Set/BD Biosciences®; PBS-Wash add 0.2% of saponin/Sigma). Samples were washed again with PBS-Wash and incubated for 30 min with intracellular antibodies (FoxP3-PE/BD Pharmingen; IL10-PE/Caltag). After another round of wash by centrifugation (300 × g/5 min), cells were fixed (BD Cytotfix™) and 30,000 events/sample were acquired in a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using the CellQuest Pro Software. Detection of TGF-β in supernatants from days 1 and 5 was performed using the Human TGF-β1 Immunoassay

Kit - Quantikine® (R&D Systems®). Comparison of different culture time points within each group (IND and CARD) was performed through Friedman test followed by Wilcoxon test. To compare groups at each time point, data normality was analyzed by Student's *t*-test. When presumption of homogeneity was not confirmed, Mann-Whitney test was used. A significance level of 5% was considered in all analyses. The software utilized was Excel 2007, GraphPad Prism 5.0, and Statistical R 2.9.0. The procedures described here were approved by the Ethics Committee at Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Nº: 157/08).

Analysis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte population in each group (CARD and IND) showed that there was no statistical difference among cell culture time points (1, 3, and 5 culture days) after stimulation with either recombinant antigen (**Figures 1A and 1B**). However, an increase in the mean number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in IND patients was observed over the course of the cultures, mainly after FRA stimulation, while in the CARD group, there was a decrease in the mean number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells from the first to the fifth day of culture.

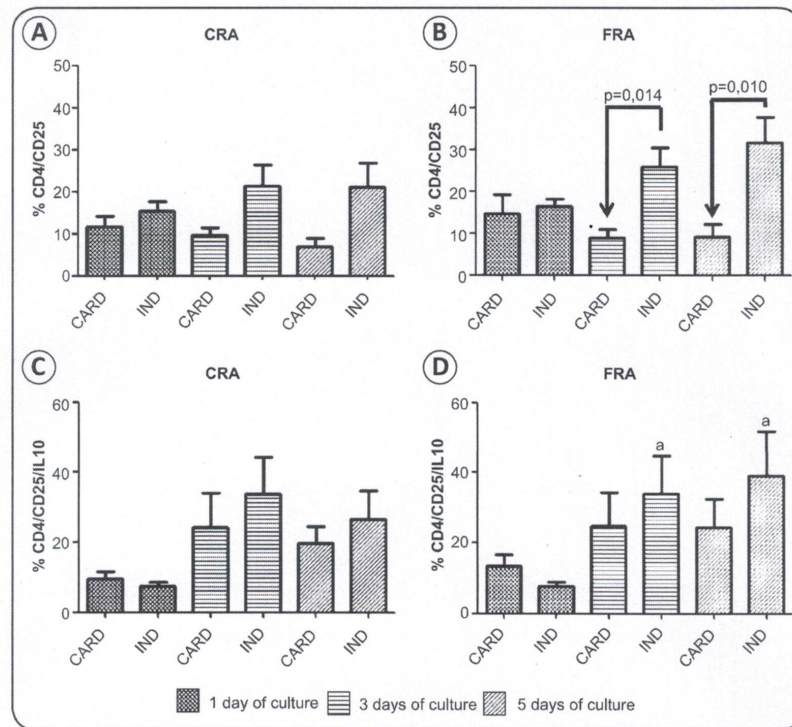


FIGURE 1 - Detection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (A and B) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> (C and D) T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic Chagas disease after *in vitro* stimulation with CRA and FRA. Significant differences are indicated in the figures with the respective p-values. An "a" indicates significant differences in comparison with day 1. CRA: cytoplasmic repetitive antigen; FRA: flagellar repetitive antigen; CARD: patients with cardiac clinical form of chronic Chagas disease; IND: patients with indeterminate clinical form of chronic Chagas disease; CD: cluster of differentiation; IL10: interleukin 10.

Rev Soc Bras Med Trop 46(3):362-366, May-Jun, 2013

The means of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell counts between the 2 groups (CARD versus IND) for each culture time point (culture day 1, 3, or 5) were also compared. Differences between CARD and IND were statistically significant at days 3 (p = 0.014) and 5 (p = 0.010) after *in vitro* stimulation with FRA (Figure 1B). However, no differences were observed after stimulation with CRA (Figure 1A).

In regard to IL10-producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes, the mean values of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> T cells in the IND group, in the presence of FRA, were statistically different between days 1 and 3 (p = 0.031) and between days 1 and 5 (p = 0.031). Comparison of the CARD and IND forms showed that the mean number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> T cells was higher in the IND group than in the CARD patients after stimulation with CRA and FRA, however, this difference was non-significant (Figures 1C and 1D). With regard to the presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>total</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> T cells, there was no statistical difference observed between the groups or among the cell culture time points within each group (Figure 2).

The presence of TGF-β in supernatants was not significantly different between patients with CARD and IND forms of chronic

ChD. Nevertheless, a reduction in TGF-β production after 5 days was observed upon stimulation with CRA (p = 0.043) (Figure 3).

Thus, in the present study we found that *in vitro* culture of PBMC for 3 and 5 days allowed differentiation between CARD or IND forms of ChD through evaluation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte counts after antigenic stimulation. Previous studies using whole blood (*ex vivo*)<sup>5,6</sup> and after 22 hours of culture in the presence of epimastigote antigens<sup>7</sup> were also able to differentiate CARD and IND forms by analyzing the percentage of these cells through flow cytometry. Because CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells represent a small percentage of total circulating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes<sup>7</sup>, we believe that longer periods of cell culture may improve studies regarding the possible roles of these cells in the clinical course of ChD. In regard to IL10 production by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes in chronic ChD, our data corroborated with those presented by Araújo et al.<sup>8</sup>, in that no difference was found between patients with CARD and IND clinical forms. However, the increased numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> T lymphocytes throughout the cell culture period reinforced the importance of considering longer periods of cultivation.

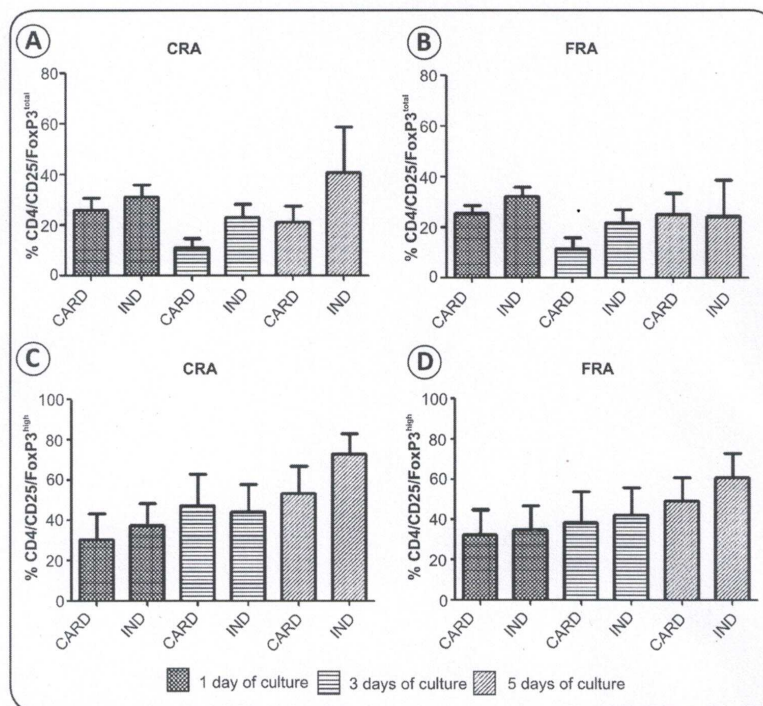


FIGURE 2 - Detection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>total</sup> (A and B) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> (C and D) T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic Chagas disease after *in vitro* stimulation with CRA and FRA. Significant differences are indicated in the figures with the respective p-values. CRA: cytoplasmic repetitive antigen; FRA: flagellar repetitive antigen; CARD: patients with cardiac clinical form of chronic Chagas disease; IND: patients with indeterminate clinical form of chronic Chagas disease; CD: cluster of differentiation.

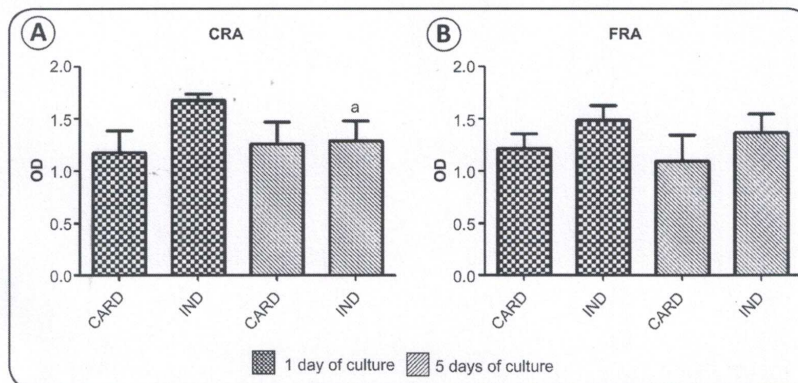


FIGURE 3 - Detection of transforming growth factor- $\beta$  in supernatant of cultures from patients with chronic Chagas disease after *in vitro* stimulation with CRA (A) and FRA (B). Significant differences are indicated in the figures with the respective p-values. The "a" represents a significant difference in comparison with day 1. CRA: cytoplasmic repetitive antigen; FRA: flagellar repetitive antigen; CARD: patients with cardiac clinical form of chronic Chagas disease; IND: patients with indeterminate clinical form of chronic Chagas disease; OD: optical density.

The observation that there were no differences in TGF- $\beta$  production among patients with CARD and IND forms of ChD may have been due to the lower sample size evaluated. Moreover, with the chosen method (capture ELISA), the source of cytokine production is not identified. With regard to the reports citing TGF- $\beta$  as a pathway of immunoregulation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T lymphocytes<sup>7,8</sup>, the technique reported here did not clarify whether CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells were responsible for TGF- $\beta$  production. Thus, the evolution of these growth factors under the regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells in individuals with chronic ChD will only be confirmed upon further study.

We conclude that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte cultures derived from serum of patients chronic ChD that are maintained for longer periods have the potential to be used in prospective studies aimed at understanding the clinical evolution of the disease. Moreover, this approach may also aid in the identification of cellular patterns that can serve as biological markers to monitor patients. Further, it is important to mention that a greater number of individuals should be evaluated to prove the importance of this cell population in immunoregulation in individuals with the IND form of ChD.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to the staff of Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca (PROCAPE/UPE) for assistance in selecting the patients included in this study, to the Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/FIOCRUZ) for use of its facilities, to Antônio Ferreira and Edimilson Silva at Biomanguinhos/FIOCRUZ for providing recombinant antigens, to George Diniz at CPqAM/FIOCRUZ for assistance with statistics, and to Mineo Nakazawa at CPqAM/FIOCRUZ for technical assistance.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### FINANCIAL SUPPORT

This research received financial support by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) (Universal Edital n° 478572/2009-3) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior* (Capes). Y.M. Gomes is a CNPq fellow (number 306427/2006-0). V.M.B. Lorena is a postdoctoral CNPq fellow. S.C.M. Braz and A.S. Melo were candidates for the Master's degree in Public Health (CPqAM-FIOCRUZ) and were CNPq (number133106/2009-8) and Capes fellows, respectively.

#### REFERENCES

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-1402.
- Dutra OD, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:287-292.
- Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 556-570.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, Pascoal VPM, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2005; 62: 297-308.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massar RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 2006; 145:81-92.

Rev Soc Bras Med Trop 46(3):362-366, May-Jun, 2013

6. Araujo FF, Gomes JAS, Rocha MOC, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJS, et al. Potencial role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 2007; 12: 2797-806.
7. Sakaguchi S, Tomoyuki Y, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and Immune Tolerance. *The Cell* 2008; 133:775-787.
8. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 2001; 194: 629-644.
9. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor  $\beta$ 1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002; 196:237-245.
10. Lorca M, Gonzalez A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:44-49.
11. Lorena VMB, Lorena IMB, Braz SCM, Melo AS, Melo MFAD, Melo MGAC, et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after *in vitro* stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 2010; 72:529-539.
12. Vasconcelos RHT, Amaral FN, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreira AGP, Morais CNL, et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. *Hum Immunol* 2010; 71: 964-967.
13. Verçosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL, Melo MFAD, Cavalcanti MGA, Silva ED, et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal* 2007; 21:271-276.



## APÊNDICE G – Artigo publicado

J Clin Immunol (2014) 34:991–998  
DOI 10.1007/s10875-014-0092-6

ORIGINAL RESEARCH

## Increase in the Expression of CD4 + CD25+ Lymphocytic T Cells in the Indeterminate Clinical Form of Human Chagas Disease After Stimulation With Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*

Suellen Carvalho de Moura Braz · Adriene Siqueira de Melo ·  
Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti · Sílvia Marinho Martins ·  
Wilson de Oliveira Jr · Edimilson Domingos da Silva · Antonio Gomes Pinto Ferreira ·  
Virginia Maria Barros de Lorena · Yara de Miranda Gomes

Received: 10 December 2013 / Accepted: 26 August 2014 / Published online: 10 September 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

### Abstract

**Purpose** Regulatory T cells are involved in the clinical course of chronic Chagas disease, possibly because they exercise a control in the patient's inflammatory response to *Trypanosoma cruzi*. This study analyzed the levels of CD4+CD25+ T cells in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation of the peripheral blood mononuclear cells with CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) or FRA (Flagellar Repetitive Antigen) *T. cruzi* antigens.

**Methods** Groups of patients with the cardiac form and indeterminate form; and non-infected individuals, were selected.

S. C. de Moura Braz · A. S. de Melo · V. M. B. de Lorena ·  
Y. de Miranda Gomes  
Departamento de Imunologia, Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

M. da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti · S. M. Martins ·  
W. de Oliveira Jr · E. D. da Silva · A. G. P. Ferreira ·  
V. M. B. de Lorena  
Programa Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

M. da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti · S. M. Martins ·  
W. de Oliveira Jr  
Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)—Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil

E. D. da Silva · A. G. P. Ferreira  
Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Y. de Miranda Gomes (✉)  
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420 Recife, PE, Brazil  
e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

The CD4+CD25+ T lymphocyte population, as well as the FoxP3 expression and the IL10 production, were evaluated by flow cytometry after stimulation with CRA or FRA.

**Result** The IND group presented higher levels of CD4+CD25+ T cells than the CARD group. However, there was no evidence of a relationship between FoxP3 and IL10 with any of the chronic forms.

**Conclusions** Our results suggest the possible involvement of CD4+CD25+ T cells specific to CRA and FRA in controlling the progression of clinical outcomes. Though, further studies are needed to define which mechanisms activate regulatory T cells and lead to pathology control in chronic human Chagas disease.

**Keywords** Chronic Chagas Disease · repetitive antigens · CD4+CD25+ T cells · immunomodulation

### Introduction

Chronic Chagas disease is a major medical concern due to the severity of its clinical forms. The manifestations range from no symptoms or structural abnormalities (indeterminate form - IND) to cardiovascular (cardiac form - CARD) and/or digestive (digestive form) disorders [1]. In seeking to understand how these different clinical outcomes develop, several studies have been conducted with a view to establishing the role of immunological response of the host vis-à-vis *Trypanosoma cruzi* [2–13]. What has been postulated is that clinical symptoms occur due to tissue damage caused by exacerbating the inflammatory response to the parasite in the absence or failure of immunomodulatory mechanisms.

Therefore, studies on the modulatory action of a distinct subtype of regulatory T cells, known as Tregs (regulatory T lymphocytic cells) receive much attention [14]. The CD4+CD25+ T cells, designated as natural Treg, are currently the main focus of such attention. Accumulated evidence points to the crucial role of these cells in maintaining immunological tolerance and the negative control of pathological immune responses [15–18]. Tregs can suppress the activation, proliferation and effector functions of a wide range of immune cells, including CD4+ and CD8+ T cells, natural killer (NK) and NKT cells, B cells and antigen-presenting cells (APCs) [19]. These lymphocytes may suppress effector T cells by mechanisms including direct competition with stimulatory ligands of the APCs or by reducing essential growth factors such as IL2. Alternatively, broader suppressive mechanisms may also be used such as IL10 and TGF (transforming growth factor) -  $\beta$  as secreted cytokines [15, 17, 20–22].

Besides expressing how the IL2 receptor  $\alpha$ -chain (CD25), CD4+CD25+ Tregs also express the FoxP3 (Forkhead Box P3) transcription factor, a control gene that is key to their development and function [19, 23]. Mutations in the FoxP3 gene lead to a deficiency in or a malfunction of these cells, the consequence of which is that an autoimmune and/or an inflammatory disorder develops [24].

Some studies have linked the high frequency of CD4+CD25+ Tregs to the IND form of human Chagas disease [11, 12, 25–27]. It is believed that this cell population acts on maintaining the tissue environment damage-free, a characteristic of asymptomatic patients (IND). Nevertheless, mice that had been chronically infected with *T. cruzi* did not present enhancement of the immune responses of their CD8+ T cells after depletion of Tregs [28]. Therefore, the role of these cells in the immunopathology of Chagas disease remains obscure.

Few studies analyzing the relationship between the clinical forms of chronic human Chagas disease and CD4+CD25+ Treg lymphocytes have used ex vivo cell phenotyping [11, 12] or complex mixtures of *T. cruzi* antigens to stimulate cells in vitro [25, 27, 29]. However, the wide variety of epitopes present in these antigenic preparations, some of which are common to other *Trypanosomatidae* parasites [30, 31] may make it difficult to identify specific immunological markers of Chagas disease.

Therefore, our group has been working with *T. cruzi* recombinant antigens, CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) - expressed throughout the cytoplasm of the parasite and detected in amastigotes and epimastigotes—and FRA (Flagellar Repetitive Antigen) - located in the region of the flagellum of the epimastigotes and trypomastigotes [32, 33]. CRA and FRA present specificity to *T. cruzi* and a repetitive structure, which are common characteristics to immunogenic molecules [34], and furthermore, have shown significant results as they have identified immunological patterns in the different clinical forms of the disease [8, 35, 36].

Thus, the purpose of this study was to evaluate the CD4+CD25+ T cell population, as well as the FoxP3 expressed and IL10 produced by these lymphocytes, in patients with chronic clinical forms of Chagas disease after in vitro stimulation with CRA or FRA.

## Methods

### Study Population

Selecting patients with chronic Chagas disease was carried out at the Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)—Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil from March 2010 to April 2011. The inclusion criteria were: (1) a positive serological test for Chagas disease (Enzyme-linked immunosorbent assay/ELISA and/or immunofluorescence reaction/RIFI); (2) the clinical form being characterized by the patient's medical history, physical examination and clinical tests (electrocardiogram, chest X-ray and echodopplercardiography, for all patients; oesophagogram and barium enema, when the disease was suspected); and (3) absence of previous etiological treatment. After the screening process, the patients were grouped as follows: an IND group ( $n=20$ , 32–75 years old; thirteen women and seven men), who were patients with the chronic asymptomatic form of Chagas disease, i.e. individuals for whom the clinical tests showed no significant alteration; and a CARD group ( $n=11$ , 43–75 years old; four women and seven men), who were patients with chronic Chagas cardiopathy, i.e. individuals with clinical and/or echocardiographic and radiological signs of heart enlargement (cardiac dilatation and/or ejection fraction  $<40\%$ ) and absence of complaints/alterations in digestive system (dysphagia and/or odynophagia). Cardiac dilatation and ejection fraction were characterized by chest X-ray and echodopplercardiogram, with ejection fraction estimated by Teichholz method [37] according to American Society of Echocardiography. A group of noninfected volunteers (NI) ( $n=9$ , 24–65 years old; seven women and two men) who had never received a blood transfusion and presented negative serological tests for Chagas disease was included as control. The protocols described in this study were approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings of CPqAM/Fiocruz (N° 157/08) as per the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983, and the individuals who agreed to participate signed a properly informed consent form before being included in the study.

### Recombinant Antigens from *T. cruzi*

The CRA and FRA antigens were obtained as described by Kriegger et al. [33]. Briefly, the genes encoding CRA and

FRA were cloned and their expression induced using isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG). After centrifugation, the proteins were purified by nickel affinity chromatography as per the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Antigens were analysed using electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulphate [38] and silver coloration [39].

#### Cell Culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood by centrifugation in a Ficoll-Paque density gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) as described previously [40]. The cells were placed in 14 ml polypropylene culture tubes (Beckton Dickinson®, San Jose, CA, USA) containing RPMI 1640 medium (SIGMA-ALDRICH®, St Louis, MO, USA) supplemented with L-glutamine, 1 % antibiotic (10,000 U of penicillin, 10,000 U of streptomycin stock; SIGMA-ALDRICH®) and 10 % of bovine serum albumin (SIGMA-ALDRICH®). The culture tubes were stimulated with phytohemagglutinin-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5  $\mu$ g/mL) (positive control), CRA or FRA (2  $\mu$ g/mL), in addition to which there was one culture without a stimulus which was used as a negative control. The cultures were carried out at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/mL and incubated at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> for 3 days, as per Braz et al. [41].

#### Immunophenotyping

Four hours before the end of cell culture, Brefeldin A (SIGMA-ALDRICH®) (10  $\mu$ g/mL) was added in order to impede the secretion of cytokines from the Golgi complex [42]. After treatment with EDTA (20 mM) (SIGMA-ALDRICH®), the cells were transferred to 5 ml polystyrene tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and washed by centrifugation (300 g / 5 min / at room temperature) in phosphate buffer saline (PBS) containing 0.5 % bovine serum albumin (SIGMA-ALDRICH®) and 0.1 % sodium azide (SIGMA-ALDRICH®) (PBS-Wash).

Samples were immunostained with fluorescein isothiocyanate (FITC) - conjugated anti-CD4 (clone: 53.5) (Caltag, Burlingame, CA, USA) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD25 (clone: CD25-3G10) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). The tubes were then incubated for 30 min at room temperature. After fixation (FACS Fix Solution, Becton Dickinson), the cells were permeabilized (PBS-Wash containing 0.5 % (w/v) saponin; SIGMA-ALDRICH®) and incubated for 30 min in the dark at room temperature with anti-IL10 (clone: JES3-19 F1) (Caltag, Burlingame, CA, USA) or anti-FoxP3 (clone: 259D/C7) (Becton Dickinson) conjugated with phycoerythrin. The cells were washed, fixed

and stored at 4 °C until acquired and analyzed by flow cytometry.

#### Flow Cytometry Acquisition and Analysis

Immunostained samples were run in a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson), and a minimum of 30,000 events/ sample collected. The acquisition strategy began by selecting the gate of the lymphocyte population by means of the dot plot Forward Scatter Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC). To evaluate the presence of CD4+CD25+ cells, the statistical quadrant FL1 (CD4) versus FL4 (CD25) of the population of interest in the dot plots was analyzed. To undertake the analysis of the expressions of CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+CD25+IL10+, the window of interest R2 in the FL1 versus FL4 graph was selected, and FL2 (FoxP3 or IL10) versus FL4 two-dimensional graphs were obtained. Data acquisition and analysis were performed using CellQuest Pro software.

#### Statistical Analysis

To compare the average expressions of CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3high and CD4+CD25+IL10+ T cells among the groups, Bartlett's test for the homogeneity of variances was firstly applied. The *p* value was obtained by the Kruskal-Wallis test was followed by the Mann-Whitney test whenever there was a difference among averages. To evaluate the frequency of CD25, FoxP3 and IL10 in CD4+ T lymphocytes, the chi-square test was performed. The Pearson correlation test was used to evaluate correlations between CD25, FoxP3 and IL10 in CD4+ T cells. A 5 % significant level was considered in all analyses. The software used was Excel 2000, GraphPad Prism 5.0 and Statistical R 2.9.0.

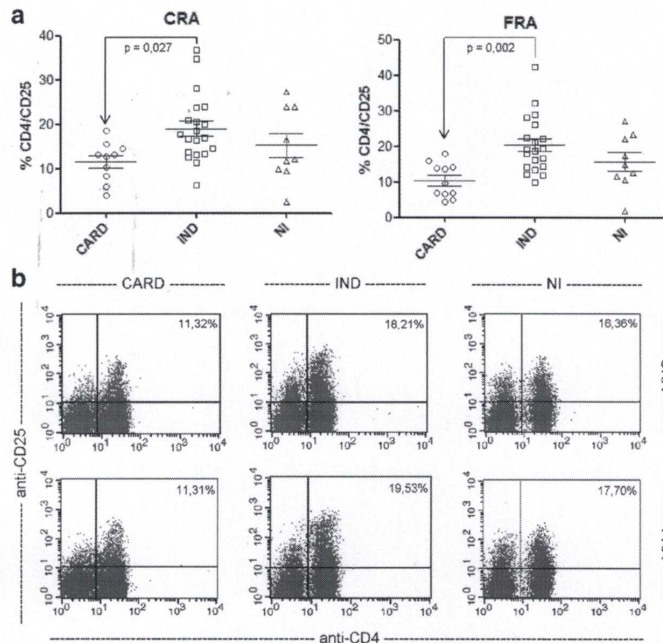
#### Results

Frequencies of CD4+CD25+, CD4+CD25+FoxP3high and CD4+CD25+IL10+ T cells, specific to CRA and FRA, in patients with chronic Chagas disease

Our data demonstrate that in the presence of recombinant antigens, the cells of IND individuals presented higher expression levels of CD4+CD25+ molecules compared to those of CARD and NI individuals (Fig. 1). However, no significant differences in the levels of CD4+CD25+FoxP3high (Fig. 2A and B) and CD4+CD25+IL10+ (Fig. 2C and D) T lymphocytes were observed.

994

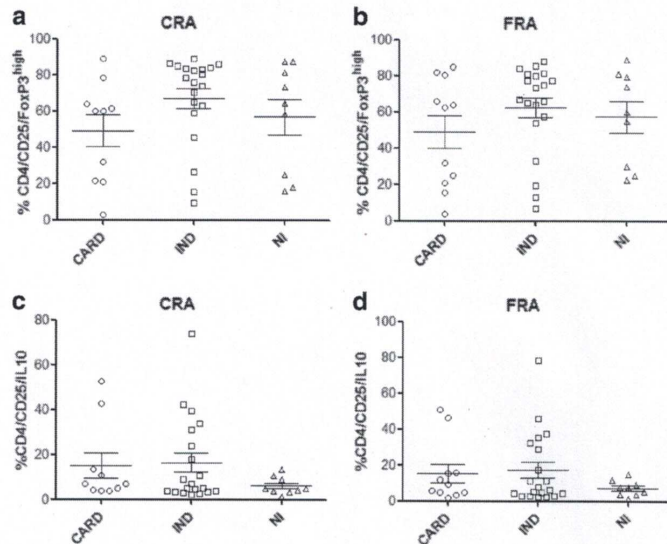
J Clin Immunol (2014) 34:991–998



**Fig. 1** Increased expression for CD4+ CD25+ T cells by indeterminate clinical form of human Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* a Detection of CD4+CD25+ T cells of PBMC of chronic Chagas disease patients and individuals not infected after stimulation with *Trypanosoma cruzi* cytoplasmatic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA). Patients with cardiac clinical form (CARD) ( $n=11$ ), indeterminate clinical form (IND) ( $n=20$ ) and individuals not infected (NI) ( $n=9$ ). The horizontal bars

represent the arithmetic mean and the error standard. Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test was used. The statistical differences are indicated in the figure with the value of  $p < 0,05$ . b Representative flow cytometric analysis of CD4+CD25+ T cells of PBMC obtained from chronic Chagas disease patients (CARD, IND) after stimulation with CRA and FRA. Numbers in upper-right corner represent the percentage mean of CD4 T cells that express CD25 in each analyzed group

**Fig. 2** Levels of CD4+CD25+ FoxP3<sup>high</sup> a and b and CD4+CD25+IL10+ c and d T cells in chronic Chagas disease patients and not infected individuals after stimulation with *Trypanosoma cruzi* cytoplasmatic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA). Patients with cardiac clinical form (CARD) ( $n=11$ ), indeterminate clinical form (IND) ( $n=20$ ) and individuals not infected (NI) ( $n=9$ ). The horizontal bars represent the arithmetic mean and the error standard. Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test was used



#### High and low Frequencies for CD25, FoxP3 and IL10 in CD4+ T Cells Specific to CRA and FRA

For this evaluation, the concept of 'high' and 'low' frequency was established and the cut-off value was obtained from the global average production of all forty individuals (CARD=11, IND=20, NI=9), as per Lorena et al. [8]. Therefore, the frequencies of CD25 molecules in CD4+ T cells were evaluated and those of Foxp3 and IL10 molecules in CD4+CD25+ T cells.

It was considered that most of the patients from the IND group produced high levels of CD25 molecules in CD4+ cells, their values being significantly higher than those reported from the CARD group after stimulation with CRA ( $p=0.014$ ) and FRA ( $p=0.004$ ). Although no statistical difference was observed, 44.44 % of the NI group had a high frequency of CD4+CD25+ lymphocytic T cells in the presence of both recombinant antigens, whereas patients classified as CARD demonstrated a low frequency after stimulation with CRA (10 %) and FRA (9.09 %) (Table 1).

No statistical difference was observed between the groups regarding the frequency of IL10 and FoxP3 molecules in CD4+CD25+ cells specific to recombinant antigens (Table 1). Nevertheless, high frequency FoxP3 occurred in IND patients after stimulation with CRA (75 %) and FRA (70 %). In addition, patients with chronic Chagas disease showed a higher frequency of IL10 when compared with the NI group.

**Table 1** High frequency of T CD4+CD25+ cells in patients with indeterminate clinical form of chronic Chagas disease, after stimulation with CRA and FRA

| CD4+T Cells    | Global mean (cut-off) | High-producer (%) |                    |       |
|----------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------|
|                |                       | CARD              | IND                | NI    |
| CD25+          |                       |                   |                    |       |
| CRA            | 16,23 (2,51–36,77)    | 10,00             | 61,00 <sup>a</sup> | 44,44 |
| FRA            | 16,60 (1,89–42,40)    | 9,09              | 70,00 <sup>a</sup> | 44,44 |
| CD25+FoxP3high |                       |                   |                    |       |
| CRA            | 59,99 (2,65–88,96)    | 50,00             | 75,00              | 55,55 |
| FRA            | 57,42 (3,85–88,87)    | 54,54             | 70,00              | 55,55 |
| CD25+IL10+     |                       |                   |                    |       |
| CRA            | 13,71 (1,65–74,06)    | 20,00             | 40,00              | 0,00  |
| FRA            | 14,48 (1,12–78,54)    | 36,36             | 35,00              | 11,11 |

Data are expressed as percentage of individuals displaying percentage of cells higher or equal the global mean (cut-off) calculated using data from all groups

CRA Cytoplasmatic Repetitive Antigen, FRA Flagellar Repetitive Antigen. CARD cardiac clinical form, IND indeterminate clinical form, NI individuals not infected

The chi-square test was used, and statistical significance ( $p<0,05$ ) is represented by superscript letter 'a' for comparisons with CARD

#### Correlations Between CD25, FoxP3 and IL10 in CD4+ T Cells After Stimulation With CRA and FRA

Correlations between CD25, FoxP3 and IL10 in CD4+ lymphocytic T cells were analyzed with a view to identifying possible relationships between these markers and the chronic clinical forms of Chagas disease examined in this study. After stimulation with FRA, a significant positive correlation was only observed between IL10 and CD25 in the IND group ( $p=0.58$ ). On the other hand, a significant negative correlation was observed when FoxP3 was correlated with CD25 and IL10 in the IND group for both recombinant antigens (Table 2).

#### Discussion

This study assessed the CD4+CD25+ T cell population and the FoxP3 it expressed and the IL10 it produced in Chagas patients with chronic clinical forms of the disease, after in vitro stimulation with CRA and FRA antigens of *T. cruzi*.

We observed that patients with the IND form presented a higher mean of CD4+CD25+ T lymphocytes than those of the other groups, after stimulation with both recombinant antigens. Vitelli-Avelar et al. [11, 12] obtained similar results with IND patients thus verifying that they present higher levels of CD4+CD25high T cells in peripheral blood than those in CARD and DIG patients. CD4+CD25high T lymphocytes were also at higher levels in the IND group after in vitro stimulation with epimastigote antigens [26]. These data reinforce the hypothesis that the immunomodulatory mechanisms exerted by Treg lymphocytes may be able to control deleterious cytotoxic activity in individuals with asymptomatic chronic Chagas disease, and thus the morbidity present in chronic infection.

**Table 2** Positive and negative coefficients of correlation for CD25, FoxP3 and IL10 expressed by CD4+ T lymphocytes of chagasic patients, after stimulation with CRA and FRA

| CD4+ T cells | Coefficient of correlation |       |        |        |
|--------------|----------------------------|-------|--------|--------|
|              | CARD                       |       | IND    |        |
|              | CRA                        | FRA   | CRA    | FRA    |
| IL10×CD25    | -0,09                      | -0,02 | 0,41   | 0,58*  |
| FoxP3×CD25   | -0,20                      | 0,04  | -0,49* | -0,64* |
| FoxP3×IL10   | 0,16                       | -0,17 | -0,70* | -0,62* |

CRA Cytoplasmatic Repetitive Antigen, FRA Flagellar Repetitive Antigen, CARD cardiac clinical form, IND indeterminate clinical form

Pearson correlation test was used, and the \* represents statistical differences with the value of  $p\leq 0,05$

Nevertheless, on analyzing CD4+CD25<sup>high</sup> T cells after cultivation with trypomastigote antigens, Guedes et al. [29] found no significant difference between the groups in their study (free/mild cardiomyopathy; moderate/severe cardiomyopathy; treated with Benznidazol; non-infected). Interestingly, these authors observed that CD4+CD25+ T cells from Chagas patients with moderate/severe cardiomyopathy showed lower suppressive activity of T cell proliferation than those with free/mild cardiomyopathy [29], thus suggesting a correlation between the loss of the suppressor activity and the clinical morbidity of the chronic phase.

The lower levels of CD4+CD25+ T cells in patients with a cardiac disorder compared with the levels of NI and IND groups merit discussion. Reports about the reduction in the population of T CD4 and T CD8 memory cells in patients with severe clinical manifestations of chronic Chagas disease affirm that constant antigenic stimulation because of the persistence of *T. cruzi* in tissue leads to cell exhaustion [2, 3]. The deficiency in suppressing T cell proliferation presented by the CD4+CD25+ T cells of chronic Chagas disease patients with severe cardiomyopathy [27, 29] may be correlated with these findings. Such results together with the data presented by the CARD group in our study suggest that the loss of the immunoregulatory mechanisms of Treg cells are involved with the progress of tissue damage in the chronic phase of Chagas disease.

Previous studies affirm that Treg cells do not appear to play a major role in controlling the pathology of Chagas disease [28, 43, 44]. Depletion of CD25+ cells from chronically infected mice did not enhance immune responses of muscle-derived CD8+ T cells [28]. Treatment with anti-CD25 did not interfere in parasitism and cardiac inflammation of acutely infected mice, even when a high expression of Foxp3 in the heart peaked concomitantly with the inflammatory infiltrate and the appearance of CD4+CD25+ T cells in the tissue [43]. Treg cells did not show that they had any role in the pathogenesis of experimental chronic Chagas disease after the inactivation of CD25+ T cells [44]. In our study, negative correlations between FoxP3 and CD25 in the IND group together with the absence of significant differences as to the production of CD4+CD25+FoxP3<sup>high</sup> T lymphocytes between the groups reiterate the limited role of Tregs in Chagas disease.

However, the IND group produced high levels of FoxP3 after CRA (75 %) and FRA (70 %) stimulation. A higher frequency of CD4+CD25<sup>high</sup> T cells expressing FoxP3 was found in Chagas disease patients with no or mild cardiomyopathy symptoms than in those with moderate and severe cardiomyopathy after stimulation with trypomastigote antigen [27, 29]. Reports of a high expression of FoxP3 in muscle layers and the neuronal plexus areas of the colon [10] and heart tissue [45] of asymptomatic Chagas disease patients reinforce the regulatory role of FoxP3+ cells in moderating the

inflammatory process presented in this disease, thus indicating there is a need for research studies on Foxp3 with an immunological marker in the clinical evolution of chronic Chagas disease.

Although CD25 and FoxP3 are identified as Treg cells markers, there is no consensus on the definition of this cell population based only on these markers expression levels. Some authors claim that this subtype cells in humans are those CD4+ with high expression of CD25 (CD4+CD25<sup>high</sup>) [46, 47]. Previous studies demonstrated that patients with indeterminate form of Chagas disease showed higher frequency of CD4+CD25<sup>high</sup> T cells when compared to cardiac group [11, 12, 26, 27]. However, expression of CD45RA (cell activation marker) in Treg cells showed that evaluation only of CD25<sup>high</sup> cells (CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>high</sup>CD45RA<sup>-</sup>) excludes naive Treg cells (CD25<sup>mid</sup>FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>) [48, 49]. Therefore, faced with these studies, a comprehensive assessment of CD25 as a biomarker proves to be a better approach to firstly done in evaluating clinical outcome of patients with chronic Chagas disease. Allied to this, assessment of others Treg cell markers (CD45RA, CD45RO, CTLA-4, GITR, CD95, among others) [48] will allow a more precise definition about the relationship between specific subtypes of this lymphocytic lineage and the immunoregulation of chronic Chagas disease.

Several molecules and cellular events have already been described as mechanisms used to suppress the immune response in Chagas disease [7, 12, 13, 29, 50]. In acute phase of *T. cruzi* infection a robust inflammatory response occurs including cytokine production such as INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [50, 51]. Nevertheless, with the transition to the chronic phase of Chagas disease, the immunological patterns evolve to a more immunoregulatory profile, in attempting to control inflammation. One of principal molecules identified as responsible for this immunomodulation is IL10, with their production being reported in human (*T. cruzi*) infection. High production of IL-10 has been correlated to chronic asymptomatic patients, leading to hypothesis that permanence in IND form of Chagas' disease is associated with maintenance of an anti-inflammatory immune response [7–9, 13, 29].

However, the two groups of patients evaluated in our study present low levels of CD4+CD25+IL10+ T cells after stimulating with specific antigens (CRA and FRA), with no significant difference between CARD and IND groups. The maintenance of suppressive activity of the proliferative response by CD4+CD25+ T cells in IND patients, even after adding the anti-IL10 antibody [27], together with our findings, indicate that IL10 production may not be essential to the action of the CD4+CD25+ T lymphocytes when immunomodulating chronic Chagas disease. Probably other modes of suppression are involved such as apoptosis of effector T cells by absorption of cytokines [52, 53], lysis of conventional T cells by granzymes [54], and other mechanisms unrelated to

the production of IL-10. Though, it has already been reported that IND patients present a high IL10 production by CD4+CD25<sup>high</sup> T lymphocytes, when compared with non-infected individuals [25, 27]. The positive correlation between CD25 and IL10 in the indeterminate form after FRA stimulation may indicate a possible relationship of this cytokine with Treg cells in Chagas disease. Notwithstanding, analyzes involving cell activation markers (eg CD45RA) and suppressor functions (eg CTLA-4) may permit the discrimination among Treg lymphocytes subtypes [48]. Therefore, it would be possible to identify which cell subtype uses IL10 to suppress immune response in the chronic Chagas disease.

### Conclusions

The results of this study demonstrate that using the level of CD4+CD25+ T cells obtained after stimulating PBMC in vitro with CRA and FRA recombinant antigens of *T. cruzi* enabled IND patients to be differentiated from CARD patients. Thus, CD4+CD25+ T cells specific to *T. cruzi* are shown to be a promising immunological marker for the clinical prognosis of patients in the chronic phase of Chagas disease. Moreover, the higher frequency of CD25 in CD4+ T lymphocytes in the IND group compared to patients with a cardiac disorder re-enforces the direct relationship of these cells with an absence of clinical symptoms. On the other hand, we believe that the mechanisms for the immune regulation of CD4+CD25+ T cells are not related to the production of IL10, notwithstanding that earlier studies have suggested there is a link between the production of this anti-inflammatory cytokine by other cell types and the chronic IND form being maintained [7, 8, 13, 29]. In conclusion, despite the good results obtained in this research, follow-up studies of IND patients should be conducted to better understand the role of Treg cells in the clinical evolution of chronic Chagas disease and to use the results in order to help design strategies for the clinical monitoring of patients when the disease is in its chronic phase.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Doctors Cristina Tavares and Marisa Melo from PROCAPE/UEPE for selecting the patients included in this study, to George Diniz at CPqAM/Fiocruz for statistical analysis assistance and to Mineo Nakazawa at CPqAM/Fiocruz for technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/IOCRUZ for the use of its facilities. This research study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Edital n° 478572/2009-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes is a fellow researcher of CNPq (No. 407763/2012-0). During the study, VMB Lorena received a CNPq Ph.D. scholarship, SCM Braz and AS Melo received a CNPq (No. 133106/2009-8) and CAPES (06407432421) M.Sc. scholarship, respectively.

**Conflict of Interest** The authors declare that they no conflicts of interest.

### References

- Rassi Júnior A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375:1388–402.
- Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8 T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 2006;18:465–71.
- Albareda MC, Olivera GC, Laucella AS, et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol*. 2009;183:4103–8.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Rocha MOC, et al. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:127–31.
- Barros-Mazon S, Guariento ME, Silva CA, Coffman RL, Abrahamson IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol*. 2004;111:137–45.
- Cardoso GM, Morato MJ, Gomes JA, et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci*. 2006;11:1158–63.
- Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003;71:1185–93.
- Lorena VMB, Lorena IMB, Braz SCM, et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2010;72:529–39.
- Menezes CAS, Rocha MOC, Souza PEA, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 2004;137:129–38.
- Silveira ABM, Araújo FF, Freitas MAR, et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3<sup>+</sup> cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol*. 2009;70:65–7.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JCP, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural killer T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2005;62:297–308.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol*. 2006;145:81–92.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Dias JCP, Gontijo ED, Faria AM, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol*. 2008;68:516–25.
- Jiang H, Chess LB. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*. 2004;114:1198–208.
- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*. 2005;6:353–60.
- Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 2000;6:1538–43.
- Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest*. 2004;114:1209–17.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). *J Immunol*. 1995;155:1151–64.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775–87.

20. Belkaid Y, Sun CM, Bouladoux N. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:406–12.
21. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009;31:673–85.
22. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007;13:108–16.
23. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–6.
24. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209–26.
25. Araújo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al. Potencial role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007;12:2797–806.
26. Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop*. 2011;5:e992.
27. Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC, et al. Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*. 2012;217:768–77.
28. Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect Immun*. 2007;75:861–9.
29. Guedes PMM, Gutierrez FRS, Silva GK, et al. Deficient regulatory T cell activity and Low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1630.
30. Araujo FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related Trypanosomatids. *Infect Immun*. 1986;53:179–85.
31. Malchiodi EL, Chiaramontb MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Agl63B6). *Clin Exp Immunol*. 1994;97:417–23.
32. Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Pradón T, Wanderley S, Goldenberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;35:127–36.
33. Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;46:427–34.
34. Ibañez CF, Aflranchino JL, Macina RA, et al. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;30:27–34.
35. Vasconcelos RHT, Amaral FN, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreira AGP, Morais CNL, et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. *Hum Immunol*. 2010;71:964–7.
36. Verçosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL, et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal*. 2007;21:271–6.
37. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in chocardigraphic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol*. 1976;37:7–11.
38. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
39. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*. 1981;117:307–10.
40. Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, et al. Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal*. 2008;22:91–8.
41. Braz SCM, Lorena VMB, Melo AS, Cavalcanti MGAM, Gomes YM. Evaluation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocyte response time kinetics in patients with chronic Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46:362–6.
42. Hudson TH, Grillo FG. Brefeldin-A enhancement of ricin A-chain Immunotoxins and blockade of intact ricin, Modeccin, and Abri. *J Biol Chem*. 1991;266:18586–92.
43. Mariano FS, Gutierrez FRS, Pavanelli WR, et al. The involvement of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2008;10:825–33.
44. Sales-Júnior PA, Golgher D, Oliveira RV, Vieira V, Arantes RME, Lannes-Vieira J, et al. The regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2008;10:680–8.
45. Araújo FF, Silveira ABM, Corrêa-Oliveira R, Adad SJ, Fiuzza JA. Characterization of the presence of Foxp3<sup>+</sup> T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Immunol*. 2011;42:299–302.
46. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167:1245–53.
47. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:253–7.
48. Sakaguchi S, Miyara M, Constantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:490–500.
49. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531–62.
50. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002;18:262–5.
51. Oliveira GM, Diniz RL, Batista W, Batista MM, Correa CB, Araujo-Jorge TC, et al. Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2007;17:79–86.
52. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol*. 2007;8:1353–62.
53. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004;104:2840–8.
54. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009;182:1469–80.



**ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz**

**Título do Projeto:** “Investigação da ação do Benzonidazol sobre a resposta imunológica de portadores crônicos da doença de Chagas frente a antígenos de *Trypanosoma cruzi*”.

**Pesquisador responsável:** Yara Gomes.

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

**Data de apresentação ao CEP:** 17/10/2011

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 45/11

**Registro no CAAE:** 0045.0.095.000 -11

**PARECER Nº 01/2012**

O Comitê avaliou as modificações introduzidas 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 01 de fevereiro de 2015. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 01 de fevereiro de 2012.

  
Giselle Campos de Oliveira  
Farmacêutica  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 046/3376  
CPqAm / FIOCRUZ

**Observação:**

**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 01/02/2013.