

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Amanda Vasconcelos do Nascimento

**AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS E DA EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
DE CHAGAS SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM *Trypanosoma cruzi* E
TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL**

RECIFE

2015

AMANDA VASCONCELOS DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS E DA EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
DE CHAGAS SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM *Trypanosoma cruzi* E
TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Yara de Miranda Gomes

Co-orientadora: Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- N244a Nascimento, Amanda Vasconcelos.
Avaliação das Quimiocinas e da expressão de seus Receptores em Células Mononucleares de Pacientes Portadores da Doença de Chagas Submetidas à Infecção in vitro com Trypanosoma cruzi e Tratamento com o Benzonidazol / Amanda Vasconcelos Nascimento. - Recife: s.n, 2015.
75 p.: il.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Orientadoras: Yara de Miranda Gomes; coorientadora, Virginia Maria Barros de Lorena.
1. Doença de Chagas - quimioterapia. 2. Receptores de Quimiocinas. 3. Nitroimidazóis - uso terapêutico. 4. Tripanossomicidas - uso terapêutico. 5. Tripanossomicidas – administração & dosagem. 6. Nitroimidazóis – administração & dosagem. 7. Doença Crônica. 8. Células cultivadas. 9. Humanos. 1. Gomes, Yara de Miranda. 2. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

AMANDA VASCONCELOS DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS E DA EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA
DE CHAGAS SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM *Trypanosoma cruzi* E
TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL**

Aprovado em: 25 /03 /2015

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Banca Examinadora

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)
Membro Titular Interno

Dr^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Membro Titular Externo

Dr^a Yara de Miranda Gomes (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e ao nosso senhor Jesus Cristo por me conceder força e fé pra não desistir no primeiro obstáculo.

Meus Pais e meus avós pelo apoio, carinho e compreensão, por muitas vezes ter que abdicar de estar com eles. Ao meu irmão, tios e primos por todo apoio. Amo vocês.

Meu namorado Gabriel, por toda paciência, amor, carinho cumplicidade e também pelo apoio de não desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Amo-te.

Meus amigos do ensino médio e os de faculdade, por apoiar e ajudar nessa jornada que é o mestrado. Agradeço também aos meus amigos do laboratório de imunoparasitologia, que estão lá no dia a dia e que apesar de ser um pouco cansativo é também muito divertido.

Ao meus amigos do LBCM, pelas conversas científicas e não científicas durante os almoços e confraternizações.

Agradeço a Patrícia, Karine e Artur, que estão no dia a dia dos experimentos, nas tristezas das contaminações e nas alegrias dos experimentos bem sucedidos.

Agradeço as minhas Orientadoras Dra. Yara e Virginia por todo ensino, compreensão e oportunidade, da Iniciação Científica ao Mestrado.

Agradeço ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por todo apoio Técnico e Financeiro, em especial ao NIT (Núcleo de Plataformas Tecnológica).

Ao Ambulatório da Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca, do PROCAPE, por todo apoio na seleção dos pacientes. Em Especial a Dra Silvia, Dra Cristina Tavares , Dra Lúcia e a Técnica de Enfermagem Alci.

Aos Órgãos Financiadores, FIOCRUZ e o CNPq, pelo investimento no projeto.

NASCIMENTO, Amanda Vasconcelos. **Avaliação das quimiocinas e da expressão de seus receptores em células mononucleares de pacientes portadores da doença de Chagas submetidas à infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* e Tratamento com o benzonidazol**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

Atualmente o Brasil apresenta 3 milhões de indivíduos portadores da cardiomiopatia chagásica. Porém, tratamento etiológico com o fármaco Benzonidazol (BZ) na fase crônica da doença ainda não está elucidado. Acredita-se que a recomendação do BZ nessa fase, pode prevenir ou retardar a evolução clínica da cardiomiopatia na Doença Chagas (DC). Assim o objetivo do estudo é avaliar a produção de quimiocinas e expressão de seus receptores em Células mononucleares do sangue periférico - PBMC (de portadores crônicos da doença de Chagas) submetidas *in vitro* ao tratamento com BZ, após a infecção com *T.cruzi*. Foram selecionados 11 pacientes na fase crônica da doença. Amostras de sangue desses pacientes foram coletadas para obtenção de PBMC, em que foram cultivadas em placas de cultivo na concentração de 10^6 células/ml por poço. Após a adesão das células aderentes (principalmente macrófagos), as células não aderentes (principalmente linfócitos) foram removidas e as formas tripomastigotas foram adicionadas ao cultivo para infecção das células aderentes. Subsequente a incubação, as células não aderentes foram adicionadas novamente ao cultivo juntamente com o fármaco Bz ($1\mu\text{g/mL}$), ficando um co-cultivo de células aderentes infectadas com *T.cruzi*, células não aderentes e o BZ (C+T+BZ). As placas de cultura foram incubadas por períodos de 24h e 5 dias. Para uma análise fidedigna da ação do BZ nas células aderentes e não aderentes foi necessário a criação dos controles: células (C), células e tripomastigotas (C+T) e células e o BZ (C+BZ). Após o cultivo, foram coletados os sobrenadantes das culturas, para avaliação da produção de quimiocinas (CCL2, CXL9, CXL10, CCL5 e CXCL8) por CBA (Cytometric Bead Array). Posteriormente foi realizada a imunofenotipagem, avaliando a expressão dos receptores CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5, em linfócitos T CD3^+ e monócitos CD14^+ . Os resultados obtidos na avaliação dos linfócitos mostraram que o receptor CXCR5 esteve aumentado na condição C+T+BZ; e os receptores CCR4 e CCR1 estavam diminuídos nessa mesma condição. Nos monócitos observamos uma diminuição de CCR4 e um aumento do CCR5 nas mesmas condições. Com relação a dosagem de quimiocinas no sobrenadante, foi evidenciado que CCL2 e CXCL8 apresentaram uma diminuição na condição C+T+BZ. Assim podemos concluir que devido ao caráter inflamatório modulado, que o BZ conduziu, podemos afirmar que o fármaco demonstrou benefícios relevantes na expressão de receptores e na produção de quimiocinas.

Palavras-Chave: Doença de Chagas, Terapêutica, Quimiocinas, Receptores de quimiocinas.

NASCIMENTO, Amanda Vasconcelos. **Evaluation of chemokines and their receptors expression in patient mononuclear patients of Chagas disease undergoing in vitro infection with Trypanosoma cruzi and treatment with benznidazole.** 2015. Dissertation (academic Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Currently Brazil has 3 million individuals with Chagas cardiomyopathy. However, etiological treatment with the drug benznidazole (BZ) in the chronic phase of the disease is not yet elucidated. It is believed that the BZ recommendation at this stage, can prevent or delay the clinical progression of cardiomyopathy in Chagas disease (CD). Thus the aim of the study is to evaluate the production of chemokines and their receptors expression in peripheral blood mononuclear cells - PBMCs (chronic carriers of Chagas disease) undergoing in vitro treatment with BZ, after infection with *T. cruzi*. A total of 11 patients in the chronic phase of the disease. Blood samples from these patients were collected to obtain PBMC, that were grown in culture plates at a concentration of 10⁶ cells / ml per well. After the accession of adherent cells (mainly macrophages), non-adherent cells (mainly lymphocytes) were removed and trypomastigotes were added to the cultivation of adherent cells for infection. Subsequent incubation, the nonadherent cells were added back to the culture along with the drug Bz (1mg / ml), with one adherent cells co-infected with *T. cruzi* cultivation, nonadherent cells and BZ (C + T + BZ). The culture plates were incubated for periods of 24 hours and 5 days. For a reliable analysis of BZ action in the adherent and non-adherent cells was necessary to create the controls: cells (C), cells and trypomastigotes (C + T) and cells and the BZ (C + BZ). After culture, were collected culture supernatants, to evaluate the production of chemokines (CCL2, CXL9, CXL10, CCL5 and CXCL8) by CBA (Cytometric Bead Array). Subsequently immunophenotyping was performed by evaluating the expression of CCR3 receptor, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CCR5 and CXCR2, on CD3 + T cells and CD14 + monocytes. The results of the evaluation showed that lymphocyte receptor CXCR5 was increased in T + C + BZ condition; and CCR4 and CCR1 receptors were decreased in the same condition. Observed a reduction in monocytes CCR4 and CCR5 increased under the same conditions. Regarding the dosage of chemokines in the supernatant, it was demonstrated that CCL2 and CXCL8 showed a decrease in condition C + T + BZ. Thus we can conclude that because of the inflammatory nature modulated, the BZ led, we can say that the drug demonstrated benefits relevant to the expression of receptors and production of chemokines.

Keywords: Chagas Disease, Therapeutic, Chemokines and Chemokine receptors

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCA	Quimiocina atraente de célula B
BZ	Benzonidazol
CBA	Ensaio de citometria por esferas
CD4	<i>Cluster Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster Differentiation 8</i>
CD14	<i>Cluster Differentiation 14</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DIG	Forma Digestiva
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENA-78	Atraente 78 de neutrófilo derivado de célula epitelial
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELC	Quimiocina ligadora do vírus <i>Epstein-Bar</i>
ELISA	Método imunoenzimático
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FC	Forma Cardíaca
GCP-2	Proteína quimotática de granulócitos
GRO	Oncogene relacionado ao crescimento
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
I-TAC	Quimioatraente de célula T α indutível por interferon
IP-10	Proteína 10 indutível por interferon gama
IFI	Imunoflorescência Indireta
IND	Forma Indeterminada
IFN- γ	Interferon gama
IL-8	Interleucina 8
LARC	Quimiocina do fígado
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MIG	Monocina indutível por interferon gama
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos
Min	Min
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos

NAP-2	Peptídeo 2 que ativa neutrófilo
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PBS	Salina tamponada com fosfato
QBC	Quantitativo da camada Leucocitária
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SDF	Fator derivado de células estromais
SLC	Quimiocina linfóide secundária
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
UPE	Universidade de Pernambuco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Número estimado de imigrantes infectados pelo <i>T.cruzi</i> vivendo em países não endêmicos.	13
Figura 2- Evolução clínica da doença de Chagas humana.	15
Figura 3- Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes. Representa a ação de algumas quimiocinas e receptores descritos em humanos.	19
Figura 4- Esquema do co-cultivo	35
Quadro 1- Anticorpos de superfície utilizados na Imunofenotipagem	36
Figura 5- Comparação dos níveis de expressão das moléculas de superfície CD3 ⁺ e CD14 ⁺ em PBMC, células aderentes e não aderentes nos diferentes tempos de agitação.	40
Figura 6- Níveis das quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, presentes no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes, células não aderentes, tripomastigotas e o Benzonidazol nas doses ótima (1 µg/ml) e Sub-ótima (0,5 µg/ml)	41
Figura 7- Avaliação da concentração do Bz através da detecção da produção das citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes e não aderentes, tripomastigotas e adição do Bz nas doses ótima e sub-ótima.	41
Figura 8- Comparação dos níveis das quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, nos tempos de 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias, presentes no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes, células não aderentes, tripomastigotas e o Benzonidazol na dose ótima (1 µg/ml).	42
Figura 9 - Avaliação dos tempos de cultivo <i>versus</i> resposta através da detecção da produção das citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes e não aderentes, tripomastigotas e adição do Bz.	43
Figura 10- Expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5, em linfócitos T CD3 ⁺ presentes no co-cultivo de células dos portadores crônicos da DC, expostas ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou tratadas com o benzonidazol.	45

Figura 11 - Expressão dos Receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5, em Monócitos CD14⁺ no co-cultivo de células dos portadores crônicos da DC, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com o benzonidazol. 47

Figura 12- Detecção da produção de quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, utilizando a técnica de CBA, presentes no co-cultivo de células dos portadores crônicos da DC, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com o benzonidazol. 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	13
2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da doença de Chagas.	13
2.2 Imunopatogênese da Doença de Chagas.....	16
2.3 Quimiocinas e seus receptores	18
2.3.1 Quimiocinas e seus receptores na doença de Chagas.	20
2.4 Tratamento Etiológico da Doença de Chagas Crônica	21
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Geral	26
4.2 Específicos	26
5 METODOLOGIA	27
5.1 Cultivo das células Vero para manutenção de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
5.1.1 Repique das Células Vero.....	27
5.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
5.3 Seleção dos Pacientes.....	28
5.4 Coleta de sangue.....	29
5.5 Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
5.6 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC).....	30
5.7 Otimização dos protocolos para realização do cultivo celular	30
5.7.1 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura.....	31
5.7.2 Otimização do método de retirada das células aderentes.....	32
5.7.3 Otimização da cinética de tempo versus resposta e dose versus resposta	33
5.8 Co-cultivo das células mononucleares do sangue periférico(PBMC) e o <i>Trypanosoma cruzi</i> e adição de tratamento com benzonidazol.....	34
5.9 Avaliação dos receptores de quimiocinas presentes em linfócitos e monócitos	35
5.10 Coleta do sobrenadante de cultura para dosagem quimiocinas	36
5.11 Detecção dos níveis de quimiocinas no sobrenadante de cultura de PBMC por <i>CytometricBeadArray</i> (CBA).....	37

5.12 Citometro de Fluxo	37
5.12.1 <i>Aquisição e análise de linfócitos e Monócitos</i>	38
5.12.2 <i>Aquisição e análise das quimiocinas mensuradas por CBA</i>	38
5.13 Análises estatísticas	38
5.14 Aspectos éticos	38
6 RESULTADOS	39
6.1.1 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura	39
6.1.2 Otimização da cinética de tempo versus resposta e dose versus resposta	40
6.2 Avaliação dos receptores de quimiocinas presentes em linfócitos e monócitos	43
6.2.1 <i>Avaliação da Expressão dos Receptores em Linfócitos</i>	43
6.2.2 <i>Avaliação dos Receptores em Monócitos</i>	46
6.3 Detecção dos níveis de quimiocinas no sobrenadante do co-cultivo	48
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A: TCLE do portador da Doença de Chagas	69
APÊNDICE B:TCLE do não portador da Doença de Chagas	71
ANEXO A: Parecer do Comité de Ética	73

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é um grave problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas no mundo e apresenta caráter endêmico na América do Sul. Atualmente, novos casos têm sido relatados na América do Norte e em outros continentes, devido ao intenso fluxo migratório (RASSI et al., 2010). A transmissão natural da doença ocorre através do contato da pele lesionada com tripomastigotas metacíclicos presentes em excretas de insetos vetores contaminados, mas outras formas de transmissão também são possíveis, destacando a via oral pela ingestão de alimentos contaminados e a transfusional, que representam os principais meios de transmissão nos dias atuais (CONSENSO, 2010; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991).

Atualmente a droga utilizada para o tratamento da doença de Chagas no Brasil é o Benzonidazol (BZ) (MARIN-NETO et al., 2008). Alguns estudos realizados na América do Sul demonstraram a eficácia do BZ em pacientes nas fases aguda e crônica da doença, no entanto também foi relatado importantes efeitos colaterais causados pelo fármaco, como astenia, hepatoesplenomegalia e leucopenia (CANÇADO, 1985; CANÇADO et al., 1969; CERISOLA et al., 1972). Por outro lado, apesar de o índice de cura parasitológica estar em torno de 60% nos pacientes que apresentam a fase aguda, o desempenho do BZ é considerado pouco expressivo na fase crônica (COURA et al., 1997). No entanto, acredita-se que a recomendação do BZ na fase crônica, pode trazer benefícios no sentido de prevenir ou retardar a evolução clínica da cardiomiopatia na doença de Chagas (BERN et al., 2010). Assim, o benefício da medicação aos portadores crônicos ainda demonstra controvérsias.

Embora não se saiba exatamente seu mecanismo de ação frente ao *T. cruzi*, o BZ parece agir por meio de radicais nitrogenados produzidos por nitrorredutases humana. Na presença de oxigênio, estes radicais são convertidos em radicais livres. A falta de atividade de desintoxicação contra esses radicais pelo *T. cruzi* torna o parasita mais sensível do que as células humanas (CASTRO et al., 2006; MAYA et al., 2007). Apesar de seu efeito tóxico, poucos estudos têm demonstrado os eventos imunológicos decorrentes da administração do BZ e se esses contribuem para a eliminação do parasita no hospedeiro (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000; CALDAS et al., 2014; SATHER-AVELAR et al., 2006).

Muitos trabalhos são realizados estudando a resposta imune do hospedeiro frente ao parasita (LORENA et al., 2010; MELO et al., 2012; VITELLI-AVELAR et al., 2008;) mas poucos trabalhos são realizados relacionando a resposta imune do hospedeiro na presença do BZ. Está claro a influência das células da resposta imune do hospedeiro na infecção pelo *T.cruzi* e o papel desta resposta, sobretudo da produção de citocinas na imunopatogênese das formas clínicas crônicas da doença. Mas, há poucos relatos na literatura sobre o papel de mediadores quimiotáticos na doença crônica. As quimiocinas são mediadores inflamatórios com atividade quimioatraente, necessárias para atrair leucócitos para o local da inflamação, direcionando as células apresentadoras de antígenos (APCs) maduras para vasos linfáticos, aproximando as células T de APCs dentro de um órgão linfoide drenante (SALLUSTO et al., 2000). Assim, levando em consideração os estudos de patogênese da doença de Chagas, acreditamos que as quimiocinas atuem de maneira significativa nos mecanismos celulares contra o parasita na presença de BZ, durante o tratamento etiológico em humanos.

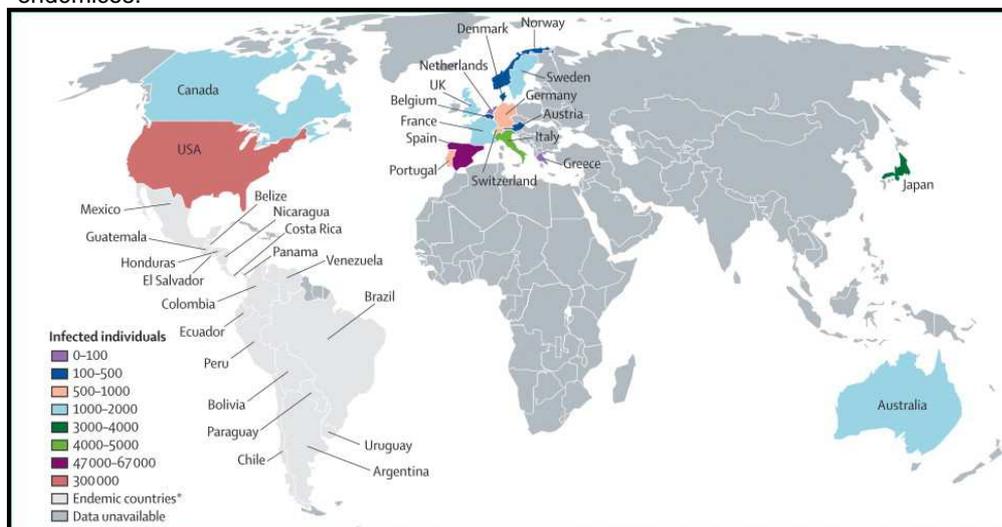
Desta forma, conhecer os fenômenos decorrentes da interação de formas tripomastigotas do *T.cruzi* com células da resposta imune de pacientes portadores da doença de Chagas, associada com a adição *in vitro* do BZ, é de grande importância para o entendimento dos eventos decorrentes do tratamento etiológico com esse fármaco *in vivo*.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é um sério problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas na América Central, na América do Sul e atualmente vem aumentando na América do Norte e em outros continentes, devido ao intenso fluxo migratório (Figura 1) (RASSI et al., 2010). Estima-se que 12-14 milhões de pessoas estão infectadas com o *T.cruzi* em todo mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica, e 75-90 milhões de pessoas estão expostos à infecção (COURA et. al., 2009). A estimativa de infectados no Brasil é de aproximadamente três milhões de pessoas (PETHERICK et al., 2010). A média nacional de internações pela doença de Chagas apresenta-se em torno de 0,99 por 100 mil habitantes no período de 1995 a 2008. No estado de Pernambuco, a média para o mesmo período foi de 0,39 por 100 mil habitantes, sendo maiores as taxas no interior do estado (BRAZ et al., 2011).

Figura 1- Número estimado de imigrantes infectados pelo *T.cruzi* vivendo em países não endêmicos.



Fonte: Rassi et al. (2010)

A transmissão natural da doença ocorre através do contato da pele lesionada com as excretas de insetos vetores contaminados, que são hematófagos, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, o vetor mais importante da doença

(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002). Outras vias como transplantes de órgãos ou transfusão sanguínea e por via congênita correspondem no mundo de 5 a 20% e 0,5 a 8% da transmissão do parasita, respectivamente (DIAS, 2000). Contudo, o controle da sua transmissão pelo combate ao vetor *T. infestans*, e pela triagem de doadores infectados em bancos de sangue, a enfermidade vem sofrendo uma relevante diminuição em seu número de casos (DUARTE et al., 2003; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007, OSTERMAYER et al., 2011).

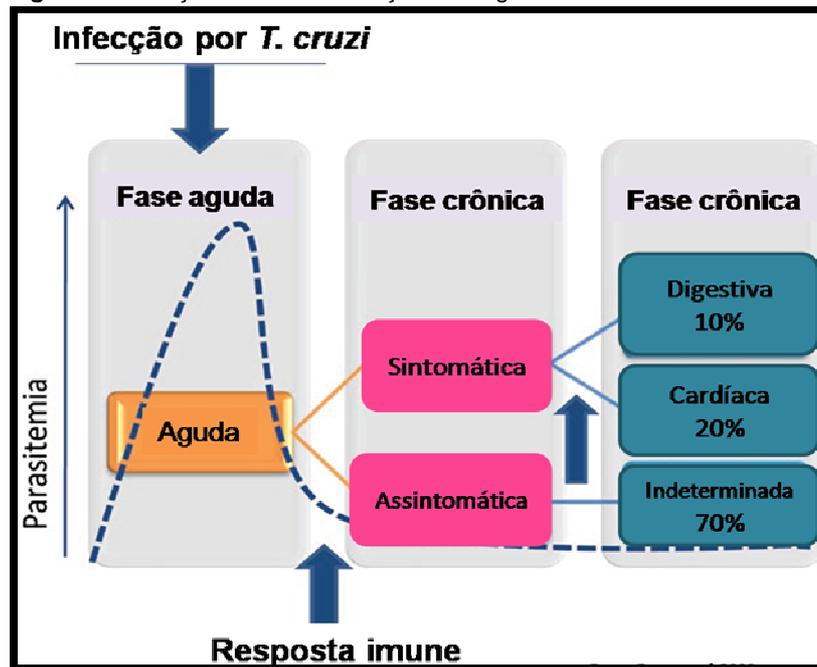
No Brasil, surtos por transmissão oral têm sido relatados. Quase sempre esses surtos ocorrem devido à presença de vetores e/ou de reservatórios infectados nas imediações onde eles ocorrem (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991). No período de 2000 a meados de 2010, foram registrados 1093 casos de Doença de Chagas aguda, sendo, 71% (776/1093) por transmissão oral e 6% por transmissão vetorial (70/1093) (CONSENSO, 2010). A transmissão por via oral pode vir a se tornar um grande problema de saúde pública, considerando que os casos não são devidamente notificados para que as precauções necessárias sejam tomadas (MARTINS et al., 2011).

Clinicamente a doença é caracterizada por uma fase aguda com subsequente fase crônica. A fase aguda, que pode durar de um a três meses após a infecção, é caracterizada por uma intensa parasitemia. Esta fase tem início após o período de incubação que varia de quatro a dez dias quando a transmissão é vetorial (DUTRA et al. 2009). Geralmente, quando sintomática, o indivíduo pode apresentar febre, mal-estar, anorexia e cefaléia. Os sinais de porta de entrada do parasita (sinal de Romaña e chagoma de inoculação) e manifestações sistêmicas (hepatomegalia, esplenomegalia, edema, alterações nervosas, comprometimento cardíaco) também podem estar presentes (HUGGINS, 1996). Porém, na maioria dos indivíduos, a fase aguda é imperceptível devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas.

A fase crônica da doença inicia-se cerca de dois a quatro meses após o final da fase aguda. Este período é marcado pela escassez de parasitas no sangue e pelos elevados níveis de anticorpos da classe IgG. Estudos realizados em zona endêmica mostram que cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem, nesta fase, a cardiomiopatia chagásica, representando a maior causa de falência congestiva do coração na América Latina (PETHERICK et al., 2010). Outros 10% dos infectados desenvolvem a forma digestiva, que é caracterizada por lesões teciduais de intensidade variável na rede neuronal mioentérica, o que origina

diversos graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e/ou do cólon. No entanto, o indivíduo portador da doença pode permanecer por um longo período de latência clínica, denominado de forma indeterminada (IND) caracterizada pela ausência de manifestações clínicas significativas, como as eletrocardiográficas ou radiológicas. Estima-se que cerca de 70% dos indivíduos infectados encontrem-se no estado indeterminado da doença (Figura 2) (DUTRA et al., 2009).

Figura 2- Evolução clínica da doença de Chagas humana.



Fonte: Adaptado de Dutra et al.(2009)

Nota: Após a infecção por *T.cruzi*, os indivíduos desenvolvem a fase aguda, que dura entre 2-4 meses e é caracterizada por intensa parasitemia. Na fase crônica, os pacientes apresentam diminuição acentuada da parasitemia, como um resultado da resposta imune do hospedeiro. A maioria dos pacientes da fase crônica é assintomática, sendo classificada como portador da forma indeterminada. No entanto, uma percentagem significativa dos pacientes torna-se sintomáticos e podem desenvolver a patologia associada a tecidos cardíacos ou digestivos, que podem conduzir à morte.

O diagnóstico etiológico na fase aguda da infecção pode ser facilmente realizado utilizando-se métodos parasitológicos convencionais diretos (esfregaços, gota espessa, exame a fresco). Caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração, tais como micro-hematócrito, teste de Strout ou QBC (*Quantitative Buffy Coat*). Também podem ser utilizados os métodos indiretos como o xenodiagnóstico e hemocultura, contudo, estes testes possuem uma alta

complexidade em sua realização e maior tempo de execução. Já na fase crônica da doença, devido a uma baixa parasitemia o diagnóstico laboratorial é realizado preferencialmente empregando métodos sorológicos. Utiliza-se um teste de elevada sensibilidade em associação com outro de alta especificidade (ELISA com antígeno total ou imunofluorescência indireta-IFI) (CAMARGO, 1966; CONSENSO, 2005; CERISOLA, 1962; CHIARI; BRENER, 1966; STROUT, 1962; VOLLER et al., 1975).

2.2 Imunopatogênese da Doença de Chagas

Entre as diferentes características relacionadas à doença de Chagas, a evolução clínica de indivíduos portadores da forma IND em direção às demais formas clínicas sintomáticas, representa um dos mais intrigantes processos imunológicos. Ainda não se está elucidado o mecanismo pelo qual indivíduos portadores assintomáticos, após 10 a 20 anos, passam a apresentar manifestações relacionadas ao coração e/ou ao sistema digestivo (GUTIERREZ et al., 2009).

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

Na infecção pelo *T. cruzi* em mamíferos, imediatamente após o parasitismo, é acionado um recrutamento de leucócitos para o tecido. A migração de células do sistema imunológico é dependente da produção local de citocinas e quimiocinas, bem como o aumento na regulação da expressão dos seus receptores e moléculas de adesão (LANNES-VIEIRA et al., 2003; LAUCELLA et al., 1996;). A resistência do hospedeiro durante a doença de Chagas experimental é dependente tanto da imunidade inata quanto da adquirida, requerendo a combinação dos efeitos de diversos tipos de células, incluindo as células NK (*Natural Killer*) (ROTTENBERG et al., 1988), células T CD8⁺ (BIXBY; TARLETON, 2008) e CD4⁺ (NICKELL et al., 1987), bem como anticorpos produzidos por células B (MARTINS et al., 2004).

Citocinas e quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune (SHER et al., 1992). A presença desses mediadores no microambiente de células T e na apresentação de antígeno, determina o tipo de resposta inflamatória que irá ser produzida no curso da infecção (D'AMBROSIO; SINIGAGLIA, 2000).

A ativação de linfócitos T e B tem sido demonstrada nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T.cruzi* (MINOPRIO et al., 1988). Vários estudos têm demonstrado que as células T CD8⁺ são uma população celular predominante no tecido cardíaco de pacientes portadores da doença de Chagas (CUNHA-NETO; KALIL, 2001). Além da atividade citolítica, essas células também contribuem para as respostas imunes ao *T.cruzi* e imunopatogênese (GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010). Estudos utilizando modelo experimental para a doença de Chagas, observaram que as células T CD8⁺, presentes no tecido cardíaco de camundongos infectados, expressava o receptor de quimiocinas CCR5 (MACHADO et al., 2005; MARINO et al., 2004), em que este receptor provavelmente está relacionado com os danos do miocárdio nos indivíduos infectados com o *T.cruzi* (BRENER et al., 1997; REIS et al., 1993).

Tem sido demonstrado que as citocinas IFN- γ e TNF- α estão envolvidas na resposta protetora ao *T.cruzi* (ALIBERTI et al., 2001). A citocina IFN- γ é sintetizada logo após a infecção, principalmente pelas células NK (ALIBERTI et al., 1996), bem como pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ (MARTINS et al., 2004). Camundongos infectados com a cepa Y de *T.cruzi*, apresentam produção elevada de IFN- γ , que estaria relacionada com a produção de CCL5, CXCL9 e CXCL10 durante a fase aguda e crônica da infecção. Além disso, uma forte relação entre a migração de leucócitos para o coração e a expressão dessas quimiocinas induzidas por IFN- γ (ALIBERTI et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2001; TALVANI et al., 2000).

Apesar de já ser descrito na literatura o papel das células do sistema imune e a produção de mediadores solúveis na imunopatogênese da doença de Chagas, e de muitos conhecimentos terem sido adquiridos em relação à resposta imune de portadores da patologia, importantes aspectos ainda não foram totalmente esclarecidos. É possível que mecanismos imunológicos envolvidos na interação conjunta de células do sistema imune, além da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro, ocasionem uma patologia altamente complexa, impondo dificuldades para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias eficientes (DUTRA et al., 2009).

2.3 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas ou citocinas quimiotáticas tem a função de direcionar a migração leucocitária, regular diapedese dos leucócitos do sangue para os tecidos e está envolvido na proliferação e na diferenciação dos perfis de linfócitos T (GAO et al., 1997; TAUB et al., 1993), e na resistência à infecção (TEIXEIRA et al., 2002). As quimiocinas fazem parte de uma superfamília de pequenas moléculas de peso molecular de 8-12 kDa, estruturalmente homólogas. A sua ação sobre os mais diferentes tipos celulares se dá através dos receptores de quimiocinas, que pertencem à família de receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, e são ligados a proteína na sua porção carboxiterminal (JUREMALM; NILSSON, 2005; ROLLINGS, 1997)

Inicialmente, as quimiocinas foram descobertas por causa de sua relação com as respostas inflamatórias, no entanto, com seqüenciamento genômico foram adicionados novos membros com funções adicionais. Atualmente existem mais de 40 quimiocinas e aproximadamente 20 receptores de quimiocinas descritos em humanos (ABBAS, 2011; MACKAY, 2001). A maioria das quimiocinas tem quatro cisteínas características, em posições altamente conservadas e, dependendo da posição das duas primeiras cisteínas próximas ao domínio amino-terminal, elas são classificadas nas subfamílias CXC, CC, C e CX3C (ROSSI; ZLOTNIK, 2000, LLOYD; BROWN, 2006; HALLGREN; GURISH, 2011).

Como muitas quimiocinas têm a capacidade de se ligar a mais de um receptor e muitos receptores se ligam a mais de uma quimiocina, é difícil saber o papel individual de cada delas. Assim, análises mais profundas das interações das quimiocinas e seus receptores mostraram que elas podem ser classificadas em duas classes: constitutivas ou induzidas. As constitutivas ou “homeostáticas” estão relacionadas com organização do tecido linfóide e no tráfego basal de leucócitos. Exemplos desse grupo incluem CXCL13, CCL21 e CCL19 (SALLUSTO et al., 2000). Por outro lado, as quimiocinas induzidas ou “inflamatórias” são induzidas em resposta à infecção e recrutam células efetoras, incluindo monócitos, granulócitos e células T efetoras para o local da entrada do patógeno. Exemplos clássicos incluem CXCL8, CCL5, CCL11, CCL4, CCL2 e CXCL10 (LLOYD; BROWN, 2006; MOSER; LOETSCHER, 2001) (Figura 3).

Figura 3- Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes. Representa a ação de algumas quimiocinas e receptores descritos em humanos.

Receptores de Quimiocinas	Quimiocinas											Tipos celulares onde são expressos																		
	MIP-1 α	MIP-1 β	RANTES	IP-10, Mig, I-TAC	MCP-1	MCP-2,3	MCP-4	Eotaxin, Eotaxin-2	LARC	IL-8, GCP-2	GRO, ENA-78, NAP-2	MDC, TARC	I-309	ELC, SLC	SDF-1 α , 1 β	BCA-1	Monócitos	Células dendríticas imaturas	Células dendríticas maduras	Células B	Linfócitos Th2	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos Th1	Monócitos	Neutrófilos	Células T naive	Linfócitos T memória central	Linfócitos T memória efetora	
CCR1	■																■	■	■											
CCR2																		■	■	■										
CCR3			■																											
CCR4																														
CCR5	■	■	■										■					■	■	■										
CCR6																		■												
CCR7																														
CCR8																														
CXCR1																														
CXCR2																														
CXCR3				■																										
CXCR4																														
CXCR5																■														

Fonte: Sallusto et al.(1998 apud BARBOSA, 2012)

Legenda: Os quadrados em azul representam a associação entre a quimiocina e seu respectivo receptor; os quadrados em vermelho representam a expressão do receptor em determinados tipos celulares; os quadrados vermelhos parcialmente preenchidos indicam a expressão do receptor em um determinado subtipo celular. Os nomes das quimiocinas são muitas vezes baseados no modo pelo qual elas foram descobertas. São denominadas: MIP (CCL3 e CCL4), proteína inflamatória de macrófagos; RANTES(CCL5), regulada pela ativação de célula T normal expressa e secretada; IP-10 (CXCL10), proteína 10 indutível pelo IFN- γ ; Mig (CXCL9), monocina indutível por IFN- γ ; I-TAC (CXCL11), quimioatraente de célula T α indutível por IFN; MCP(CCL2 e CCL8), proteína quimioatraente de monócitos; LARC, quimiocina do fígado e regulada; GCP-2 (CXCL16), proteína quimiotática de granulócitos; GRO (CXCL1), oncogene relacionado ao crescimento; ENA-78 (CXCL5), atraente 78 de neutrófilo derivado de célula epitelial; NAP-2 (CXCL7), peptídeo 2 que ativa neutrófilo; MDC (CCL22), quimiocina derivada de macrófago; TARC (CCL17), quimiocina regulada pelo timo e ativação; ELC (CCL19), quimiocina ligadora do vírus Epstein-Barr; SLC (CCL21), quimiocina linfóide secundária; SDF, fator derivado de células estromais; BCA, quimiocina atraente de célula B.

Devido aos efeitos das quimiocinas sobre a migração, proliferação e ativação dos leucócitos, as quimiocinas provavelmente desempenham um papel importante na imunopatogênese do *T.cruzi* (TEIXEIRA et al., 2002). Moléculas derivadas de *T.cruzi*, incluindo o DNA (ALMEIDA et al., 2001), ou até mesmo a infecção pelo parasita, tem a capacidade estimular a síntese de citocinas e quimiocinas, por distintos tipos celulares. Quando os macrófagos, células importantes na relação parasita-hospedeiro, estão infectados em cultura, produzem e secretam vários tipos de quimiocinas (ALIBERTI et al., 1999; TALVANI et al., 2000). As células cardíacas, um alvo importante da infecção, também sintetizam grandes quantidades de quimiocinas quando infectadas com este parasita (GOMES et al., 2005).

2.3.1 Quimiocinas e seus receptores na doença de Chagas.

No decorrer dos mais de 100 anos da descoberta da doença de Chagas, diversos trabalhos são desenvolvidos utilizando as citocinas como marcadores biológico, com objetivo de tentar elucidar a imunopatogênese da patologia chagásica (LORENA et al. 2010; MELO et al., 2012; VITTELI-AVELAR et al., 2008). No entanto, recentemente, o papel das quimiocinas vem sendo objeto de intenso estudo na descoberta dos mecanismos imunológicos envolvidos com a doença (FILIPPATOS et al., 2003; RODRIGUES et al., 2012).

Na infecção experimental pelo *T.cruzi*, na fase aguda da doença, foi evidenciada uma expressão significativa das quimiocinas: CXCL1, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 no tecido cardíaco, e foi evidenciado que das 7 quimiocinas estudadas, 5 (CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5) foram encontradas em locais infiltrado de células T no tecido cardíaco, silmutaneamente em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, indicando que elas estariam envolvidas com a migração dos linfócitos T para o tecido do coração (MACHADO et. al., 2005). As quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CCL5 foram produzidas durante todo o curso da infecção, incluindo a fase crônica, mesmo quando o parasitismo no tecido era escasso (TALVANI et al., 2000), e foram detectados níveis elevados desses mediadores concomitante com um aumento da infiltração de linfócitos T CD8⁺ ativados. Dos Santos et al. (2001) também observaram que a expressão de quimiocinas como CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 no miocárdio de camundongos infectados com o *T.cruzi*, estava correlacionada com a presença de linfócitos T CD8⁺. A expressão dessas quimiocinas pode contribuir para o intenso recrutamento celular e para o estabelecimento e manutenção da miocardite induzida pela infecção com o *T.cruzi* (SANTOS et. al., 2001).

Como as quimiocinas exercem uma função importante no recrutamento de células, incluindo células T CD8⁺, o bloqueio dos receptores de quimiocinas pode representar um possível alvo, para o tratamento da inflamação exarcebada da patologia (MACHADO et al., 2013). Neste sentido, vários estudos demonstraram a importância do receptor de quimocina CCR5, na sua atuação no controle da migração de leucócitos e replicação do parasita durante a fase aguda da infecção experimental (HARDISON et al., 2006; MARINO et al., 2004).

Utilizando PCR quantitativa, Cunha-Neto et al. (2005) observaram um aumento significativo da expressão de receptores de quimiocinas CCR5, CCR7 e CXCR3 e os seus ligantes, bem como a quimiocina IL-18 nos portadores da miocardite chagásica, em comparação com amostras de pacientes com cardiomiopatia não- inflamatória. Foi evidenciada uma correlação entre a expressão no miocárdio de quimiocinas de perfil Th1 e com a intensidade da miocardite, corroborando com hipótese de que tais quimiocinas podem contribuir para a migração e acumulação das células inflamatórias em pacientes com a cardiomiopatia chagásica (MACHADO et al., 2013).

De acordo com Machado et al. 2013, utilizando ensaios de imunofluorescência confocal, as células mononucleares apresentaram a expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5 e CXCL9 no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica. Estes resultados corroboram com a hipótese de que as células inflamatórias CCR5⁺ CXCR3⁺ CCR7⁺ com perfil Th1, são ativadas anteriormente, na periferia, através do encontro com o *T.cruzi* (GOMES et al., 2005).

Uma hipótese que surge a partir destes estudos é que as quimiocinas produzidas após a infecção de células-alvo pode desempenhar um papel durante a resposta inata, de proteção contra este parasita e também dirige o influxo de leucócitos (MACHADO et al., 2013). Apesar de diversos estudos experimentais demonstrarem que a interação dos antígenos de *T.cruzi* e do próprio, participarem na modulação da produção de quimiocinas durante a infecção, os papéis funcionais de determinadas quimiocinas e seus receptores na resistência do hospedeiro à infecção e na patogênese da doença de Chagas ainda não está elucidada.

2.4 Tratamento Etiológico da Doença de Chagas Crônica

O estudo do histórico das substâncias quimioterápicas da doença de Chagas pode ser dividida em três fases principais. A primeira compreende o estágio inicial da descoberta da doença, de 1909 até 1935, e é marcada pela morte de Carlos Chagas (em novembro de 1934) e pelo lançamento do “Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas” em 1935. A segunda fase, no período de 1936 a 1960, corresponde à avaliação biológica de diversas substâncias químicas, extratos e misturas de componentes utilizados em outras patologias. A terceira fase, a partir de

1961, é caracterizada por estudos que demonstraram através de modelos experimentais de infecção com *T.cruzi* em camundongos, a eficácia de alguns compostos, entre eles, o nifurtimox e o benzonidazol (BRENER 1961; BRENER; ANDRADE 1979; DE CASTRO 1993), principais drogas para o tratamento da doença de Chagas.

Até o fim da primeira fase apenas dois trabalhos haviam sido publicados sobre a terapêutica experimental da doença de Chagas. Em ambos, os resultados foram insatisfatórios. Na segunda fase, foram descritos resultados de mais de 20 quimioterápicos e 30 antibióticos, dentre os quais se destacam algumas substâncias que tiveram efeito supressivo sobre a infecção causada pelo *T.cruzi* (BRENER; CANÇADO 1968). Entre os agentes empregados nesta fase, destaca-se o antisséptico violeta de genciana, que ainda hoje é utilizado como agente profilático em bancos de sangue (DESSOY et al., 2009). A partir da década de 1960, com a demonstração de que o nifurtimox foi eficaz no tratamento de camundongos cronicamente infectados, teve início uma nova era na terapêutica da doença de Chagas (CANÇADO et al., 1964).

Na América Latina, temos a disponibilidade de duas drogas - o Nifurtimox e Benzonidazol – que são os fármacos de melhores desempenhos nos países endêmicos (NEGRETTE et al., 2008), no entanto o Benzonidazol (BZ) é a única terapia atualmente disponível para o tratamento etiológico, que possui ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigota intracelulares, sendo que sua eficácia varia em relação ao tempo e dose do medicamento, bem como a fase da doença (MARIN-NETTO et al., 2008).

Em estudos realizados no Brasil e em outros países do continente Sul-Americano (CANÇADO, 1985; CANÇADO et al., 1969, 1976, 1975; CERISOLA et al., 1972) sobre a tolerância e a eficácia desses dois antiparasitários em pacientes nas fases aguda e crônica da doença, tem sido demonstrado importantes efeitos colaterais, sendo o índice de cura parasitológica em torno de 60% nos pacientes que apresentam a fase aguda, mas, pouco expressivo na fase crônica (COURA et al., 1997).

Estudos experimentais em camundongos, na fase crônica da doença, demonstraram que a terapia com BZ provocou uma diminuição de alterações eletrocardiográficas e também diminuiu a fibrose tecidual do coração, quando comparado ao grupo controle (BUSTAMANTE et al., 2008; GARCIA et al., 2005).

Viotti et al. (2006) em ensaio terapêutico controlado em pacientes portadores da doença de Chagas, monitorados aproximadamente por oito anos, demonstrou que o tratamento específico com BZ diminuiu o aparecimento de novas lesões eletrocardiográficas no grupo tratado em relação ao grupo controle, assim contribuindo para diminuição da frequência de pacientes com danos cardíacos mais graves. Outro estudo demonstrou que após o tratamento com BZ, houve uma negativação de 88,8% das hemoculturas durante um período de dois anos, em pacientes com cardiopatia chagásica congestiva, indicando seu efeito tripanocida nessa fase (CASTRO et al., 2006). O estudo de Bern et al. (2010) observou que em pacientes crônicos entre 18 e 50 anos com manifestações clínicas, brandas, a utilização da medicação preveniu ou retardou a evolução da doença de Chagas para as formas crônicas mais graves.

Alguns estudos avaliaram a resposta imune do paciente portador da Doença de Chagas, quando o BZ é administrado. No estudo de Bahia-Oliveira et al (2000) foi relatado que indivíduos considerados curados após o tratamento com BZ produziam altos níveis de IFN- γ quando comparados aos demais grupos de indivíduos avaliados. Por outro lado, o tratamento com BZ direcionou uma resposta imune do perfil Th1, sofrendo modulação da citocina anti-inflamatória IL-10, sendo elemento chave para controlar o dano tecidual deletério que eventualmente pode ocorrer devido à resposta pró-inflamatória mediada pelo IFN- γ observada durante o tratamento com o fármaco (SATHLER-AVELAR et al., 2006).

Em contrapartida, Laucella et al. (2009) trouxeram resultados discordantes de Bahia-Oliveira et al. (2000), onde verificaram que pacientes submetidos ao tratamento apresentaram declínio de IFN- γ após 12 meses do tratamento. Os autores acreditam na hipótese que esta mudança na resposta imune induzida pelo BZ esteja relacionada com uma mudança de fenótipo de linfócitos T efetores para células de memória, sugerindo que a utilização do BZ na fase crônica seria importante na resposta imune específica ao parasita e que esta poderia ser considerada um indicativo de eficácia de tratamento e cura. Com objetivo de avaliar se clinicamente é viável tratar o paciente na fase crônica da doença, foi criado em 2004 o Projeto BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) (MARIN-NETO et al., 2009).

O BENEFIT é um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e ensaio clínico controlado, em que metade dos pacientes recebem o placebo e a outra metade o BZ. O estudo possui uma estimativa de 3.000 pacientes com cardiomiopatia chagásica com a participação de laboratórios do Brasil, Argentina, Bolívia, Colômbia e El Salvador. O projeto tem como objetivo primário reduzir os eventos de morte causados por falência cardíaca. O objetivo secundário será avaliar se o BZ tem a capacidade de impedir a progressão da doença cardíaca para as formas mais graves da DC. Resultados concretos do projeto ainda não foram divulgados. Assim, ainda há pouco conhecimento sobre a influência que o BZ causa nos portadores da doença de Chagas crônica. Apesar do benefício da medicação por BZ aos portadores crônicos apresentar controvérsias, evidências sustentam a hipótese que o tratamento com BZ traz benefícios ao paciente cronicamente infectado.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta aproximadamente 3 milhões de indivíduos portadores de cardiopatia chagásica (PETHERICK et al. 2010). No entanto, o tratamento da doença de Chagas em pacientes crônicos ainda é controverso. Os nossos resultados podem auxiliar outros estudos, no intuito de comprovar a indicação do uso do BZ em pacientes crônicos.

Esperamos conhecer e descrever alguns mecanismos associados à presença do BZ, que possam estar relacionados à resposta imune de indivíduos cronicamente infectados e que tenham perfil para receber o tratamento. Além de contribuir através da identificação de possíveis estratégias futuras para diminuir a disseminação do parasita e progressão da doença sintomática, assim como trazer melhor entendimento sobre os principais mecanismos de persistência desenvolvidos pelo *T.cruzi*, bem como sobre o emprego desta droga como terapia antiparasitária na doença de Chagas crônica.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a produção de quimiocinas e a expressão de seus receptores em células mononucleares (de portadores crônicos da doença de Chagas) submetidas *in vitro* ao tratamento com benzonidazol após a infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*.

4.2 Específicos

- a) Mensurar a produção de quimiocinas (CCL5, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) no sobrenadante de cultura obtidas de PBMC tratadas com benzonidazol após a exposição a tripomastigotas vivos de *Trypanosoma cruzi*.

- b) Determinar a frequência de expressão dos receptores de quimiocinas (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5) em linfócitos T CD3⁺ e monócitos CD14⁺ obtidas de células mononucleares tratadas com benzonidazol após a exposição a tripomastigotas vivos de *Trypanosoma cruzi*.

5 METODOLOGIA

5.1 Cultivo das células Vero para manutenção de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Células Vero criopreservadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF, SigmaTM) a 10% (RPMI 1640 completo) e contendo DMSO a 10% foram descongeladas em banho-maria, ressuspensas em 5ml de RPMI 1640 (SigmaTM) completo e centrifugadas a 400 x g, a uma temperatura de 22° C, durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células ressuspensas em 5ml do meio RPMI 1640 (SigmaTM) completo. A suspensão celular foi depositada em garrafas de cultura contendo 5 ml de meio RPMI 1640 completo e incubadas (37° C / 5% CO₂) até confluência total das células.

5.1.1 Repique das Células Vero

Para a realização do repique das células Vero, inicialmente foi retirado e desprezado todo o meio da garrafa de cultura pequena (área de 115 cm² e volume máximo de 100 ml). Em seguida, as células foram lavadas adicionando 1 ml de tripsina para retirar o resíduo de SBF. Depois, foi adicionado mais 3ml de solução de tripsina/EDTA (solução salina tamponada contendo 2% de Tripsina – Fibco[®] e 0,2% de EDTA - SigmaTM), esperando cerca de 1-2 min, até ser observado uma camada esbranquiçada. Após 4 min a solução de tripsina/EDTA (solução salina tamponada contendo 2% de Tripsina – Fibco[®] e 0,2% de EDTA - SigmaTM) foi removida e a garrafa deixada na horizontal por 2 min na estufa a 37°C e 1 min realizando vigorosa batidas na sua lateral. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (SigmaTM) completo e depois transferidas para outras garrafas de cultivo contendo 5ml do meio RPMI 1640 completo e incubadas na estufa (37° C / 5% CO₂).

5.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas, da Cepa Y, criopreservadas (10^7 tripomastigotas/ml) foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, os tripomastigotas foram distribuídos em tubos Cônicos (15 ml) e 10 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto foi adicionado aos tubos para centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 22°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 5 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (2% SBF). A suspensão foi distribuída em garrafas de cultura contendo células VERO e incubada por 24 horas em estufa (37°C / 5% CO₂). Ao fim da incubação, o sobrenadante foi retirado para remoção dos parasitas que não infectaram as células. Foram adicionados mais 5ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e em seguida as culturas foram incubadas por 7 dias. Diariamente, as culturas foram observadas no microscópio invertido para verificação da multiplicação dos parasitas intracelulares. Após a ruptura celular, os tripomastigotas foram coletados para posteriores infecções das células Vero e das células aderentes (macrófagos), obtidos de pacientes portadores da Doença de Chagas Crônica.

5.3 Seleção dos Pacientes

Foram selecionados 11 portadores crônicos, sendo 5 da forma cardíaca B1 e 6 da A, em que esses grupos de pacientes foram o público alvo do tratamento na fase crônica. Desses pacientes selecionados foram 4 homens (60-67 anos) e 7 mulheres (33-71 anos). Os voluntários foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), da Universidade de Pernambuco (UPE). Atualmente, o ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos pacientes portadores da doença de Chagas.

Para a inclusão dos portadores da doença de Chagas no estudo, os mesmos preencheram 3 critérios: exames para avaliação clínica (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago), sorologia reagente para a infecção chagásica e não ter sido submetido ao tratamento etiológico. A avaliação dos

critérios de inclusão foi realizada em conjunto com médicos colaboradores deste projeto, e foram responsáveis pela caracterização dos pacientes nos estágios de desenvolvimento cardíaco A, B (B1 e B2), C e D, estabelecida pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Os pacientes incluídos no estudo foram classificados na diretriz como A e B1. Os pacientes classificados com a forma A não apresentam sintomas. No entanto os indivíduos com a forma B1 apresentam alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas não possuem disfunção ventricular. Além disso, eles podem ter alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades de contratilidade discretas), no entanto a função ventricular global é normal.

Todas as informações acerca dos aspectos clínicos dos pacientes (forma clínica apresentada e presença de co-morbidades) foram registradas no formulário de pesquisa específico, obtidas através dos prontuários dos pacientes e informadas pelos médicos responsáveis. Nesse formulário também foram registradas informações sociodemográficas do paciente (idade, gênero e município de residência e de origem).

5.4 Coleta de sangue

Foram coletados de cada indivíduo até 35 ml de sangue, pelo sistema à vácuo (Vacutainer®), em tubos contendo heparina sódica para obtenção de PBMC e utilização nos ensaios de cultivo celular. Além disso, foram coletados 5 mL de sangue em tubo seco para obtenção de soro para a confirmação da sorologia para infecção pelo *T. cruzi*. Após retração do coágulo, os tubos secos foram centrifugados (900 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente) e alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C.

5.5 Confirmação da sorologia para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica: um teste imunoenzimático, constituído de uma mistura de extratos totais do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III, Bioschile Ingenieria Genetica S.A), e um teste imunoenzimático que

utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Imuno- ELISA Chagas, Wama Diagnóstica).

Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentaram reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentaram reatividade (CONSENSO, 2005). Amostras que se mantiveram discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas como inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

5.6 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

O isolamento das PBMC foi realizado através de centrifugação do sangue em gradiente de densidade. O sangue coletado com heparina foi adicionado a tubos Cônicos de 50ml (BD™), seguido da adição da solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril (pH 7,2), sendo 15ml de sangue e 15ml de PBS. Quinze mililitros dessa solução foram adicionados a tubos de polipropileno (BD™; 50 ml) contendo 15ml de Ficoll-Hypaque PLUS™ (Amersham Biosciences), sendo o sangue adicionado sobre o Ficoll de forma inclinada com um ângulo aproximado de 45° para criar uma separação entre o Ficoll-Paque PLUS™ (Amersham Biosciences) e o sangue (1:1 sangue/PBS e Ficoll). Após a centrifugação a 900 x g por 30 minutos a 20 °C, o anel de PBMC (Figura 5B) que se formou na interface entre o Ficoll e o plasma, foi removido utilizando pipetas *transfer* estéril e colocados em tubos de polipropileno (BD™ 15 ml). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 400 x g por 10 minutos em 14ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 2ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e, posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma™) em uma diluição de 1:10 (10µl da suspensão de células e 90µl do corante). O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10⁶ células/ml.

5.7 Otimização dos protocolos para realização do cultivo celular

Para alcançar os objetivos deste projeto, foi necessária a realização do co-cultivo de PBMC, *T.cruzi* e adição do fármaco BZ. Para isso, as culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno contendo meio RPMI 1640

(Sigma™) suplementado (10% SBF) para adesão das células aderentes (monócitos/macrófagos). Em seguida, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas e, posteriormente, as formas tripomastigotas foram adicionadas aos poços na proporção parasita:célula de 10:1 para infecção das células aderentes. Após o período de incubação, as células não aderentes foram readicionadas ao cultivo, juntamente com o fármaco Bz e as placas incubadas. Após o cultivo, as células foram retiradas para o procedimento de marcação de superfície e intracitoplasmática, sendo avaliadas por citometria de fluxo. Com a finalidade de otimizar essas etapas do co-cultivo, foram realizados experimentos definindo os protocolos que foram utilizados ao longo do trabalho.

5.7.1 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura

Quando as PBMC são adicionadas aos poços das placas de cultivo, as células não aderentes tendem a se depositar no fundo do poço juntamente com as células aderentes. Com o objetivo de diminuir essa deposição, foi realizada a otimização do tempo de agitação da placa durante o período de 1 hora de cultivo das células aderentes, conforme Souza et al., (2007). Para isso, foi coletado sangue de dois indivíduos saudáveis em tubos contendo heparina, sendo 18ml de cada indivíduo (dois tubos de sangue de cada). Duas placas de 48 poços foram utilizadas para o cultivo das PBMC (obtenção de acordo com o item 7.6). Aos poços, foi adicionado 1 ml de solução contendo 10^6 células/poço, sendo utilizados quatro poços em cada placa. As placas foram agitadas em tempos diferentes, sendo uma de 15 em 15 minutos (quatro momentos de agitação) e a outra de 30 em 30 minutos (dois momentos de agitação), durante 1 hora. Para verificar a porcentagem de células aderentes e não aderentes presentes na cultura, o sobrenadante de cultura contendo as células não aderentes foi retirado dos poços e adicionado em tubos de polipropileno (BD Cônicos™ 15 ml). Após a retirada dessas células, 1 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF) foi adicionado aos poços. Os tubos contendo as células não aderentes e as placas contendo as células aderentes foram incubados em estufa ($37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$) por um período de 24 horas. Após o tempo de cultivo, as células aderentes foram removidas dos poços com a adição de 500 μl da solução de tripsina/EDTA (solução salina tamponada contendo 2% de Tripsina – Fibco® e 0,2% de EDTA - Sigma™) por um período de 3 minutos sendo 2 minutos na

estufa e 1 minuto sob forte agitação. As células foram colocadas em tubos de polipropileno (BD Cônicos™; 15 ml) e, para bloquear a ação da tripsina, 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF) foi adicionado aos tubos. Em seguida, foi realizado o processo de imunofenotipagem das células aderentes, não aderentes e das PBMC utilizando de anti-CD3 (conjugado ao fluorocromo PerCP-Invitrogen) para marcação de linfócitos e anti-CD14 (conjugado ao fluorocromo FITC-BD) para marcação de monócitos (conforme o item 5.11). Os anticorpos foram titulados previamente.

5.7.2 Otimização do método de retirada das células aderentes

Para otimizar o processo de retirada das células aderentes, foram utilizados dois métodos diferentes com a finalidade de retirar a maior quantidade possível dessas células. Para isso, amostras de sangue de um indivíduo saudável foram coletadas em tubos contendo heparina para obtenção de PBMC (conforme o item 7.6). Em seguida, 10^6 células/ml por poço foram adicionadas os poços da placa de cultura de 48 poços e incubadas em estufa ($37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$) por 24 horas. Foram utilizados os seguintes métodos:

a) Método 1: solução de tripsina/EDTA (2%) + 30 minutos de agitação no agitador mecânico (INNOVA 40) - Após o tempo de cultivo, foi retirado o sobrenadante de cultura do poço e colocado em tubo de polipropileno (BD Cônicos™ 15 ml) identificado. Em seguida, o poço foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto e a solução foi depositada nos tubos Cônicos (BD Cônicos™) já identificados. Aos poços foi adicionado 500 μl de tripsina com forte agitação por 2 minutos. As células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Cônicos™ 15 ml) e a ação da tripsina foi bloqueada adicionando ao tubo 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF). Os tubos contendo as células foram incubados no agitador mecânico por 30 minutos a 37°C (INNOVA 40). Após a incubação As células foram lavadas com mais 8 ml de PBS-Wash e centrifugadas por 10 minutos à 400 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1 ml de suspensão celular;

- b) Método 2: solução de tripsina/EDTA (2%) + 60 minutos - O protocolo foi seguido conforme o item "a - método 1" anterior, com exceção do tempo de incubação que foi de 60 minutos;
- c) Método 3: solução de PBS-Wash + 30 minutos de agitação no agitador mecânico (INNOVA 40) - Após o tempo de cultivo, foi retirado o sobrenadante de cultura de cada poço e colocado em tubo de polipropileno (BD Cônicos™; 15 mL) identificado. Em seguida, o poço foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto e a solução foi depositada nos tubos Cônicos (BD Cônicos™) já identificados. Aos poços foi adicionado 1 ml de PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% -Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™) gelado. Após aproximadamente 20 agitações fortes, as células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Cônicos™; 15 mL) e lavadas com mais 8ml de PBS-Wash. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 400 x g e, após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1 ml de suspensão celular.
- d) Método 4: solução de PBS-Wash + 30 minutos de agitação no agitador mecânico (INNOVA 40) - O protocolo foi seguido conforme o item "c - método 3" anterior, com exceção do tempo de incubação que foi de 60 minutos.

Por fim, para verificarmos qual método (1, 2, 3 ou 4) atenderia aos nossos objetivos para os estudos dos monócitos, realizamos uma imunofenotipagem (conforme o item 5.11) das células aderentes retiradas (Monócitos). Utilizamos a marcação para monócitos CD14 (anti-CD14 conjugado a FITC - 1,5µl) e do receptor de quimiocina CXCR3 (anti-CXCR3 conjugado a PE - 5µl) e observamos que o método 2 foi mais eficiente para viabilidade das células.

5.7.3 Otimização da cinética de tempo versus resposta e dose versus resposta

Com a finalidade de escolhermos o melhor tempo de cultivo e a melhor concentração de uso do fármaco benzonidazol, realizamos um ensaio com a amostra de um indivíduo saudável para avaliação da cinética de tempo, e amostra de um portador da Doença de Chagas Crônica, para avaliar as doses do benzonidazol. Foi coleta aproximadamente 40 ml de sangue, e essa amostra foi processada e obtida a PBMC, de acordo com o item 5.6. Após a obtenção da PBMC,

foi realizado a etapa de adesão das células, descritos no item 5.7, utilizando o tempo de agitação de 30 e 30 min, definido na otimização do item 5.7.1.

Para a realização do ensaio teste das doses do benzonidazol, utilizamos duas concentrações, 1µg/ml e 0,5µg/ml, em um experimento para avaliarmos a ação do fármaco juntamente com *T.cruzi*, em cinco diferentes tempos (16h, 24h, 48h, 72 h e 5 dias). Após o término dos tempos, foi realizada a técnica de CBA (Cytometric Beads Array) para as Quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 E CXCL10 e para as citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, como descrito no item 5.10.

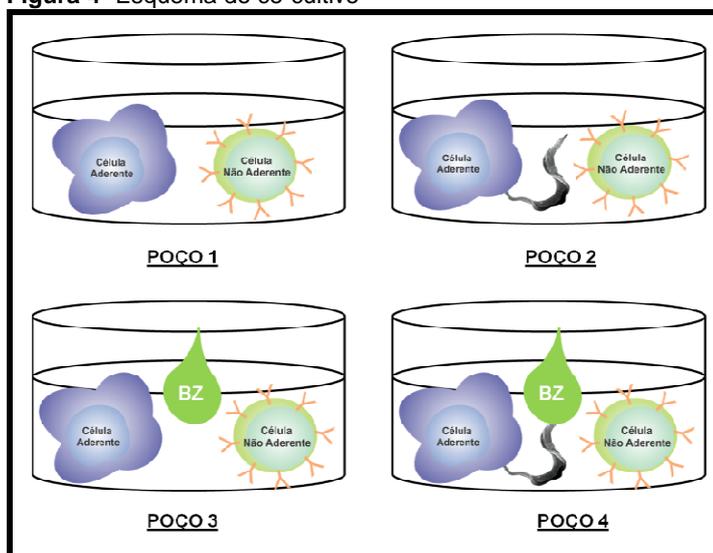
5.8 Co-cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o *Trypanosoma cruzi* e adição de tratamento com benzonidazol.

As culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno, nos tempo 24 h e 5 dias . Para o cultivo de células aderentes e não aderente primeiro ocorreu a adesão das células aderentes (monócitos), no tempo de 1h, homogeneizando delicadamente cerca de 10 agitações, a cada 30 min. Após a adesão, as células não aderentes (linfócitos) foram retiradas de cada poço (homogeneizando três vezes) e as células guardadas em tubos de cultura na estufa. Após, as formas tripomastigotas foram adicionadas à placa de 48 poços, em uma concentração de $2,5 \times 10^4$ por poço, em 1 ml de meio RPMI 1640 completo. A preparação foi incubada (37° C / 5% CO₂) por mais 2 h para interiorização dos parasitas, em que os parasitas que não penetraram nas células foram removidos através de lavagens com meio RPMI 1640 completo. Após a lavagem, as células não aderentes (guardadas na estufa), foram readicionadas, para que ocorra a apresentação de antígeno. Subsequente, foi adicionado 25 µl do BZ), em uma concentração de 1µg/ml. Este estudo teve controles para a comparação com a co-cultura (células aderentes, não aderentes, tripomatigotas e o BZ- Figura 4- poço 4) : um poço com células aderentes e não aderentes (Figura 4- Poço 1); com células aderentes não aderentes e o BZ (Figura 4- poço 3) e um outro poço com células aderentes e não aderentes e o tripomastigota de *T.cruzi* (Figura 4 – Poço 2).

As células aderentes, contidas na placa, foram submetidas ao processo de “tripsinização”, no qual ocorreu a lavagem dos poços com 1 ml de meio RPMI incompleto, em seguida foi adicionado 500 µL de solução de tripsina (10x) em cada poço. Subsequente, as placas forem levadas a estufa por 2 min e após foram

homogeneizadas vigorosamente por 1 min. As células foram transferidas para tubos Cônicos de 15 ml e em seguida, os poços foram lavados com meio RPMI completo e transferidos para o mesmo tubo Cônicos contendo as células aderentes. Depois, a ação da tripsina foi bloqueada, adicionando-se ao tubo, 4 ml de meio RPMI completo e incubadas por 60 min (item 5.7.1). Após foi realizado o procedimento de marcação de superfície dos receptores de quimiocinas, para avaliação por citometria de fluxo (item 5.11).

Figura 4- Esquema do co-cultivo



Fonte: Autora

Legenda: Poço 1 - Apenas células aderentes e não aderentes; Poço 2 - células aderentes, não aderentes e a adição do tripomastigota; Poço 3 - células aderentes, não aderentes e adição de benzonidazol; Poço 4 - células aderentes, não aderentes e a adição do tripomastigota e benzonidazol.

5.9 Avaliação dos receptores de quimiocinas presentes em linfócitos e monócitos

Ao final do período de incubação de 60 min, foram adicionados aos tubos cerca de 6 ml de PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma™™ e azida sódica a 1% - Sigma™) para centrifugação a 400 x g por 10 min. Com o auxílio de uma bomba a vácuo, os sobrenadantes foram retirados e descartados, até o volume final de 1 ml, e depositados em tubos de poliestireno (5ml) (BD Systems™) devidamente identificados, contendo os anticorpos monoclonais de superfície (Tabela 1) : anti-CD3, CD14, CCR1, CCR3, CXCR5 (1.5 µl), CCR4, CXCR2 ,CXCR4 (2.5 µl) e CCR5, CXCR3 (5 µl), conjugados a diferentes

fluorocromos e previamente titulados, incubados por 30 min a TA. Após a incubação, uma centrifugação (400 x g por 5 min a TA) foi realizada e o sobrenadante descartado. Após, as células foram fixadas com 150 µL de BD Cytotfix™ (BD Biosciences®), por um período de 15 min, a 4°C. Subsequente, foi realizada uma ultima centrifugação (400 x g por 5 min a TA), e novamente descartado o sobrenadante. Após, foram adicionados 300 µL de PBS-Wash aos tubos e os mesmos foram estocados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Quadro 1- Anticorpos de superfície utilizados na Imunofenotipagem

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
CD3	PerCP	S4. 1(AKA 7D6)	Invitrogen
CD14	FITC	TUK4	Invitrogen
CCR3	Alexa Fluor	SF8	BD
CCR4	PE	161	BD
CXCR3	PE	1C6/CXCR3	BD
CXCR5	Alexa Fluor	PF8B2	BD
CCR1	Alexa Fluor	5354	BD
CXCR2	PE	6C6	BD
CCR5	APC	2D7/CCR5	BD
CXCR4	PE		BD

Fonte: Autora

5.10 Coleta do sobrenadante de cultura para dosagem quimiocinas

Os sobrenadantes de cultura das placas foram coletados antes da realização da retirada das células aderentes, descrito no item 7.8 e após o tempo de cultivo de 24 h e 5 dias, estocados imediatamente a -20°C para posterior utilização em ensaios de CBA (cytometricbeadarray-BD Biosciences, EUA).

5.11 Detecção dos níveis de quimiocinas no sobrenadante de cultura de PBMC por *CytometricBeadArray* (CBA)

O CBA foi utilizado para a mensuração quantitativa das quimiocinas CCL5, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10, conforme recomendado pelo fabricante. Resumidamente, esta técnica emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as quimiocinas humanas detectadas no canal FL-4. Desta forma, 50 µl da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-CCL5, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 foram adicionadas em tubos devidamente identificados. Em seguida foram adicionados 50 µl do sobrenadante de cultura e do reagente *Human Chemokine PE Detection* (canal FL2) em todos os tubos. Após essa etapa as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200 g por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 100 µl em cada tubo, onde foram adicionados 300 µl de solução tampão (*Wash Buffer*) para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo, no software CellQuestPro (Beckton Dickson).

5.12 Citometro de Fluxo

A aquisição e análise das amostras foi realizada na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/CPqAM/Fiocruz. Através da citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems) podemos avaliar o tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulosidade das células (Side Scatter-SSC), além das fluorescência tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. A análise dos dados adquiridos foi realizada no software CellQuestPro acoplado ao computador.

As aquisições e análises no citômetro de fluxo obedeceram às Normas de Boas Práticas de Laboratório instituídas no CPqAM/Fiocruz pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS/ Fiocruz).

5.12.1 Aquisição e análise de linfócitos e Monócitos

A população de linfócitos foi selecionada através de dot plot FSC versus SSC, sendo adquiridos 10.000 eventos dentro da janela R1 e os Monócitos foram selecionados através de FCS versus FL1, sendo adquiridos 500 eventos dentro de R1. Após a seleção da janela de interesse (R1), os linfócitos T CD3⁺ e Monócitos CD14⁺, bem como os receptores CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5 foram analisados pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência.

5.12.2 Aquisição e análise das quimiocinas mensuradas por CBA

A análise quantitativa das quimiocinas é realizada em função do deslocamento das microesferas de quimiocinas em gráficos de distribuição pontual nos canais FL2 versus FL4, obtidos pelo citômetro de fluxo e a utilização de curvas-padrão para cada quimiocina avaliada. Para cada quimiocina foram adquiridos 300 eventos, como recomendado pelo fabricante, assim totalizando 1500 eventos. A análise dos dados foi realizada no programa *FCAP Array software* (BD).

5.13 Análises estatísticas

Os resultados entre cada grupo foram avaliados através do teste de Wilcoxon pareado. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2010, para a construção da base de dados e GraphPad Prism 5.0, para realização dos testes estatísticos citados.

5.14 Aspectos éticos

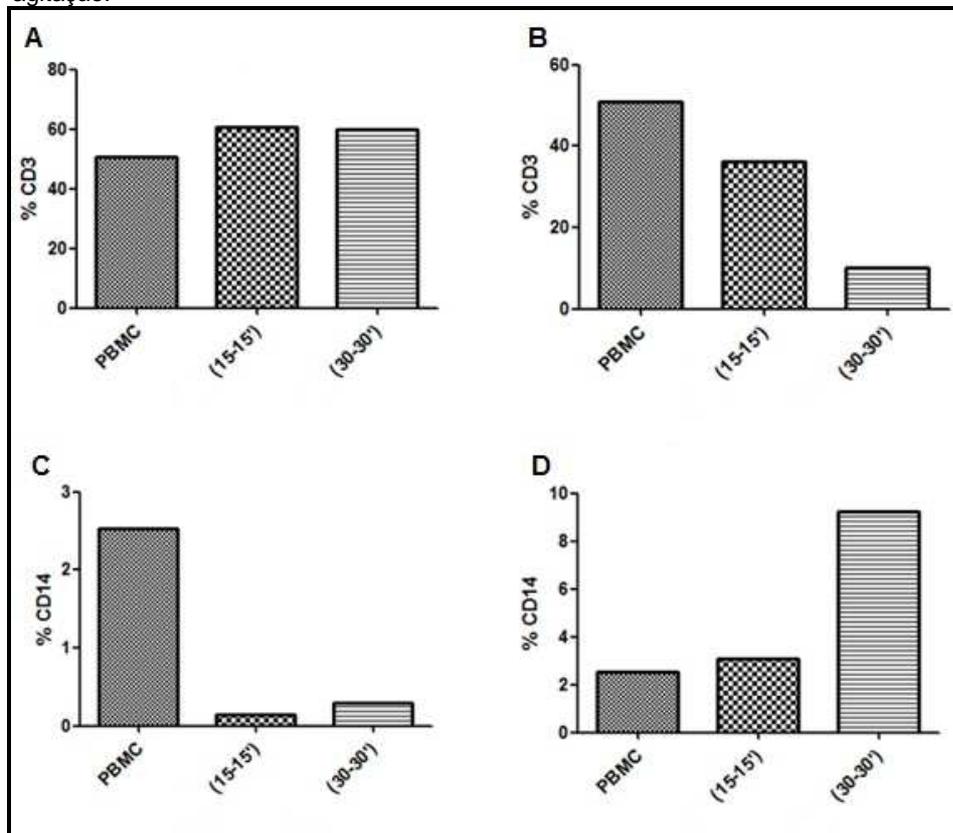
Os indivíduos incluídos na pesquisa tiveram participação voluntária devendo assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices 1 e 2). A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz, com CAAE: 07511612.2.0000.5190 (Anexo A).

6 RESULTADOS

6.1 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura

Os resultados mostraram uma menor porcentagem (10,23%) de expressão da molécula de superfície CD3⁺ (marcador de linfócitos), nas células que ficaram na placa, no tempo de agitação de 30 em 30 min. em comparação ao tempo de agitação de 15 em 15 min. (36,55%) (figura 5B). Além disso, observamos níveis maiores de CD14⁺ nas células aderentes no tempo de agitação de 30 em 30 min. (9,21%) quando comparado ao tempo de agitação de 15 em 15 min. (3,07%) (figura 5D). Com relação às células não aderentes, não observamos diferenças entre os tempos de agitação quando avaliamos os níveis de células CD3⁺ e CD14⁺ (figura 5A e 5C, respectivamente). Desta forma, o tempo de agitação escolhido foi o de 30 em 30 min., devido à menor quantidade de células não aderentes (CD3⁺) que se depositaram no fundo do poço e, também, à maior porcentagem de células CD14⁺ na população de células aderentes, em comparação com a agitação de 15 em 15 min.

Figura 5 – Comparação dos níveis de expressão das moléculas de superfície CD3⁺ e CD14⁺ em PBMC, células aderentes e não aderentes nos diferentes tempos de agitação.



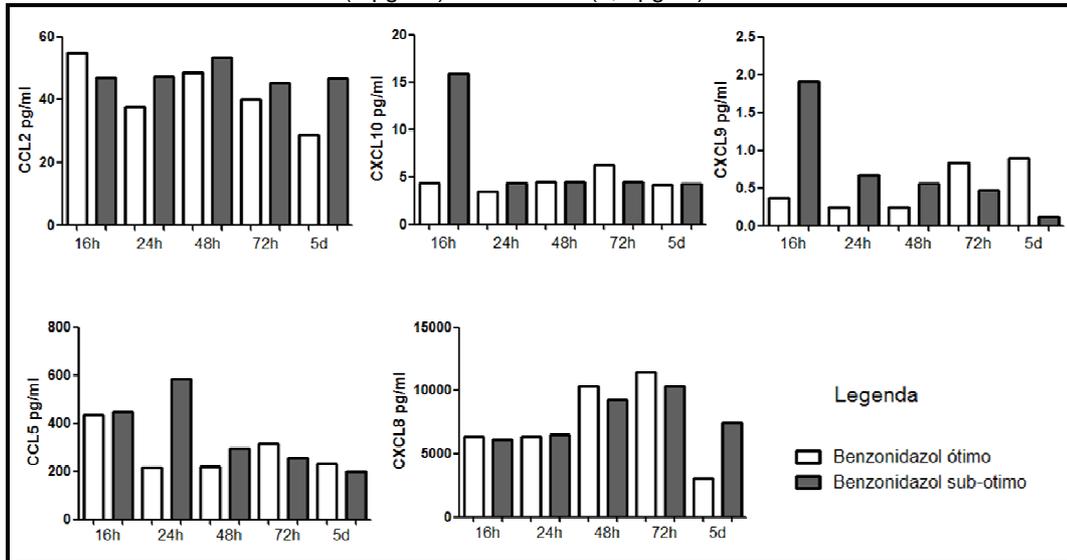
Fonte: Autora

Legenda: (A) Porcentagem da expressão de CD3⁺ em PBMC e em células não aderentes nos diferentes tempos de agitação; (B) Porcentagem da expressão de CD3⁺ em PBMC e em células aderentes nos diferentes tempos de agitação; (C) Expressão de CD14⁺ em PBMC e em células não aderentes nos diferentes tempos de agitação; (D) Expressão de CD14⁺ em PBMC e em células aderentes nos diferentes tempos de agitação.

6.2 Otimização da cinética de tempo versus resposta e dose versus resposta

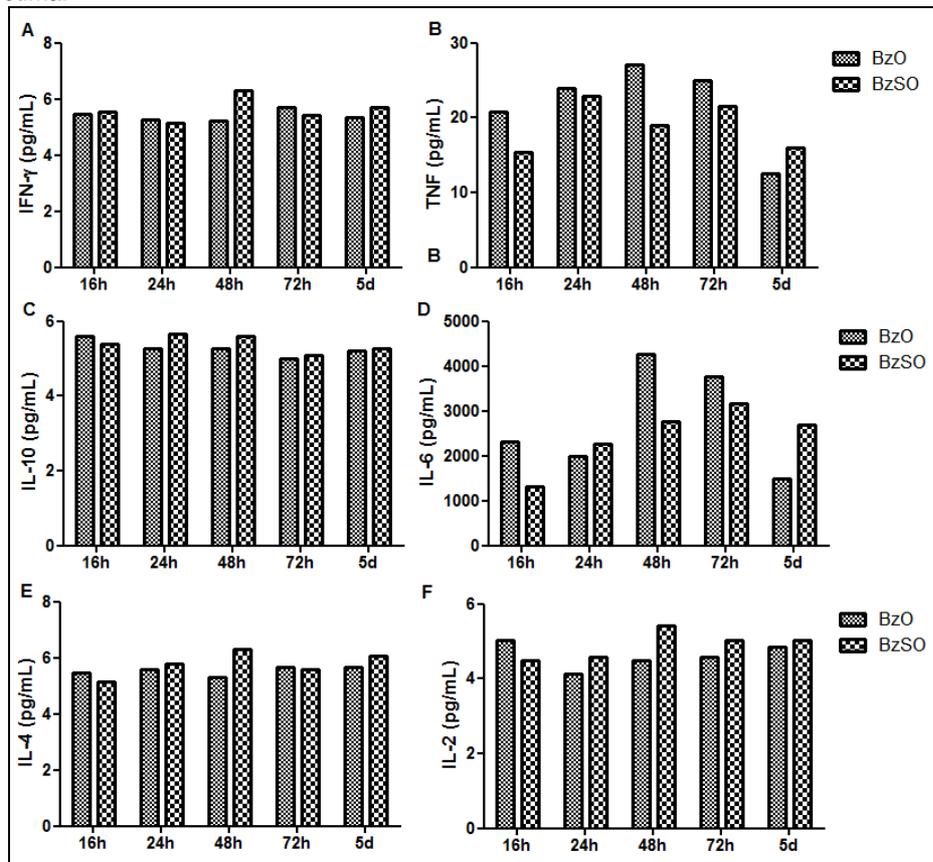
Os resultados mostraram que em geral não houve diferença entre as doses ótima (1 µg/ml) e a sub-ótima (0,5 µg/ml) quando analisamos por CBA a mensuração das quimiocinas (Figura 6) e citocinas (Figura 7). Desta forma, a dose do Bz escolhida foi a de 1 µg/mL, uma vez que essa é a concentração preconizada para o uso desse fármaco em ensaios *in vitro*, como descrito na literatura por Romanhã et al., 2010 .

Figura 6- Níveis das quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, presentes no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes, células não aderentes, tripomastigotas e o Benzimidazol nas doses ótima (1 µg/ml) e Sub-ótima (0,5 µg/ml)



Fonte: Autora

Figura 7 – Avaliação da concentração do Bz através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes e não aderentes, tripomastigotas e adição do Bz nas doses ótima e sub-ótima.

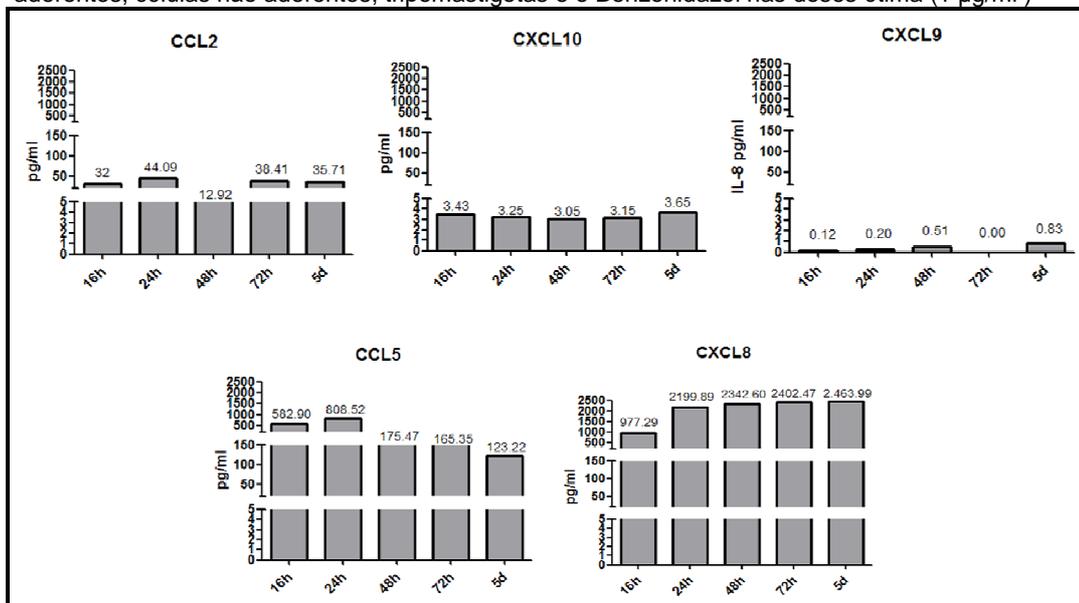


Fonte: Autora

Legenda: (A) IFN- γ ; (B) TNF; (C) IL-10; (D) IL-6; (E) IL-4; (F) IL-2. BzO – dose ótima do Benzimidazol; BzSO – dose sub-ótima do Benzimidazol.

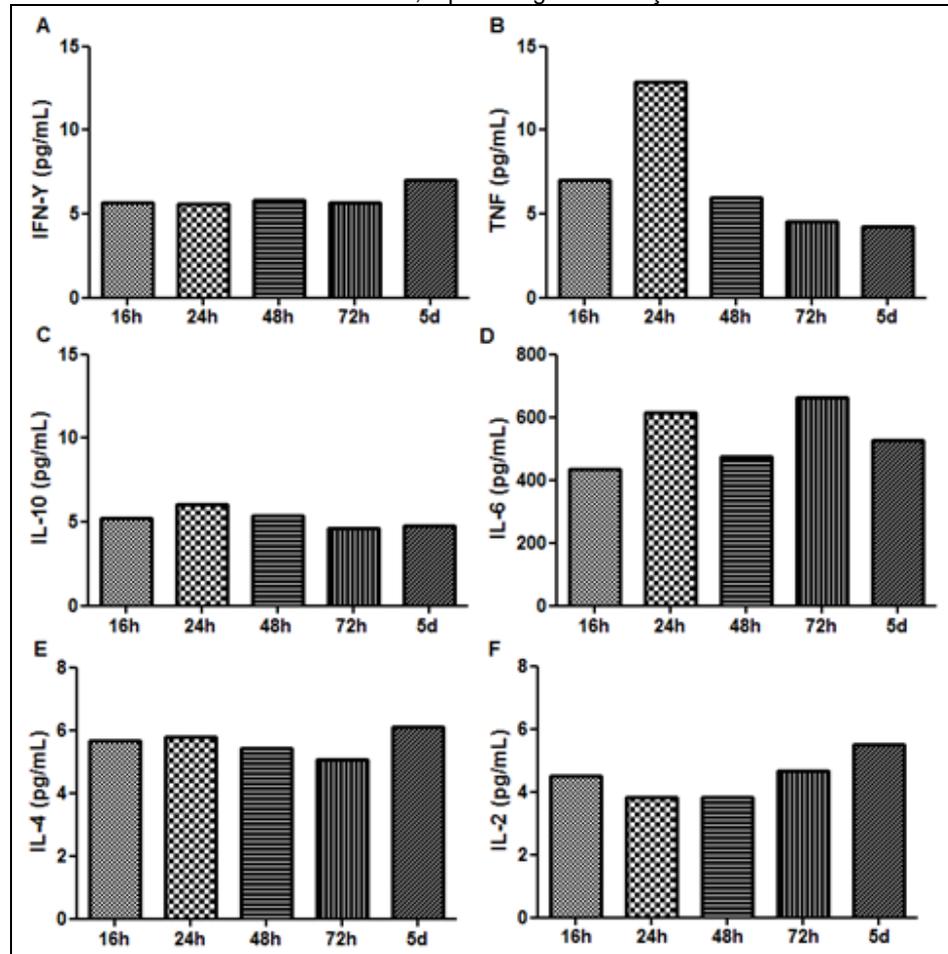
Com relação a cinética, foi visto que, em geral, as quimiocinas mensuradas no CBA, mostraram uma resposta um pouco diferenciada nos tempos de 24h e 5 dias (Figura 8), como a CCL5 que apresenta a maior produção no tempo de 24 horas e a CXCL8, que há aumento a partir do tempo de 24h dias e mantém os níveis aumentados até o 5º dia de cultivo. Na avaliação da produção de citocinas, verificamos que houve maior produção de algumas citocinas no início do cultivo, enquanto outras expressaram um pico de produção após alguns dias de cultivo (Figura 9). Sendo assim, em virtude desses achados, foram escolhidos para nossas avaliações dois tempos de cultivos: 24h e 5d.

Figura 8- Comparação dos níveis das quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, nos tempos de 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias, presentes no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes, células não aderentes, tripomastigotas e o Benzonidazol nas doses ótima (1 µg/ml)



Fonte: Autora

Figura 9 - Avaliação dos tempos de cultivo *versus* resposta através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células aderentes e não aderentes, tripomastigotas e adição do Bz.



Fonte: Autora

Legenda: (A) IFN- γ ; (B) TNF; (C) IL-10; (D) IL-6; (E) IL-4; (F) IL-2.

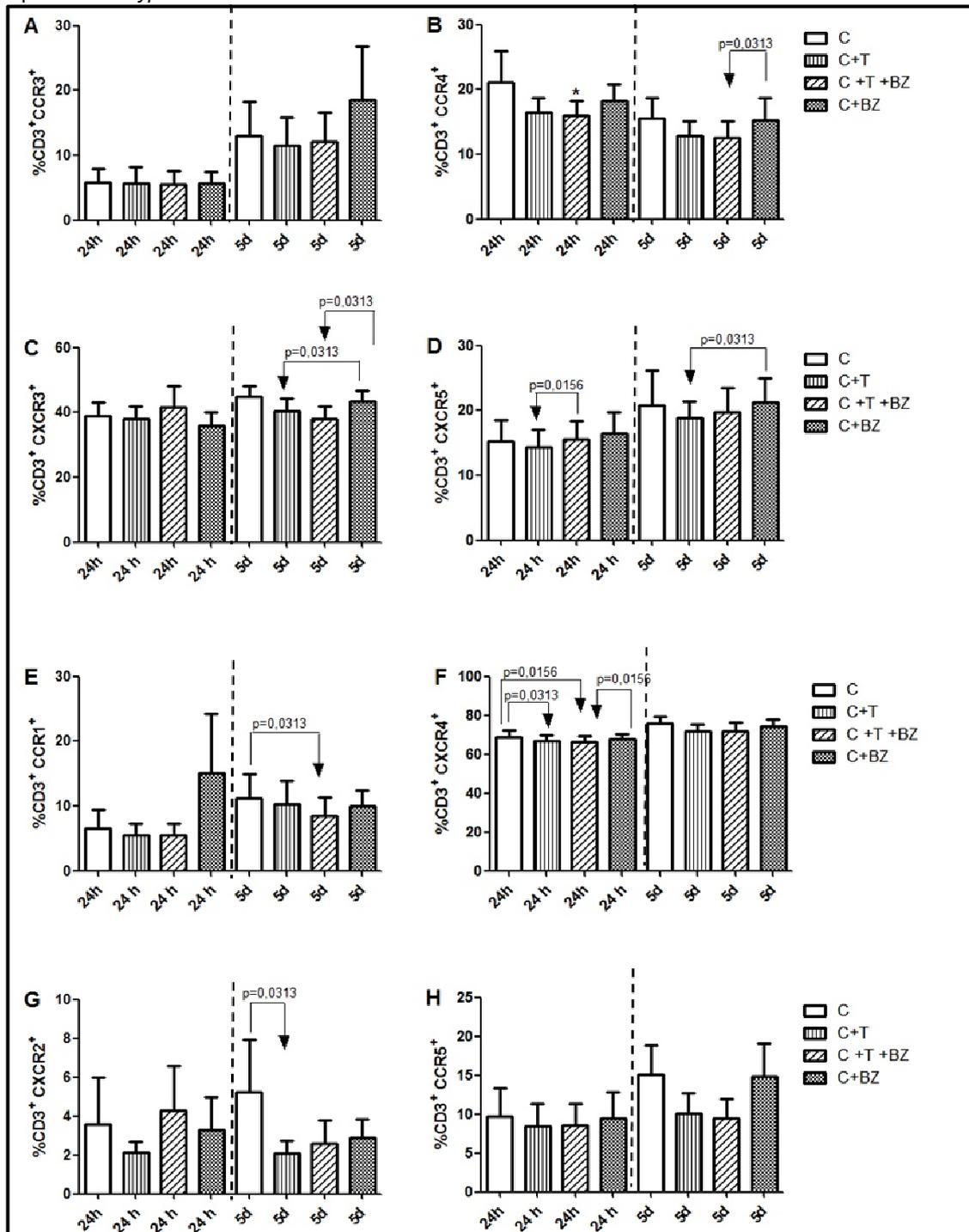
6.2 Avaliação dos receptores de quimiocinas presentes em linfócitos e monócitos

6.2.1 Avaliação da Expressão dos Receptores em Linfócitos

Nos resultados obtidos na avaliação da expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR2, CXCR2 e CCR5, em linfócitos (CD3⁺), na avaliação da diferença entre os tempos de 24h e dias, foram observados os seguintes resultados (Figura 10): A maioria dos receptores em linfócitos não apresentou diferença estatística significante, com exceção do receptor CCR4, que foi observado aumento no quinto dia de cultivo na condição C+T+BZ (Figura 10B).

Com relação às diferenças entre as condições no mesmo tempo de cultivo para os receptores citados, ficou evidenciado que o CCR4 apresentou aumento na condição C+BZ quando comparada a C+T+BZ, no tempo de 5 dias (Figura 10B). O mesmo ocorreu com o CXCR3, que também foi visto aumento na condição C+BZ em relação as condições C+T e C+T+BZ, no tempo de 5 dias (Figura 10C). Já o CXCR5 apresentou aumento na condição C+T+BZ quando comparado a C+T, no tempo de 24h e também foi observado aumento no C+BZ em relação a C+T, no tempo de 5 dias (Figura 10D). O CCR1 teve diminuição na condição C+T+BZ quando comparado a C, no quinto dia de cultivo (Figura 10E). Para o CXCR4 foi visto que nas condições C+T e C+T+BZ houve uma queda na expressão quando relacionada à condição C, no tempo de 24 h. Houve também uma diminuição no mesmo tempo de cultivo em C+T+BZ quando comparada com as condições e aumento em C+BZ. (Figura 10F). Para o CXCR2 foi observada apenas diminuição de C+T quando comparada à C, no tempo de 5 dias (Figura 10G). Na análise dos receptores CCR3 (Figura 10A) e CCR5 (Figura 10H), não foi observado diferença estatística significativa.

Figura 10- Expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5, em linfócitos T CD3⁺ presentes no co-cultivo de células dos portadores crônicos da DC, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com o benzonidazol.



Fonte: Autora

Legenda: (A) CD3⁺ CCR3; (B) CD3⁺ CCR4; (C) CD3⁺ CXCR3; (D) CD3⁺ CXCR5; (E) CD3⁺ CCR1; (F) CD3⁺ CXCR4; (G) CD3⁺ CXCR2; (H) CD3⁺ CCR5. C- Células; C+T- Células e Tripomastigotas; C+T+BZ- Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C+BZ- Células e Benzonidazol. As barras horizontais representam a média aritmética e as verticais o desvio padrão. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre cada tempo de cultivo são indicadas por setas. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre os tempos de Cultivo de 24h e 5d são indicadas por (*). O desvio padrão é representado pelo símbolo T.

6.2.2 Avaliação dos Receptores em Monócitos

Os resultados obtidos na avaliação da expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR2, CXCR2 e CCR5, em monócitos (CD14⁺), na avaliação da diferença entre os tempos de 24h e 5 dias, foram observados que em geral os receptores têm uma maior expressão no tempo de 5 dias (Figura 11).

O CXCR3 e o CXCR5 apresentaram diferença entre os tempos de 24h e 5 dias, em todas as condições testadas, sendo o tempo de 5 dias onde ocorreu a maior expressão (Figuras 11C e 11D). O CCR3 apresentou diferença entre os tempos nas condições: C, C+T+BZ e C+BZ, em que o tempo de 5 dias apresentou a maior expressão.

Na expressão do receptor CXCR2 (Figura 11G), podemos observar a diferença entre os tempos na condição C+T, assim como o CXCR4 (Figura 11F), que além dessa diferença também apresentou disparidade entre os tempos na condição C+BZ. Todas as diferenças citadas anteriormente, demonstraram uma maior expressão no tempo de 5 dias.

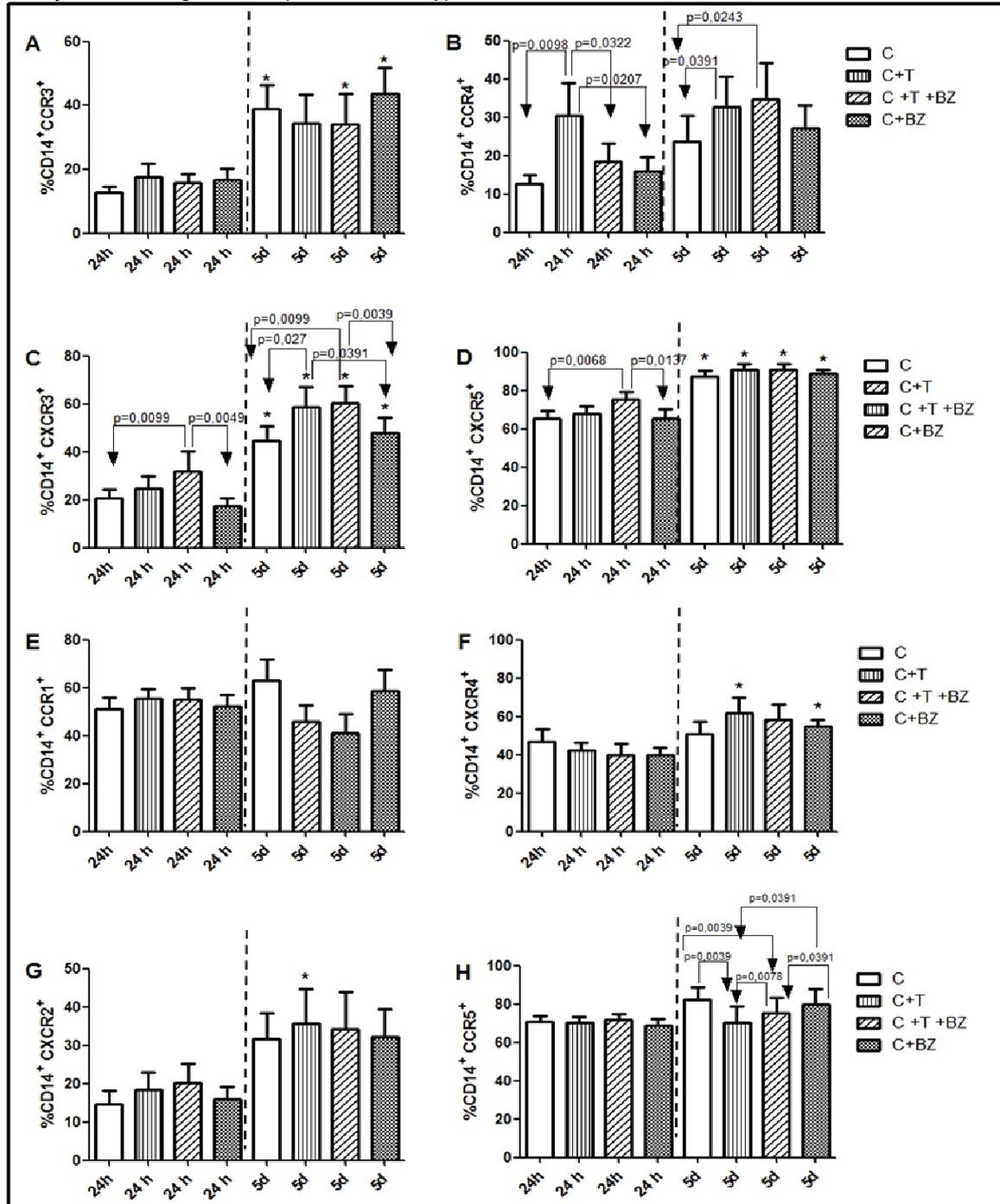
Com relação a comparação entre as condições no mesmo tempo de cultivo, foram evidenciadas diferenças nos receptores CCR4, CXCR3, CXCR5 e CCR5. Contudo, não houve diferença estatística significativa para os receptores CCR3, CCR1, CXCR4 e CXCR2 (Figuras 11A, 11E, 11F e 11G respectivamente).

Os resultados obtidos para o CCR4 mostraram que houve aumento em 24 horas de cultivo na condição C+T quando comparada as condições C, C+T+BZ e C+BZ (Figura 11B). Já no tempo de 5 dias, foi observado aumento de C+T+BZ e de C+T quando comparado a C (Figura 11B). O receptor de CXCR3, no tempo de 24h, apresentou aumento em C+T+BZ em relação as condições C e C+BZ. Já no período de 5 dias, foi evidenciado aumento na condição C+T quando comparada a C e C+BZ (Figura 11C), assim como também foi visto aumento na condição C+T+BZ em relação a C e C+BZ (Figura 11C), no mesmo tempo de cultivo.

O CXCR5, por outro só apresentou diferença no tempo de 24h, em que a condição C+T+BZ esteve aumentada em comparação com C e C+BZ. No entanto o CCR5 apresentou resultados significantes no tempo de 5 dias, em que houve aumento em C quando comparada a C+T e C+T+BZ; aumento em C+T+BZ em

relação a C+T e por fim aumento de C+BZ comparado a C+T e C+T+BZ (Figura 11H).

Figura 11 - Expressão dos receptores de quimiocinas CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR5, CCR1, CXCR4, CXCR2 e CCR5, em monócitos CD14⁺ presentes no co-cultivo de células dos portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com o benzonidazol



Fonte: Autora

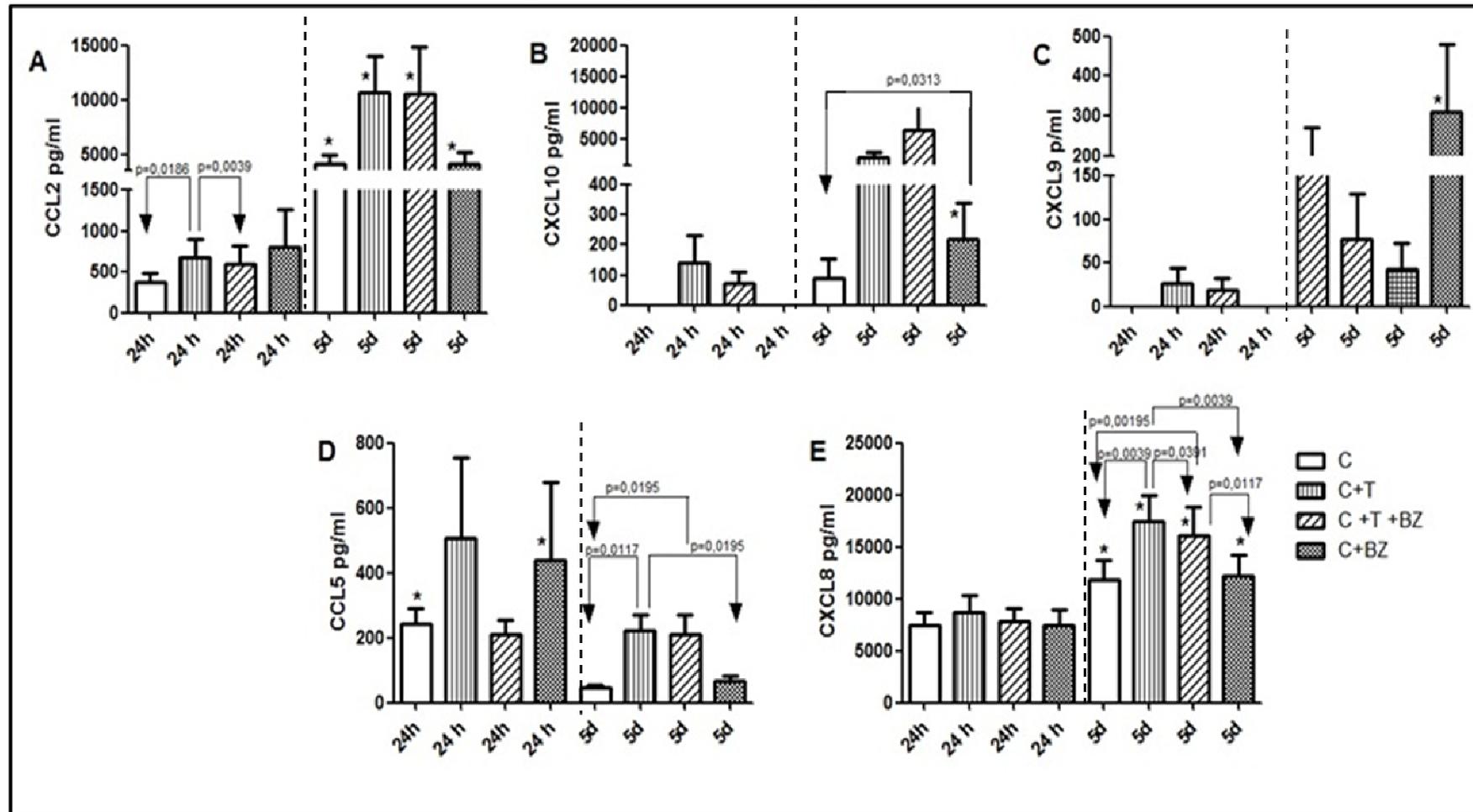
Legenda: (A) CD14⁺ CCR3; (B) CD14⁺ CCR4; (C) CD14⁺ CXCR3; (D) CD14⁺ CXCR5; (E) CD14⁺ CCR1; (F) CD14⁺ CXCR4; (G) CD14⁺ CXCR2; (H) CD14⁺ CCR5. C- Células; C+T- Células e Tripomastigotas; C+T+BZ- Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C+BZ- Células e Benzonidazol. As barras horizontais representam a média aritmética e as verticais o desvio padrão. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre cada tempo de cultivo são indicadas por setas. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre os tempos de Cultivo de 24h e 5d são indicadas por (*).(*) O desvio padrão é representado pelo símbolo T.

6.3 Detecção dos níveis de quimiocinas no sobrenadante do co-cultivo

Na investigação dos níveis das quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, no sobrenadante do co-cultivo de 24h e 5 dias, foi observado um aumento geral nos níveis no tempo de 5 dias (Figura 12). Para as quimiocinas CCL2 (Figura 12A) e CXCL8 (Figura 12E), foi evidenciada diferença entre todas as condições analisadas (C; C+T; C+T+BZ; C+BZ), em que a maior produção dessas quimiocinas foi ao tempo de 5 dias. No entanto para CXCL9 (Figura 12C) e CXCL10(Figura 12B), foi observado diferença na condição C+BZ, onde a maior produção também foi no tempo de 5 dias. Evento semelhante ocorreu com a quimiocina CCL5 (Figura 12D), em que foi evidenciado disparidade na condição C+BZ e também na condição C, ambas demonstraram um aumento na produção no tempo de 5 dias.

Na avaliação das diferenças entre as condições em diferentes tempos, foi observado que a quimiocinas CCL2 (Figura 12A) apresentou níveis menores nas condições C e C+T+BZ quando comparado a C+T, no tempo de 24h. Diferentemente do que ocorreu com as quimiocinas CXCL10 (Figura 12B), CCL5 (Figura 12D) e CXCL8 (Figura 12E), que apresentaram diferenças entre condições no tempo de 5 dias. A CXCL10 (Figura 12B) teve aumento apenas em C+BZ quando comparado a C . A CCL5 (Figura 12D) apresentou aumento em C+T em relação a C e C+BZ; e aumento em C+T+BZ quando comparado a C. Para quimiocina CXCL8 (Figura 12E), podemos observa diferenças entre mais condições, em ocorreu aumento de C+T quando comparado as demais condições e o aumento de C+T+BZ em relação a C e C+BZ. A quimiocina CXCL9 não apresentou diferença estatística significativa (Figura 12C).

Figura 12- Detecção da produção de quimiocinas CCL2, CXCL10, CXCL9, CCL5 e CXCL8, utilizando a técnica de CBA, presentes no co-cultivo de células dos portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com o benzonidazol



Fonte: Autora

Legenda: (A) CCL2; (B) CXCL10; (C) CXCL9; (D) CCL5; (E) CXCL8. C- Células; C+T- Células e Tripomastigotas; C+T+BZ- Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C+BZ- Células e Benzonidazol. As barras horizontais representam a média aritmética e as verticais o desvio padrão. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre cada tempo de cultivo são indicadas por setas. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre os tempos de Cultivo de 24h e 5d são indicadas por (*).O desvio padrão é representado pelo símbolo T.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigadas a produção de quimiocinas e expressão de seus receptores em células mononucleares do sangue periférico expostas ao *T.cruzi* e tratadas com o Bz. Nosso objetivo foi verificar se a presença do fármaco causaria algum impacto sobre a expressão dos receptores de quimiocinas em linfócitos e monócitos, bem como a produção global de quimiocinas em sobrenadante de cultura. A literatura apresenta poucos estudos sobre a influência de medicamentos na resposta imune, sobretudo no papel das quimiocinas e de seus receptores. Na paracoccidiodomicose, foi visto que o tratamento com antifúngicos Cotrimoxinol e Itraconazol não influenciaram no aumento ou na diminuição da quimiocina CCL3 (VENTURINE, et al., 2014). No entanto, em um estudo utilizando o Mieloma Múltiplo como modelo, foi visto que inibindo o receptor CXCR4, tornava as células cancerígenas mais susceptíveis ao tratamento (AZAB et al., 2009). Estudo semelhante foi realizado na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), em que inibidores de CXCR4 e CCR5 são considerados como promissores alvos para construção de vacinas terapêuticas (PRINCEN; DOMINIQUE, 2005). Contudo, é a primeira vez que este tipo de abordagem na doença de Chagas é explorado.

Nossos resultados demonstram que o receptor CXCR5 em células CD3⁺ apresentou um aumento na condição C+T+BZ, quando comparado à condição C+T no tempo de 24 horas, indicando que o fármaco Bz induziu um aumento da expressão desse receptor em linfócitos T nas primeiras horas de cultivo. O CXCR5 possui como ligante a CXCL13, uma quimiocina homeostática, seletiva para os linfócitos B e é expressa constitutivamente em órgãos linfóides secundários (MURPHY et al., 2000). Esse receptor também é detectado nas células do sangue periférico, como em linfócitos B, e numa porção de linfócitos Th1 e Th2 (SALLUSTO et al., 1998). Os elevados níveis de expressão nos linfócitos B sugerem um papel na maturação dos mesmos. Além da quimiotaxia e mobilização de cálcio, este receptor também está envolvido no desenvolvimento normal do tecido linfóide (DAVID, 2000). Cerca de 20 % das células T CD4⁺ periféricas possui CXCR5⁺ (KIM, et al., 2001; SCHARELI, et al., 2000). Chevalier et al (2010), em um estudo utilizando células do sangue periférico humano, demonstraram que células T CD4⁺ CXCR5⁺ periféricas são produtoras de IL-10. Por outro lado, células T CD4⁺ CXCR5⁺ que expressam a

proteína co-estimulatória ICOS-L, importante na regulação da produção de citocinas por células T, são produtoras de IFN- γ e IL-17 (SHARPE; FREEMAN, 2002).

Células T CD4⁺ oriundas de pacientes crônicos da DC, na condição C+T+Bz, no tempo de cultivo de 5 dias, apresentaram uma diminuição nos níveis de IL-10 (NEVES, 2015), indicando que a presença do parasita e do fármaco BZ, provavelmente estaria induzindo a diminuição da IL-10. Desta forma, acreditamos que o aumento do receptor CXCR5 em células TCD3⁺, na presença do Bz, tenha sido tanto em células TCD4⁺ quanto em T CD8⁺. Como os linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ apresentam importantes funções na doença de Chagas (ALBAREDA et al., 2009; LORENA et al., 2009). Em resultados obtidos no nosso grupo de pesquisas, observamos que Linfócitos T CD8⁺ CCR5⁺ estão elevados tanto na condição C+T, quanto na C+T+Bz. Porém, verificamos que a presença de grânulos de granzima B dentro das células T CD8⁺ CCR5⁺ estavam aumentada na condição C+T+Bz, sugerindo que o fármaco não muda a frequência dessas células, mas aumenta a sua função citotóxica (ESMERALDO, 2015).

Além disso, em linfócitos T CD3⁺, observamos que o houve uma diminuição da expressão do CCR4 na condição C+T+BZ quando comparamos a expressão desse marcador entre os tempos de cultivo de 24h e 5 dias, assim o BZ induziu uma diminuição de CCR4 com o passar do tempo de cultura. O CCR4 é um receptor que está associado aos linfócitos Th2, em que as quimiocinas CCL17 e CCL22 são seus ligantes, produzidos constitutivamente e seletivos para CCR4. Essas quimiocinas induzem a mobilização de cálcio e a quimiotaxia. O receptor CCR4 é um marcador seletivo para os linfócitos Th2 e, entre as suas funções biológicas, estão o tráfego de células dendríticas, a recirculação de linfócitos T, a transmigração de células através do timo e a migração de linfócitos T para o tecido linfóide (SHARPE; FREEMAN, 2002).

Gomes et al (2005) investigaram a presença de diversos receptores de quimiocinas em portadores crônicos da doença de Chagas, dentre eles a presença do CCR4 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. No entanto não foi vista correlação entre a presença desse receptor e a gravidade da doença. Assim de acordo com nossos resultados, verificamos que o BZ diminuiu a expressão fenotípica do CCR4 ao longo do tempo (de 24h ao 5º dia de cultivo) em linfócitos T CD3⁺, sugerindo que o BZ esteja ao longo do tempo, diminuindo a quimiotaxia de linfócitos TH2, o que

concorda com o estudo de Neves (2015), onde células TCD4⁺IL-10⁺ apresentaram-se diminuídas na presença do BZ.

Nossos resultados demonstraram que o CCR1 também apresentou diminuição no tempo de 5 dias, quando comparamos as condições C+T+BZ e C. O mesmo não ocorreu quando comparamos C+T e C, indicando que o BZ estaria provocando essa diminuição. O CCR1 está intimamente ligado a inflamação e liga-se as seguintes quimiocinas: CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15 e CCL23. Este receptor apresenta-se à superfície dos linfócitos do sangue periférico, monócitos e células NK. A sinalização do CCR1 inclui mobilização de cálcio, inibição da adenilciclase (Enzima que transforma ATP em AMP_C, importante nas vias de transdução de sinal) e quimiotaxia (DAVID, 2000; MURPHY et al., 2000). Em modelo murino da esquistossomose uma diminuição da inflamação foi verificada quando a expressão dos genes CCR1/CCR2 foi inibida (PARK et al., 2001). Na DC em um estudo utilizando camundongos infectados com o *T.cruzi* e tratados com o bloqueador parcial de CCR1, foi vista uma proteção contra a perda de conexina 43 no tecido cardíaco e creatina quinase isoenzima MB (CK-MB), os quais são tipicamente marcadores de disfunção cardíaca (MEDEIROS et al., 2009). Assim de acordo com a literatura a diminuição do CCR1 aponta para um fenômeno protetor, já que o dano cardíaco está associado com a progressão da doença sintomática (SATHER-AVELAR et al., 2009). Acreditamos que, por se apresentar responsável pela diminuição de CCR1, o Bz possui um caráter protetor de dano tissular durante o tratamento etiológico da DC, o que poderia concordar com a hipótese de que o tratamento na fase crônica da DC melhoraria a evolução clínica dos pacientes (BERN et al., 2010)

Na avaliação da expressão dos receptores de quimiocinas na superfície dos monócitos, verificamos que a frequência do receptor CCR4 diminuiu no tempo de 24h e o CCR5 aumentou no tempo de 5 dias, ambos na condição C+T+BZ, quando comparados a condição C+T. Esses receptores possuem em comum o mesmo ligante que é a quimiocina CCL5, que atua na quimiotaxia de monócitos, células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como de eosinófilos e basófilos (ROLLINS, 1997). A CCL5 é produzida por uma ampla variedade de células e é capaz de se ligar a múltiplos receptores, os quais são: CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5 (ROLLINS, 1997; VAN CREVEL, OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002).

A interação entre quimiocinas e seus receptores é um evento importante na migração de leucócitos para os locais da inflamação. Além da quimiotaxia, as quimiocinas, juntamente com seus receptores, tem a capacidade de induzir respostas do tipo TH1 e TH2, associada à respostas de citocinas (CAMPBELL et al., 2000). As respostas Th1 normalmente induzem o aumento da expressão do CCR5 e CXCR3 enquanto que as respostas Th2 a do CCR4 e CCR8 (BONECCHI, et al., 1998; SALLUSTO, 1999; SEBASTIANI et al., 2001; LOETSCHER et al., 1998, ANDREW et al., 2001).

A presença da expressão do receptor CCR4 foi observada no sangue periférico de pacientes com dermatite atópica e no Lupus Eritematoso (WAKUGAWA et al., 2001; HASE et al., 2001). Os seus principais ligantes, as quimiocinas CCL17 e CCL22 foram encontradas em lesões de pacientes com paracoccidiodomicose (CAVASSANI et al., 2006). Em outro estudo foi encontrado a associação da ausência do receptor CCR4 com a suscetibilidade a para a paracoccidiodomicose (ROCHA, 2010). Estudo em camundongos expostos a infecção com a bactéria *Escherichia coli*, foi observado que a ausência do receptor CCR4 em macrófagos apresentou uma *down-regulation* no fator nuclear-Kappa B (NF-KB) (NESS et al., 2006), que é responsável pela transcrição de diversos genes, incluindo, aqueles referentes às citocinas pró-inflamatórias - TNF- α , IL-1 e IL-6 (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Com isso a diminuição de CCR4 encontrada no nosso estudo, atribuída à droga BZ, pode ter influência não só na migração de Linfócitos TH2, como descrito anteriormente, mas também pode estar alterando a atuação do NF-Kb, conseqüentemente diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

O CCR5 está presente na superfície de células T e monócitos e tem sido associado a reações inflamatórias com presença de citocinas do tipo TH1 (QUIN, et al., 1998; SALLUSTO et al., 1998). É descrito na literatura que a saída de monócitos a partir da medula óssea é alterada durante os períodos de inflamação ou em resposta à infecção (REES, 2010). A subpopulação de monócitos CD14⁺ CD16⁺, representa 5-7% dos monócitos sanguíneos totais, e estas células expressam níveis baixos de CCR2, mas altos níveis de CCR5. Embora estas células não sejam susceptíveis de migrar fortemente para fontes de CCL2 nos tecidos, a expressão de CCR5 permite que estas células migrem para locais de inflamação onde células CCR5⁺ são atraídas pela produção local das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 que também são seus ligantes. Estas células têm a capacidade de responderem a

lipossacarídeos de bactérias e, em geral, produzem um alto nível de citocinas pró-inflamatórias (CORNWELL et al., 2013).

Em indivíduos com esclerose múltipla progressiva, este receptor esteve aumentado em comparação aos indivíduos saudáveis, sugerindo que o CCR5 é fundamental no processo imunopatológico (BALASHOV et al., 1999). Camundongos com ausência do CCR5 são significativamente mais suscetíveis à infecções por parasitas *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* e também apresentam um aumento da mortalidade na infecção pelo vírus da gripe (AGRACE et al., 2000; ALIBERTI et al., 2000; DAWSON et al., 2000).

Apesar do CCR5 ter suas funções bem descritas em outros modelos patológicos, na DC ainda não se sabe qual a sua verdadeira função. Indivíduos portadores da cardiomiopatia chagásica possuem elevada expressão do receptor CCR5 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estando relacionada com níveis elevados de TNF- α e IFN- γ sendo considerado um indutor da resposta inflamatória (GOMES et al., 2005). Por outro lado, na avaliação desse receptor em monócito CD14⁺, foi demonstrado que portadores da DC com insuficiência cardíaca leve apresentam elevada expressão de CCR5 quando comparados aos indivíduos sem a doença, e também foi observada uma correlação entre a diminuição da função cardíaca e a diminuição da expressão do CCR5 (TALVANI et al., 2004a). Contudo, trabalhos que investigam a associação de polimorfismo à cardiopatia chagásica, encontraram que o aumento receptor CCR5 estava relacionado com o baixo risco de desenvolvimento da forma cardíaca na fase crônica da doença (FRADE et al., 2013; FLORÉZ et al., 2012;). Assim, o aumento de CCR5 em monócitos encontrado no nosso estudo, pela presença do BZ, poderia ter um caráter benéfico no tratamento de pacientes na fase crônica da DC, já que de acordo com Talvani et al. (2004) seu aumento em monócitos pode estar associado com a proteção da doença cardíaca.

Nossos dados também demonstram o aumento do CXCR3 em monócitos CD14⁺ na condição C+T quando comparada a condição C. Este aumento é semelhante quando comparamos C+T+BZ e C, indicando que o BZ manteve os níveis de CXCR3, no tempo de 5 dias. Este receptor liga-se a três quimiocinas altamente inflamatórias: CXCL9, CXCL10 e CXCL11, todas quimioatrativas e indutoras da mobilização de cálcio. Além destas três, ligam-se também a CXCL5, CXCL7, CXCL13, CXCL19 e CXCL20. É expresso principalmente em linfócitos T e B

e células NK (CLARCK- LEWIS et al., 2003), mas também em monócitos (ZHANG et al., 2014).

Estudo com Hantavírus, investigando a expressão do CXCR3 e um dos seus ligantes, a quimiocina CXCL10, observaram que a ligação do CXCL10 ao CXCR3 na superfície de monócitos CD14⁺, induzia um maior recrutamento de linfócitos T citolíticos, contribuindo para uma eliminação eficaz do vírus (ZANG et al., 2014). Na DC em um modelo utilizando cães, foi visto um aumento do CXCR3 no miocárdio de cães com cardiomiopatia, quando comparados àqueles portadores da forma clínica assintomática (GUEDES et al., 2012). Estudos em humanos também observaram a expressão de CXCR3 na forma grave da DC. Nogueira et al. (2012) observaram a expressão aumentada do CXCR3, assim como níveis elevados do mRNA do CXCR3 e quimiocinas atraentes de monócitos (CCL2, CCL5 e CCL9) do sangue periférico de pacientes com cardiopatia chagásica. Os autores atribuíram a alta expressão desse receptor à inflamação exacerbada na DC cardíaca. Com isso nossos resultados indicam que a presença do BZ mantém a resposta inflamatória exercida pelo CXCR3 e seus ligantes.

Quanto à produção de quimiocinas avaliada em sobrenadantes de cultura, observamos que as quimiocinas CCL2 e CXCL8 apresentaram uma diminuição na condição C+T+Bz quando comparada à condição C+T, no tempo de 5 dias. Por outro lado, observamos um aumento dessas mesmas quimiocinas na presença do parasita e sem o BZ (na condição C+T), em relação à condição só com células (C), também no tempo de cultivo de 5 dias.

A quimiocina CCL2, é quimioatraente para monócitos e também pode estar envolvida na ativação celular relacionada com a defesa do hospedeiro. É produzida por monócitos, linfócitos e fibroblastos durante a lesão de um tecido e possui especificidade para o receptor CCR2 (SALLUSTO, et al., 1998). Na Infecção experimental por *T.cruzi*, há um aumento na expressão do mRNA da CCL2, assim como na expressão do seu receptor CCR2 (HIGGINS, et al., 2014) e, segundo os autores isso pode contribuir para o recrutamento, e migração de células inflamatórias no tecido cardíaco, levando à persistência de miocardite (PAIVA et al., 2009). Especialmente nos casos de infecção pelo *T.cruzi*, esta quimiocina é intensamente produzida no tecido cardíaco de camundongos infectados e seu envolvimento na captação e destruição do parasita por macrófagos (MACHADO et al., 2000; PAIVA et al. 2009). Este achado também foi observado em humanos, em

que foi evidenciado associação de níveis plasmáticos elevados da quimiocina CCL2 e a citocina TNF- α , em pacientes com a DC grave (TALVANI et al., 2004). O polimorfismo do gene CCL2 em pacientes portadores da DC foi associado com a gravidade da doença cardíaca (FRADE et al., 2013). Caldas et al. (2014) observaram que em camundongos infectados com *T.cruzi*, na fase crônica da doença, e tratados com o BZ, apresentaram um aumento da quimiocina CCL2. Nossos resultados são discordantes dos achados de Caldas et al., 2014, já que observamos uma diminuição da CCL2 nos pacientes cronicamente infectados, na presença do BZ. Este acontecimento provavelmente foi causado pelo aumento do CCR5, um dos principais ligantes do CCL2, assim o CCL2 livre no sobrenadante de cultura apresentou uma diminuição.

A presença do BZ diminuiu a produção de CXCL8 no sobrenadante da cultura de PBMC. A CXCL8 é uma quimiocina inflamatória, que tem como principais ligantes os receptores CXCR1 e CXCR2, e é responsável pela quimioatração dos neutrófilos para o local da inflamação (WAGNER; ROTH, 2000). Além de atuar na migração dos neutrófilos, também é responsável pela diapedese de linfócitos T e produção de superóxidos, como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO) (LYOS, YSHIMURA, MCMURRAY 2004). Recentemente, com a descoberta das respostas imunes promovidas pelo perfil Th17, os processos inflamatórios causados por esse subtipo celular vêm sendo bastante explorados (DONG, 2008; SINGH, et al., 2008). A IL-17, principal citocina produzida pelo perfil TH17, tem propriedades pró-inflamatórias, induzindo células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzir uma gama de mediadores inflamatórios, dentre eles a quimiocina CXCL8 (NAKAE et al., 2003; ZELANTE et al., 2007). A produção exacerbada da CXCL8, já foi descrita em doenças inflamatórias (YANG et al., 2003). No entanto a sua associação às doenças infecto parasitárias é pouco explorada. Na DC foi investigada a associação do polimorfismo do gene do CXCL8 com a progressão da miocardite chagásica, mas nenhuma diferença significativa foi demonstrada (FLORÉZ et al., 2012). Assim de acordo com nossos resultados o BZ estaria diminuindo a produção de CXCL8, já que não foi encontrado aumento para o receptor CXCR2. Esse perfil diminuído dessa quimiocina parece ter um papel benéfico durante o tratamento etiológico com o BZ, já que níveis elevados de CXCL8 estão associados com lesões no tecido cardíaco.

Assim, a influência do tratamento com o BZ na resposta imune das quimiocinas, produzidas por células de PBMC de pacientes crônicos da DC, não apresentou alteração na maioria das quimiocinas. Com exceção da CXCL8 e CCL2, que apresentaram uma diminuição na presença do BZ, demonstrando uma leve diminuição da resposta inflamatória global. Trabalhos utilizando o BZ como tratamento da DC crônica, mostraram que a resposta inflamatória TH1, imunomodulada, ou seja com a presença de mediadores TH2 é benéfica (BAHIA-OLIVEIRA, et al., 2000; SATHER-AVELAR, et al., 2006). No nosso estudo observamos de modo geral que a resposta predominante era de perfil pró-inflamatório, mas uma inflamação controlada, onde há aumento, mas também diminuição de mediadores pró-inflamatórios. Em resumo, acreditamos que, com relação a produção de quimiocinas e expressão de receptores, o BZ mostrou benefícios já que mantém uma inflamação necessária para o controle parasitário, no entanto sem exacerbação da resposta imune. No entanto para desvendar profundamente os mecanismos desta imunomodulação na presença do BZ, são necessários outros estudos para investigar a cooperação entre as células da resposta imune inata e adaptativa, associando-se à capacidade de atuação do fármaco em amastigotas neste modelo de experimentação.

8 CONCLUSÃO

Tanto nos linfócitos como nos monócitos a expressão dos receptores foi conduzida a uma resposta imunológica de perfil inflamatório na presença do BZ. Contudo a diminuição dos receptores CCR1 em linfócitos e CCR4 em monócitos estariam evitando a resposta inflamatória exarcebada. Com relação aos achados na avaliação das quimiocinas no sobrenadante de cultura, podemos concluir que a diminuição de CCL2 e CXCL8 estariam exercendo a função de controle da inflamação. Por fim, nossa conclusão é que devido ao caráter inflamatório, mas modulado, que o BZ conduziu, podemos afirmar que o fármaco demonstrou benefícios relevantes na expressão de receptores e na produção de quimiocinas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Saunders , 2011.

ALIBERTI, J.C et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.**, New York, v. 158,n. 4, p. 1433-1440, 2001.

ALIBERTI, J.C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun.**; Washington, v.64, n. 6, p. 1961–1967, 1996.

ALIBERTI, J.C. et al beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 67, n.9, p. 4819–4826, 1999.

ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **J. Leukoc. Biol.**, Winston-Salem; v. 70, n. 4, 467–477, 2001.

ANDREW, D.P., et al. C-C Chemokine receptor 4 expression defines major subset of circulating nonintestinal pontencial. **J. Immunol.**, New York, v.166, p. 103-111, 2001.

AZAB, A.K. et al. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. **Blood.**, Berlin, v. 113, n. 18, p. 4341–4351, 2009.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14 e 30 years ago. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.182, p.634-638, 2000.

BALASHOV, K.E. et al. CCR5 and CXCR3 T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. **Proc.Natl. Acad. Sci.**,Washington, v. 96, p. 6873–6878, 1999.

BELGE, K.U. et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J. Immunol.**, Baltimore, v.168, n. 7, p. 3536-3542, 2002.

BIXBY, L.M.; TARLETON, R.L. Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, Baltimore, v.181, p.2644–2650, 2008.

BONECCHI, R. et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. **Blood.**, Berlin, v.92, p.2668–2671, 1998.

CONSENSO brasileiro em doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med Trop.**, Brasília, v.38,2005. Suplemento.

CONSENSO brasileiro em doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med Trop.**, Brasília, v. 39,2010. Suplemento.

BRAZ, S.C.M. et al. Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 44, p. 318-323, 2011.

BUSTAMANTE, J.M. et al. Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. **Int. J. Antimicrob. agents.**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 733-737, 2007.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído - semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 3, p. 43-49, 1961.

BRENER, Z.; CANÇADO, J. R. **Terapêutica experimental da doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial, 1968.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1979.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, Basel, v.114, n.2, p.103–110, 1997.

CALDAS, S. et al. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology (Lond.)**, Londres, p.1-10, 2014.

CANÇADO, J.R.; MARRA, U.D; BRENER, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeído - semicarbazona (nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo, v.6, p.12-16, 1964.

CANÇADO, J.R. et al. Toxicidad y valor terapeutico del Bay 2502 en la enfermedad de Chagas crónica en tres esquemas posológicos. **Bol. Chil. Parasital.**, Santiago, v. 24, p. 28-32, 1969.

CANÇADO, J.R. et al. Clinical therapeutic trial in chronic Chagas disease using nifurtimox in 3 schedules of long duration. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo; v.17, p. 111-127, 1975.

CANÇADO, J.R. et al. Segundo ensaio terapêutico com o nifurtimox na doença de Chagas. **Rev Goiana Med.**, Goiana, v. 22, p. 203-233, 1976.

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

- CAMARGO, M.E. Comparative evaluation of toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results. **Rev Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 62-68, 1966.
- CASTRO, J.A. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease. **Hum. Exp. Toxicol.**, Basingstoke, v. 25, p. 471-479, 2006.
- CAVASSANI, K.A. et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 177, p. 5811-5818, 2006.
- CERISOLA, J.A. et al. Hemagglutination test for the diagnosis of Chagas' disease. **Prensa Med Argent.**, Buenos Aires, v. 49, p. 1761-1767, 1962.
- CHAGAS, C. Tripanossomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 37-60, 1916.
- CLARK-LEWIS, J. et al. Structure-Function Relationship between the Human Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands. **J. Biol. Chem.**, Berlin, v. 278, p. 289-295, 2003.
- CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, Basel, v. 34, p.187–192, 2001.
- CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 167, n. 2, p. 305-313, 2005.
- CYSTER, J.G. et al. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. **Science**, Washington, v. 286, n. 5447, p. 2098-2102, 1999.
- D'AMBROSIO, D.; SINIGAGLIA, F. Chemokines and their receptors: trafficking cues for Th1 and Th2 cells. **Eur. Cytokine Netw.**, Montrouge, v. 11, n. 3, p. 495-496.
- DAVID, J. Chemokine receptors: A brief overview. **Clin. Appl. Immunol. rev.**, New York, v. 1, p. 105-125, 2000.
- DAYYANI, F. et al. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, Winston-Salem, v. 74, n. 1, p. 33-39, 2003.
- DIAS, J. **Epidemiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- DIAS, J. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 32, n. 9, p.2444-2457, 2009.
- DE CASTRO, S.L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, Basel, v.53, p.83-98, 1993.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 8, p. 337–348, 2008.

DOS SANTOS, P.V. et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes Infect.**, Paris, v.3, n.12,971-984, 2001.

DUARTE, G. **Diagnóstico e conduta nas infecções ginecológicas e obstétricas**. Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2003.

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

ESMERALDO, A.A.M. **Avaliação do papel dos linfócitos T CD8+ no tratamento com benzonidazol em cultura de células mononucleares infectadas com Trypanosoma cruzi**. 2015. Monografia (Bacharelado em Biomedicina)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

FRADE, A.F. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. **BMC infect. dis.**, London, v. 13, p. 587-604, 2013.

FIGUERÓ-FILHO, E.A. et al. Frequency of HIV-1, rubella , syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília,v. 40,n. 2, p. 181-187, 2007.

FILIPPATOS, G. et al. Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications. **Curr Mol Med.**, Nebraska, v. 3, p. 139–147, 2003.

FLÓREZ, O.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, C.I. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. **Hum. Immunol.**, New York, v. 73. p. 852–858, 2012.

FONSECA, S.G. et al. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8⁺T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 63, n. 2-3, p. 362-371, 2007.

GAO, J.L. et al. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. **J. Exp. Med.**, New York, v. 185, n. 11, p.1959–1968, 1997.

GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations in mice. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, Washington, v. 49, p. 1521-1528, 2005.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

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

GUEDES, P.M.M, et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in Beagle dogs. **Vet. Immunol. immunopathol.**, Amsterdam, v. 138, p. 106–113, 2010.

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

HALLGREN, J.; GURISH, M.F. Mast cell progenitor trafficking and maturation. **Adv Exp Med Biol.**; New York, v. 716, p. 14-28, 2011.

HALOVA, I.; DRABEROVA, L.; DRABER, P. Mast cell chemotaxis -chemoattractants and signaling pathways. **Front. Immunol.**, Washington, v. 3, p. 119-138, 2012.

HARDISON, J.L. et al. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.**, Washington, v. 74, n. 1, p. 135–143, 2006.

HASE, K. et al. Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosos. **J. Leukoc. Biol.**, Winston-Salem, v. 70, p. 749-755, 2001.

HODGE, D.L. et al. MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v. 42, n. 10, p. 2644–2654, 2012.

HUGGINGS, W. D. Quadro Clínico: Fase Aguda. In: Malta J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Savier, 1996.

JUREMALM, M.; OLSSON, N.; NILSSON, G. CCL17 and CCL22 attenuate CCL5-induced mast cell migration. **Clin Exp Allergy.**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 708-712, 2005.

LAUCELLA, S.A. et al. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 18, p. 227–239, 1996.

LAUCELLA, S.A. et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v.149, n. 11, p. 1675-1684, 2009.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to

control chronic inflammation? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 299–304, 2003.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. ? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, 226-235, 2009.

LORENA, V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 72, n. 6, p. 529-539, 2010.

KIM, C. H. et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in agermlinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. **J. Exp.Med.**, New York, v. 193, p. 1373–1381, 2001.

MACHADO, F.S. et al. . *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation.**, Dallas, v. 102, p. 3003-3008, 2000.

MACHADO, F.S., et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 191, n. 4, p. 627-636, 2005.

MACHADO, F.S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Natl. Insts. Health**, Bethesda, v. 4, p. 1743–1758, 2013.

MACKAY, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat Immunol.**, New York, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2001.

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). **Am. Heart J.**, St. Louis, v. 156, 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 319-324, 2009.

MARINO, A.P. et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. **Circulation**, Dallas, v. 110, n. 11, p. 1 443-1449, 2004.

MARTINS, G.A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, Paris, v. 6, p. 1133–1144, 2004.

MARTINS, L.P.A. et al. Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. **Braz J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 15, n. 2, p. 116-118, 2011.

MAYA, J. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol A Mol Integr Physiol.**, New York, v. 146, p. 601-620, 2007.

MEDEIROS, G.A. et al. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. **Microbes Infect.**, Paris, v. 11, p. 264-273, 2009

MELO, A.S. et al. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine.**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 207–212, 2012.

MINOPRIO, P. et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 28, p. 553–561, 1988.

MURPHY, P.M. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v. 54, p. 227-229, 2002.

NAKAE, S. et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 100, p. 5986–5990, 2003

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.

NEGRETTE, O. S. et al. Serological Evaluation of Specific-Antibody Levels in Patients Treated for Chronic Chagas' Disease. **Clin. Vacc. Immunol.**, Washington, v. 15, n. 2, p. 297-302, 2008.

NESS, T.L. et al. CCR4 Is a Key Modulator of Innate Immune Responses. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 177, p. 7531-7539, 2006.

NEVES, P.A.F. **Avaliação in vitro do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos à exposição ao *Trypanosoma cruzi*.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

NICKELL, S.P. et al. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**; Baltimore, v. 138, p. 914–921, 1987.

NOUGUEIRA, L.C. et al. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. 1867-1877.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of Chagas disease.** Second report of the Organização Mundial de Saúde Expert Committee. Geneva, 2010. (Technical report series, n. 905).

- OSTERMAYER, A.L. et al. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 44, p. 108-121, 2011.
- PARK, M.A. et al. Patterns of Chemokine Expression in Models of *Schistosoma mansoni* Inflammation and Infection Reveal Relationships between Type 1 and Type 2 Responses and Chemokines In Vivo. **Infect. Immun.**, Washington, p. 6755–6768, 2002.
- PETHERICK, A. Chagas disease. **Nature (Lond.)**, London. v. 465, n. 7301, p. 10-11. 2010.
- PRINCER, K.; DOMINIQUE, S. HIV chemokine receptor inhibitors as novel anti-HIV drugs. **Cytokine growth factor**; Oxford, v. 6, p. 659-677, 2005
- QUIGLEY, M.F et al. CXCR5⁺ CCR7⁻CD8 T cells are early effectormemory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. **Eur. J. Immunol.**, Baltimore, v. 37, p. 3352–3362,2007.
- QIN, S. et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, Barcelona, v. 101, p. 746–754, 1998.
- RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. **Clin. infect. dis.**, Chicago, v. 43, p. 305–311, 2006.
- RASSI , J.R.; MARIN-NETO. Chagas disease. **Lancet infect. Dis.**, New York, v. 375, 2010.
- REES, A.J. Monocyte and macrophage biology: an overview. **Semin Nephrol.**, Philadelphia, v.30, n.3, p. 216–233, 2010.
- REIS, D.D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, p. 5637-5644, 1993.
- RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 301-14, 1998.
- ROCHA, F.A. Papel de **CCR4 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*: controle da migração de células CD4+CD25+ para o local da lesão.** 2010. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade de São Paulo, 2010.
- ROLLINGS, B.J. Chemokines. **Blood**, Berlin, v. 90, n. 3, p. 909-928, 1997.

- ROMANHA, A.J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 105, n.2, p. 233-238, 2010.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 18, 217-242, 2000.
- ROTTENBERG, M. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v.28, p.573–582, 1988.
- SALLUSTO, F. A. et al. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunol.**, Oxford, v.19, p. 568–574, 1998.
- SALLUSTO, F. A. et. al. Functional subsets of memory T cells indentified by CCR7 expression **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Paris, v. 251, p. 167-171, 2000.
- SALVINO, W. et. al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 18, p. 107–124, 2007.
- 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, **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 64, p. 554 – 563, 2006.
- SATHLER-AVELAR, R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 104, n. 1, p. 246-251, 2009.
- SCHAERLI, P. et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. **J. Exp. Med.**, New York, v. 192, p. 1553–1562, 2000.
- SEBASTIANI, S. et al. Chemokine Receptor Expression and Function in CD4⁺ T Lymphocytes with Regulatory Activity. **J. Immunol.**, Baltimore, v.166, p.996-1002, 2001.
- SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. The B7-CD28 superfamily. **Rev. Natural Immunol.**, Washington, v .2, p. 116-126, 2002.
- SHER, A. et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 127, p. 183-204, 1992.
- SINGH, S.P. et al. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 180, p. 214–221, 2008.
- STROUT, R.G. A method for concentrating hemoflagellates. **J. Parasitol.**, Washington, v. 48, p. 100-107, 1962.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes. Infect.**, Paris, v. 2, n. 8, p. 851-66, 2000.

TALVANI, A. et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 189, p. 214–20, 2004.

TALVANI, A. et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 189, n. 2, p. 214–220, 2004^a.

TAUB, D.D. et al. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science (Wash.)**, Washington, v. 260, n. 51, p. 355-358. 1993

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends parasitol.**, Oxford, v. 18, n. 6, 262-265, 2002.

VENTURINI, J. et al. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. **BMC Infect. Dis.**, London, v. 14, p. 552-558, 2014.

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. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 68, p. 516-525, 2008.

VOLLER, A. et al. Microplate enzyme-linked immunosorbent for Chagas' disease. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 375, 1975.

WAGNER, J.G; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanism with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v. 52, n. 03, p. 349-374, 2000.

WAKURAGAWA, M., et al. CC Chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4⁺ T cells, reflects diseases activity of atopic dermatitis. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 117, p. 188-196, 2001.

ZHANG, Y. et al. Hantaan virus infection induces CXCL10 expression through TLR3, RIG-1, and MDA-5 pathways correlated with the disease severity. **Mediat. Inflamm.**, New York, v. 2014, p. 0-11, 2014.

ZELANTE, T. et al. IL-23 and IL-17 pathways promote inflammation and impair antifungal immune resistance, **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 37, p. 2695-2706, 2007.

APÊNDICE A- TCLE do Portador da DC



Instituto de Física

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Portador da doença de Chagas

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa Avaliação *in vitro* do benzonidazol sobre células da resposta imune submetidas à infecção com *Trypanosoma cruzi*, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, a qual pretende analisar células do sangue diante do parasita causador da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e do remédio usado para a doença de Chagas (Benzonidazol).

Sua participação é necessária, pois, como portador da doença de Chagas, o (a) Sr (a) já apresenta uma defesa do corpo contra o parasito que causa essa doença. Sua participação é voluntária e se dará através de três itens: (1) coleta de até 9 (nove) colheres de chá de sangue (45 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). O sangue será utilizado para: obtenção de soro (parte líquida) para confirmação da infecção, para realização do cultivo das células do sangue quando em contato com o parasito e com o remédio com o objetivo de: (i) verificar produção de citocinas e quimiocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), (ii) analisar a presença de marcadores de superfície celular (que identifica quais células são e se houve aumento ou diminuição da população de células), (iii) dosar a quantidade de óxido nítrico (que também está envolvido na defesa contra as doenças). (2) Os resultados dos seus exames clínicos como raio-X (tórax e esôfago), eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através do seu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores e seu médico. (3) Será preenchido um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida e aspectos clínicos serão analisados.

Um pouco da amostra de sangue [meia colher (2,5mL) de soro e meia colher (2,5mL) de cultivo de células] será guardada e armazenada a -20°C para utilizações em pesquisas futuras. Essas amostras serão utilizadas nas pesquisas futuras com objetivos de: realizar novos estudos que complementem os objetivos aqui propostos a fim de fechar as "lacunas" para entender o impacto do Benzonidazol na resposta imune; identificar a evolução clínica do paciente para o desenvolvimento de marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas (estudos de prognóstico); buscar o desenvolvimento de novas tecnologias para aperfeiçoar o diagnóstico da doença de Chagas. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a), quando desejar através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o(a) Sr(a) aceitar



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o tratamento com Benzimidazol e conseqüentemente para auxiliar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Caso o(a) Sr(a) não aceite participar da pesquisa o seu atendimento no ambulatório, bem como o seu tratamento continuará acontecendo normalmente.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2566, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CPqAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Infomação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas: () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE; () dispenso a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia M Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena

CPqAM/Fiocruz

Pesquisadora Responsável

APÊNDICE B-TCLE do não portador da DC



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Não Portador da doença de Chagas

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa Avaliação *in vitro* do benzonidazol sobre células da resposta imune submetidas à infecção com *Trypanosoma cruzi*, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, a qual pretende analisar células do sangue diante do parasita causador da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e do remédio usado para a doença de Chagas (Benzonidazol).

Sua participação é necessária, pois, como não portador da doença de Chagas, o seu sangue será utilizado como controle negativo, fazendo uma comparação com o sangue de um paciente que é portador da doença. Sua participação é voluntária e se dará através de dois itens: (1) coleta de até 8 (oito) colheres de chá de sangue (45 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). O sangue será utilizado para: obtenção de soro (parte líquida) para confirmação da infecção, para realização do cultivo das células do sangue quando em contato com o parasito e com o remédio com o objetivo de: (i) verificar produção de citocinas e quimiocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), (ii) analisar a presença de marcadores de superfície celular (que identifica quais células são e se houve aumento ou diminuição da população de células), (iii) dosar a quantidade de óxido nítrico (que também está envolvido na defesa contra as doenças). (2) Será preenchido um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida serão analisados.

Um pouco da amostra de sangue [meia colher (2,5mL) de soro e meia colher (2,5mL) de cultivo de células] será guardada e armazenada a -20°C para utilizações em pesquisas futuras. Essas amostras serão utilizadas nas pesquisas futuras com objetivos de: realizar novos estudos que complementem os objetivos aqui propostos a fim de fechar as "lacunas" para entender o impacto do Benzonidazol na resposta imune; identificar a evolução clínica do paciente para o desenvolvimento de marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas (estudos de prognóstico); buscar o desenvolvimento de novas tecnologias para aperfeiçoar o diagnóstico da doença de Chagas. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a), quando desejar através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o(a) Sr(a) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o tratamento com Benzonidazol e conseqüentemente para auxiliar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Caso o(a) Sr(a) não aceite



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

participar da pesquisa o atendimento de seu familiar no ambulatório continuará acontecendo normalmente.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2568, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CPqAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas: () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE; () dispense a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

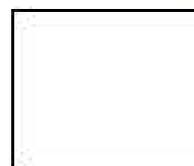
Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia Maria Barros de Lorena

CPqAM/Fiocruz

Pesquisadora Responsável

ANEXO A- Parecer do Comitê de ética



Título do Projeto: “Avaliação in vitro do benzonidazol sobre células da resposta imune submetidas à infecção com *Trypanosoma cruzi*”.

Pesquisador responsável: Virginia Maria Barros de Lorena.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 10/09/12

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 29/12

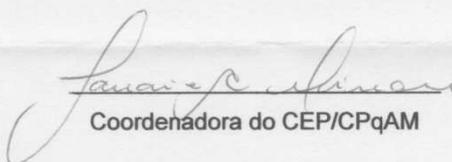
Registro no CAAE: 07511612.2.0000.5190

PARECER Nº 26/2013

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 05 de junho de 2016. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 05 de junho de 2013.


Coordenadora do CEP/CPqAM

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 05/06/2014.

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

