

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

Patrícia Areias Feitosa Neves

Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da
doença de Chagas, submetidos experimentalmente à exposição ao *Trypanosoma*
cruzi

RECIFE
2015

Patrícia Areias Feitosa Neves

Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos experimentalmente à exposição ao *Trypanosoma cruzi*

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

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

N513a Neves, Patrícia Areias Feitosa.
Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos experimentalmente à exposição ao *Trypanosoma cruzi* / Patrícia Areias Feitosa Neves. - Recife: [s.n.], 2015.
67 p. : ilus., graf., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadoras: Yara de Miranda Gomes, Virginia Maria Barros de Lorena.

1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Doença de Chagas - quimioterapia. 3. Sistema imune. 4. Tripanossomicidas - uso terapêutico. 5. Nitroimidazóis - administração & dosagem. 6. Tripanossomicidas - administração & dosagem. 7. Antígenos de Protozoários - anal. 8. Formação de anticorpos. 9. Linfócitos T - efeitos de drogas. 10. Citocinas - secreção. 11. Seguidores. 1. Gomes, Yara de Miranda. ths. 2. Lorena, Virginia Maria Barros de. ths. III. Título.

CDU 616.937

Patrícia Areias Feitosa Neves

Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos experimentalmente à exposição ao *Trypanosoma cruzi*

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.

Aprovada em: 27/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yara de Miranda Gomes
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Clarice N. Lins de Moraes Fonseca
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Valdenia Maria Oliveira de Souza
Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

À minha família, em especial aos
meus pais, Lourdes e Antônio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e saúde pra chegar até aqui.

A minha mãe, pelo exemplo de força, garra e coragem. Obrigada pelo apoio e amor incondicional que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Ao meu pai, que infelizmente não está presente fisicamente, mas que se faz presente em mim e sempre viverá no meu pensamento.

A todos os meus familiares e amigos, em especial às minhas irmãs Alice e Carol, e aos meus sobrinhos, Bia e Antônio, por todo amor, pelas palavras de conforto e torcida.

Ao meu namorado, Hermano, por toda paciência, carinho e compreensão. Obrigada por ter me acompanhado nesta jornada e por ter me aguentado nos momentos de estresse.

A minha orientadora, Dra. Yara Gomes, por ter contribuído na minha formação acadêmica. Obrigada pela oportunidade e confiança.

A minha co-orientadora Dra. Virginia Lorena, pela atenção, dedicação, envolvimento e amizade. Obrigada por ter confiado em mim e, principalmente, por me ensinar a acreditar em meu potencial.

Ao Grupo Chagas por toda ajuda durante a execução deste trabalho. Em especial aos amigos do projeto TripoBenzo, Amanda, Artur e Karine, por tudo que fizeram por mim durante esses dois anos. Agradeço imensamente a disposição em me ajudar nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pela amizade e carinho de vocês.

A todos do laboratório de imunoparasitologia, pelo incentivo e bom convívio.

Aos amigos da turma do mestrado BBS 2013.1 pelo companheirismo e amizade. Por terem tornado esse período da minha vida mais prazeroso e inesquecível. Obrigada pelos bons momentos.

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

A equipe da Casa de Chagas (PROCAPE) pela colaboração na seleção do pacientes.

Aos pacientes e aos doadores que voluntariamente colaboraram para execução deste trabalho. Obrigada pela preciosa contribuição.

A todos aqueles que de alguma forma fazem parte da minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Muitíssimo obrigada!

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você
teve que renunciar para conseguir”

Dalai Lama

NEVES, Patrícia Areias Feitosa. **Avaliação 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.

RESUMO

O único medicamento disponível para o tratamento da doença de Chagas (DC) no Brasil é o benzonidazol (Bz). O benefício da medicação aos portadores crônicos da doença ainda demonstra controvérsias, mas seu uso nessa fase pode ter a finalidade de prevenir/retardar a evolução da DC para formas mais graves. Os fenômenos imunológicos que ocorrem após a terapia com o Bz ainda não estão elucidados. Assim, este estudo propôs avaliar o efeito do Bz sobre o perfil imunológico de linfócitos T e a produção de citocinas por células da resposta imune expostas *in vitro* ao *T. cruzi*. Amostras de sangue de portadores crônicos da DC foram coletadas para obtenção de células mononucleares de sangue periférico com posterior infecção com tripomastigotas de *T. cruzi*, seguida de adição do Bz às culturas. Após o tempo de cultivo, os sobrenadantes foram estocados para posterior análise das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 por CBA e as células foram avaliadas por citometria de fluxo, quanto à expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ e a produção de citocinas (IL-10 e IFN- γ) em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Nossos resultados mostraram que o tratamento com o Bz aumentou a expressão da molécula CTLA-4⁺ em linfócitos T CD8⁺, indicando que o Bz pode induzir uma modulação da resposta imune e, conseqüentemente, diminuir a ativação exacerbada dessas células. Além disso, verificamos uma diminuição da produção da citocina IL-10 por linfócitos T CD4⁺ na presença do Bz. Com relação à produção global de citocinas por células aderentes e não aderentes, observamos que o Bz causou uma diminuição da citocina pró-inflamatória TNF e da citocina anti-inflamatória IL-10, enquanto que as outras citocinas (IFN- γ , IL-6, IL4 e IL-2) permaneceram com níveis elevados de produção na presença desse fármaco. Nossos resultados sugerem que o Bz induz uma regulação da ativação de linfócitos T CD8⁺ e a produção de citocinas do perfil Th1 modulado por citocinas do perfil Th2, em células de portadores crônicos da DC. Assim, acreditamos que a administração do Bz aos portadores de formas clínicas brandas da DC pode ser benéfica a esses pacientes, visto que o Bz não promoveu um perfil inflamatório exacerbado.

Palavras chave: Doença de Chagas. Tratamento. Resposta imune.

NEVES, Patrícia Areias Feitosa. **Evaluation the effect of benznidazole on lymphocytes of chronic carriers of Chagas disease, undergoing exposure to *Trypanosoma cruzi***. 2015. Dissertation (Master of Bioscience and Biotechnology in health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

The only drug available for the treatment of Chagas disease (DC) in Brazil is benznidazole (Bz). The benefit of the medication to patients with the chronic form of DC is controversial. The ministration of Bz in this phase can prevent/delay the evolution of DC to more severe forms. Immune system modulation that occur after therapy with Bz are not yet elucidated. Thus, this study aimed to investigate the effect of Bz on the immune profile of T cells and cytokine production after *in vitro* exposure to *Trypanosoma cruzi*. Blood samples from chronic DC patients were collected to obtain peripheral blood mononuclear cells, which were subsequently infected with *T. cruzi* trypomastigotes and treated with Bz. After the culture period, supernatants of these co-cultures were stored for further analysis of the cytokines IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 by Cytometer Beads Array and the cells were analyzed by flow cytometry for expression of CD28⁺ and CTLA-4⁺ and intracytoplasmic cytokine production (IL-10 and IFN- γ) of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Our results showed that treatment with Bz increased expression of CTLA-4 molecule on CD8⁺ T cells, indicating that the Bz can induce a modulation of the immune response and hence reduce the exacerbated activation of these cells. Moreover, we observed a decreased production of the cytokine IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes in the presence of Bz. With respect to the overall production of cytokines, it was observed that Bz caused a reduction in the proinflammatory cytokine TNF and anti-inflammatory cytokine IL-10, whereas other cytokines (IFN- γ , IL-6, IL -2 and IL-4) maintained a high level of expression in the presence of the drug. Our results suggest that Bz regulates activation of CD8⁺ T cells and the production of Th1 profile cytokines modulated by the Th2 cytokines in cells chronically infected DC. Thus, we believe that the administration of Bz in patients with mild clinical forms of DC can be beneficial, as the Bz did not promote an exacerbated inflammatory profile.

Keywords: Chagas disease. Treatment. Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução clínica da doença de Chagas humana.....	20
Figura 2 -	Mecanismo de apresentação de antígeno e ativação das células T.....	23
Figura 3 -	Mecanismo de regulação negativa da ativação das células T.....	24
Figura 4 -	Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.....	25
Figura 5 -	Co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, <i>Trypanosoma cruzi</i> e adição de tratamento com benzonidazol e seus controles.....	37
Figura 6 -	Avaliação da concentração do benzonidazol através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD28 ⁺ no co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol nas doses ótima e sub-ótima.....	41
Figura 7 -	Avaliação da concentração do benzonidazol 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 mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol nas doses ótima e sub-ótima.....	42
Figura 8 -	Avaliação dos tempos de cultivo <i>versus</i> resposta através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD28 ⁺ no co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol.....	43
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 mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol.....	44
Figura 10 -	Detecção de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou tratadas com benzonidazol.....	45
Figura 11 -	Expressão das moléculas CD28 ⁺ e CTLA-4 ⁺ em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de	

	células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao <i>Trypanossoma cruzi</i> e/ou tratadas com benzonidazol.....	46
Figura 12 -	Detecção da produção de citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN- γ por células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de PBMC de portadores crônicos da DC, expostas ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou tratadas com benzonidazol..	47
Figura 13 -	Detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao <i>Trypanosoma cruzi</i> e/ou tratadas com benzonidazol.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Bz	Benzonidazol
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DC	Doença de Chagas
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Forma Cardíaca
FD	Forma Digestiva
FI	Forma Indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FL	Fluorescência
FOXP3	<i>Forkheadbox P3</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Nf	Nifurtimox
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>
PROCAPE	Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócitos T helper
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UPE	Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas.....	18
2.2	Aspectos clínicos e laboratoriais da doença de Chagas.....	19
2.3	Aspectos imunológicos da doença de Chagas.....	21
2.4	Tratamento etiológico da doença de Chagas.....	25
2.5	Resposta Imune associada ao tratamento com o benzonidazol..	27
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	OBJETIVOS.....	30
4.1	Objetivo geral.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1	Obtenção de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
5.1.1	Cultivo de células Vero.....	31
5.1.2	Infecção das células Vero.....	31
5.2	População de estudo.....	32
5.3	Coleta de Sangue.....	33
5.4	Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
5.5	Isolamento de células mononucleares de sangue periférico.....	34
5.6	Padronizações de etapas do co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico e <i>Trypanosoma cruzi</i> e adição de tratamento com benzonidazol.....	35
5.6.1	Padronização da cinética dose do benzonidazol <i>versus</i> resposta.....	35
5.6.2	Padronização da cinética de tempo de cultivo <i>versus</i> resposta.....	35
5.7	Co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, <i>Trypanosoma cruzi</i> e adição de tratamento com benzonidazol...	36
5.8	Fenótipo celular e marcação intracitoplasmática.....	37
5.9	Aquisição e análise no citômetro de fluxo.....	38
5.10	Deteção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura....	39
5.11	Análises estatísticas.....	39
5.12	Aspectos éticos.....	39

6	RESULTADOS.....	41
6.1	Padronização da cinética dose do benzonidazol <i>versus</i> resposta.....	41
6.2	Padronização da cinética de tempo de cultivo <i>versus</i> resposta...	42
6.3	Avaliação dos níveis dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ nesses linfócitos.....	44
6.4	Avaliação da produção das citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN-γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.....	46
6.5	Avaliação dos níveis das citocinas IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo.....	47
7	DISCUSSÃO.....	50
8	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente.....	63
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle.....	65
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM.....	67

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma doença parasitária endêmica que ocorre principalmente em países da América Latina (MUNOZ-SARAVIA et al., 2012), sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza. Essa doença afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo, especialmente na América Latina, onde a transmissão vetorial por insetos triatomíneos provoca cerca de 40 mil casos novos por ano (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2009). No Brasil, a estimativa de infectados é de aproximadamente 3 milhões de pessoas (PETHERICK et al., 2010).

A análise dos aspectos clínicos e laboratoriais dos portadores da DC permite classificá-la em duas fases características: aguda e crônica. A fase aguda dura em média de dois a quatro meses após a infecção e é caracterizada por uma elevada parasitemia e baixos níveis de anticorpos, sendo imperceptível em grande parte dos indivíduos, devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas (COURA, 2007). Após a fase aguda, os indivíduos infectados evoluem para a fase crônica, que é caracterizada por uma redução dos parasitos no sangue e pelos elevados títulos de anticorpos (DUTRA; GOLLOB, 2008). A fase crônica da DC apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, na qual os portadores dessa fase apresentam quadros clínicos que variam desde a ausência de sintomas até graves complicações cardíacas e/ou digestivas (CONSENSO..., 2005).

Diversos trabalhos têm demonstrado que o estabelecimento e a manutenção das diferentes formas clínicas estão associados a distintas e complexas relações parasita-hospedeiro envolvendo diretamente o sistema imune do paciente (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Acredita-se que a ausência dos sintomas na DC está relacionada com a capacidade do indivíduo regular negativamente a resposta imune que controla o parasitismo persistente (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Essa resposta imune equilibrada é essencial não só para o controle da parasitemia, mas também para minimizar a resposta inflamatória que pode ser responsável por causar as formas graves da DC (SOUZA et al., 2007).

Atualmente, o fármaco utilizado para o tratamento da DC no Brasil e em alguns países da América Latina é o benzonidazol (Bz) (CANÇADO, 2000), uma

droga nitroheterocíclica (N-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida) que interfere diretamente com a síntese de macromoléculas pelo *T. cruzi*, tais como DNA, lipídeos e proteínas (MAYA, 2006). Na fase aguda da doença, esse medicamento é fortemente recomendado, com uma taxa de cura de cerca de 70%. Na fase crônica, no entanto, há uma discordância sobre a utilidade da terapia devido às reações adversas, baixas taxas de cura e à ausência de critérios para avaliação de cura (MARIN-NETO et al. 2009).

Alguns trabalhos demonstraram que o uso da terapia com o Bz na fase crônica tem a finalidade de prevenir e/ou retardar a evolução da DC para formas clínicas graves (BERN et al., 2007; FRAGATA-FILHO et al., 1995; GARCIA et al., 2005). Acredita-se que um dos principais fatores que influenciam na eliminação do parasito, assim como no controle da morbidade, após o tratamento da DC é a ação sinérgica entre os efeitos da terapia com o Bz e a resposta imune do hospedeiro (SATLHER-AVELAR et al. 2012). Entretanto, os eventos imunológicos que ocorrem após o uso da medicação ainda não estão completamente elucidados. Desta forma, conhecer os fenômenos decorrentes da interação de formas tripomastigotas do *T. cruzi* com células da resposta imune, associada com a adição *in vitro* do Bz, é de grande importância para o entendimento dos eventos decorrentes do tratamento com esse fármaco *in vivo*. Nesse contexto, este estudo propôs avaliar moléculas presentes em linfócitos T e o perfil de resposta celular pela avaliação da produção de citocinas, de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de portadores crônicos, submetidos à exposição ao *T. cruzi* e ao tratamento com o Bz, a fim de observar as possíveis alterações na resposta imune celular que estejam associadas à droga anti-parasitária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana ou DC é causada pelo protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Tripanossomatidae (COURA; DIAS, 2009). O agente etiológico, assim como os insetos vetores, reservatórios naturais, epidemiologia, manifestações clínicas e os diferentes estágios de desenvolvimento da DC foram descritos pela primeira vez pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 (FERNANDES; ANDREWS, 2012). Sua descoberta representa um feito único na história da medicina, constituindo um marco importante na história da ciência e da saúde brasileiras (RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma clássica de transmissão da doença ocorre através do contato da pele lesionada com formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas excretas do vetor, que são insetos hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae e conhecidos popularmente como barbeiros, sendo o principal vetor o *Triatoma infestans* (COURA, 2007). Entretanto, transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e as vias transfusional, oral e congênita também constituem formas de transmissão da DC (COURA, 2007).

A DC é considerada pela OMS como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina. A doença encontra-se endêmica desde o norte do México até o sul da Argentina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009), sendo a estimativa de infectados no mundo de 8 milhões de pessoas, com cerca de 75-90 milhões de pessoas sob o risco de contrair a infecção (COURA; DIAS, 2009; RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Nas últimas décadas, em virtude das migrações internacionais, o número de indivíduos infectados aumentou em regiões não endêmicas, como nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália e Japão (COURA; VINÃS, 2010; DIAS, 2006).

No Brasil, a estimativa é que aproximadamente 3 milhões de pessoas sejam portadores da DC (PETHERICK et al. 2010). A média de internação nacional pela DC foi de 0,99 no período de 1995 a 2008. No mesmo período, Pernambuco obteve uma média de 0,39, sendo as maiores taxas no interior do Estado. Com relação ao número de óbitos, o Brasil apresentou média de 3,66 no período de 1980 a 2007 e o

estado de Pernambuco apresentou média de 1,56 no mesmo período. Entre 2001 e 2006, as taxas para os casos agudos foram 0,56 e 0,21 para o Brasil e Pernambuco, respectivamente (BRAZ et al., 2011).

A partir da década de 1970, medidas foram tomadas a fim de interromper a transmissão vetorial no Brasil, através do emprego de inseticidas. Concomitantemente, foram adotadas ações preventivas que também permitiram o controle da transmissão através da transfusão sanguínea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Assim, em 2006, o Brasil recebeu uma certificação relativa à eliminação da transmissão da DC pelo principal vetor e pela via transfusional, concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (DIAS, 2006). Entretanto, as diversas formas de transmissão, principalmente a oral e a vetorial por insetos vetores considerados de importância secundária, como *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus geniculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma sordida* (CONSENSO..., 2005), estão contribuindo para a manutenção do *T. cruzi* em determinadas regiões do país.

A transmissão oral ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*. Recentemente no Brasil, relatos demonstraram casos de surtos de contaminação oral, na Amazônia legal e outros estados, pela ingestão de açaí e cana de açúcar (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2008). No período de 2000 a meados de 2010, foram registrados 1093 casos de DC aguda, sendo, 71% por transmissão oral e 6% por transmissão vetorial (BRASIL, 2010). Porém, acredita-se que esses números não refletem a situação real, pois a maioria dos indivíduos infectados na fase aguda apresenta nenhuns ou poucos sintomas, que muitas vezes são confundidos com outras doenças e, desta forma, não há a procura por assistência médica para diagnóstico da doença.

2.2 Aspectos clínicos e laboratoriais da doença de Chagas

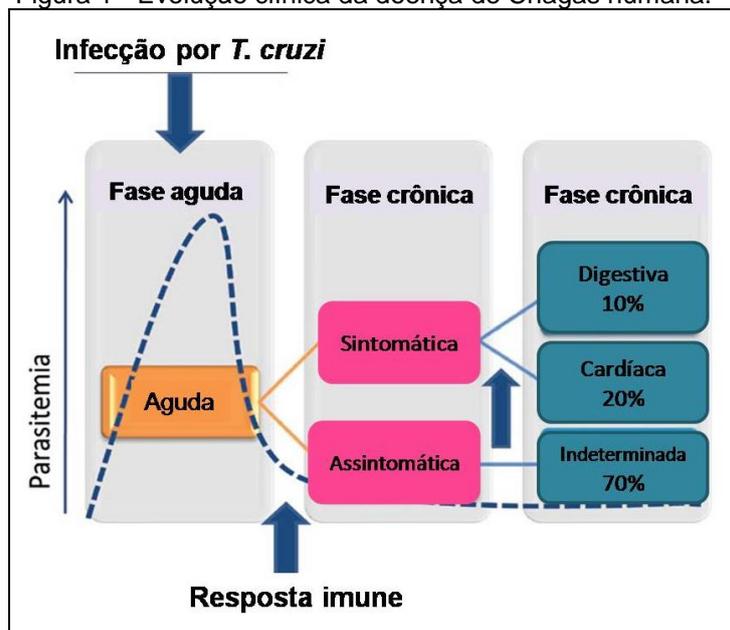
As manifestações clínico-laboratoriais apresentadas pelo indivíduo dividem a doença em duas fases características: a aguda e a crônica. Após a infecção, inicia-se a fase aguda, que dura de dois a quatro meses, sendo caracterizada por uma elevada parasitemia. Na maioria dos indivíduos, a fase aguda é imperceptível devido à ausência de manifestações clínicas ou a presença de sintomas inespecíficos, como febre, adenomegalia e hepatoesplenomegalia (COURA, 2007). Quando a

transmissão é vetorial, alguns indivíduos podem apresentar sinais de porta de entrada do parasita, como o edema bipalpebral denominado sinal de Romanã ou o chagoma de inoculação (LANA; TAFURI, 2005).

Durante a fase aguda, o diagnóstico é realizado através da detecção do parasito utilizando métodos parasitológicos diretos ou indiretos, uma vez que o *T. cruzi* permanece circulando na corrente sanguínea. Os métodos parasitológicos mais utilizados são o exame de sangue a fresco e o esfregaço de gota espessa (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009).

Após o término da fase aguda, inicia-se a fase crônica da DC. A progressão para essa fase é concomitante com o estabelecimento de uma resposta imune relativamente eficiente, resultando em uma redução da parasitemia. Apesar da diminuição dos níveis do parasita no sangue, é durante essa fase que podem ocorrer os sintomas mais graves da doença (DUTRA; GOLLOB, 2008). A maioria dos pacientes crônicos com DC, cerca de 60-70%, permanece na forma indeterminada (FI), caracterizada por ausência de manifestações clínicas. Cerca de 30-40% dos indivíduos infectados irão desenvolver uma das formas crônicas graves da doença: cardíaca (FC) (20-30%) e digestiva (FD) (8-10%) (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010) (Figura 1). Além das formas crônicas citadas, há também a forma mista, na qual o indivíduo apresenta concomitantemente alterações cardíacas e digestivas da doença (COURA, 2007).

Figura 1 - Evolução clínica da doença de Chagas humana.



Fonte: Adaptado de Dutra et al. (2009).

Os indivíduos portadores da FI, embora apresentem sorologia positiva para *T. cruzi*, não apresentam os sintomas clínicos da DC, além de eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais. Os portadores da FC apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, que vai desde a presença de anormalidades silenciosas até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária podendo ocorrer morte súbita. A cardiopatia chagásica crônica é a principal responsável pela elevada morbimortalidade da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Já os pacientes com a FD apresentam destruição dos plexos mioentéricos, podendo levar ao megaesôfago (dilatação do esôfago) e/ou megacólon (dilatação do cólon).

Devido à escassa parasitemia na fase crônica, o diagnóstico laboratorial é realizado através de testes sorológicos para a detecção da presença de anticorpos de classe IgG contra antígenos de *T. cruzi*. O Ministério da Saúde recomenda a utilização de pelo menos dois testes sorológicos com preparações antigênicas diferentes ou de princípios metodológicos diferentes, podendo ser o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), a imunofluorescência indireta e/ou a hemaglutinação indireta (CONSENSO..., 2005).

2.3 Aspectos imunológicos da doença de Chagas

Os mecanismos envolvidos na variação das manifestações clínicas entre os indivíduos portadores crônicos da DC, bem como a evolução dos indivíduos assintomáticos (FI) para as formas graves da doença (FC e/ou FD), ainda são pouco compreendidos. Acredita-se que essas manifestações são decorrentes de múltiplos fatores relacionados tanto ao parasito (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo) quanto ao hospedeiro, sendo o principal a resposta imunológica (ANDRADE et al., 2002; DUTRA; GOLLOB, 2008; MACEDO; PENA, 2004). Essa resposta imune pode ser influenciada por características genéticas do hospedeiro, idade, sobreposição de infecções por micro-organismos não relacionados e/ou reinfecção pelo *T. cruzi* (GOMES et al., 2003).

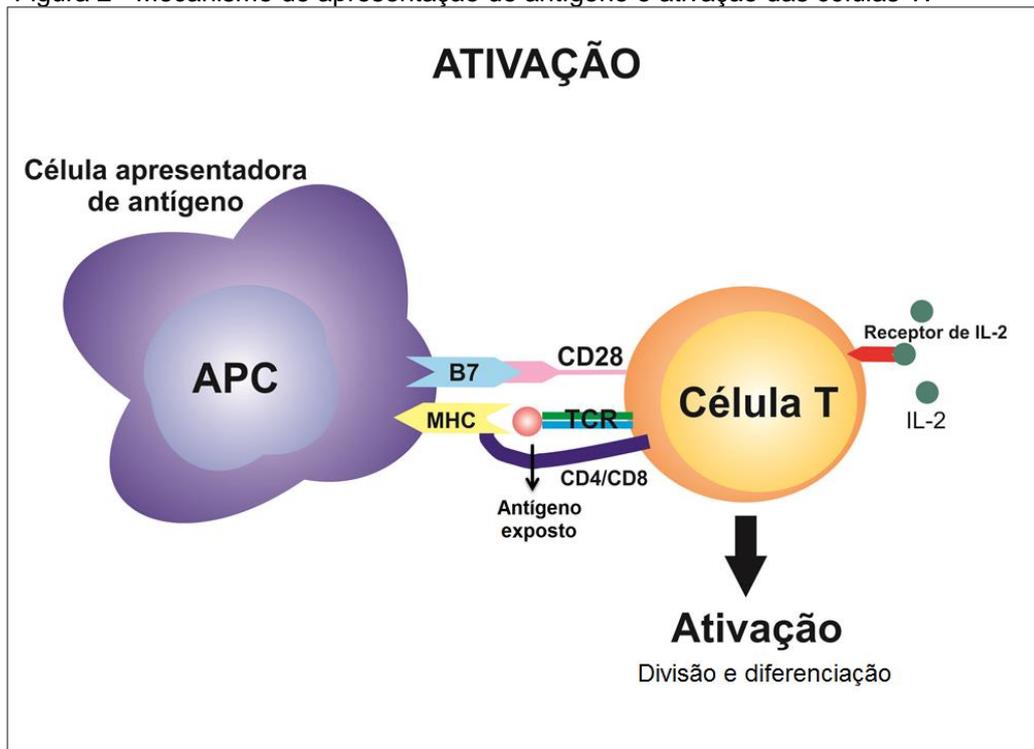
Apesar da presença do *T. cruzi* ser crítica para desencadear as reações que levam a evolução da fase crônica para formas graves da DC, o parasito pode não ser o único responsável por sua manutenção. A ativação do sistema imune contra o parasito pode gerar danos teciduais e também pode reconhecer componentes do

próprio hospedeiro (DUTRA et al., 2000). Há duas hipóteses principais acerca dos mecanismos envolvidos na variação das formas clínicas crônicas: a primeira postula que a persistência do *T. cruzi* nos órgãos afetados é a maior causa da morbidade e, conseqüentemente, do dano tissular (FUENMAYOR et al., 2005); e a segunda postula que processos autoimunes têm importância fundamental para a destruição dos tecidos (CUNHA-NETO et al., 2006). Essas teorias podem estar associadas explicando a severidade das formas clínicas da doença nessa fase (LORENA et al., 2010).

Nos dias atuais, compreender o papel da resposta imune sobre a infecção causada pelo *T. cruzi* ainda é um desafio (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999). De maneira geral, os indivíduos que permanecem com a FI são capazes de reduzir o número de parasitos na fase inicial da infecção e possuem mecanismos regulatórios que limitam o desenvolvimento da doença. Por outro lado, indivíduos que desenvolvem a doença cardíaca, apesar de serem capazes de controlar a parasitemia, podem não ser capazes de elaborar uma resposta imunoregulatória eficiente, persistindo uma resposta inflamatória exacerbada no tecido cardíaco (DUTRA; GOLLOB, 2008).

Estudos têm demonstrado que o dano tissular poderia ser mais severo na ausência de mecanismos regulatórios que envolvessem as respostas imunológicas. Há indícios de que a infecção pelo *T. cruzi* altera a expressão de moléculas acessórias na ativação de células T, como CD28 e CTLA-4 (SOUZA et al., 2007). A ativação dos linfócitos T requer sinais que são oriundos das Células apresentadoras de antígeno (APCs). O primeiro sinal é o reconhecimento dos antígenos peptídicos associados ao MHC (expresso principalmente nas APCs), pelo receptor de célula T (TCR). O segundo sinal é realizado pela interação entre os co-estimuladores CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressos na superfície das APCs, e a molécula CD28 expressa constitutivamente na superfície dos linfócitos T virgens (CARRENO; COLLINS, 2002). Após essa ligação, há produção de citocinas, principalmente IL-2, para a proliferação e diferenciação dos linfócitos T virgens em células efetoras (LENSCHOW et al., 1994; LINSLEY; LEDBETTER, 1993) (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo de apresentação de antígeno e ativação das células T.

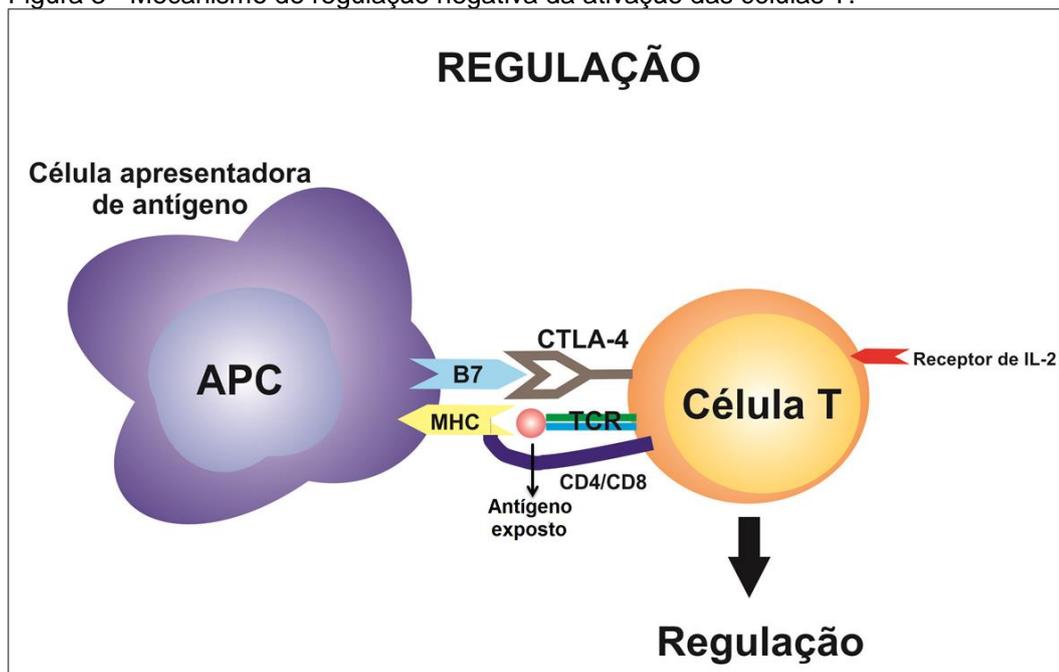


Fonte: Adaptado de University of South Carolina (2009).

Legenda: TCR: Receptor de células T; B7: Moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e/ou CD86⁺); MHC: Complexo principal de histocompatibilidade; CD28: Ligante da molécula co-estimulatória; IL2: Interleucina 2.

A ausência da molécula acessória CD28 em linfócitos T foi estudada por Menezes et al. (2004), mostrando que essas células, em indivíduos com a FI, têm papel de controlar a resposta inflamatória através da secreção de IL-10. Já em pacientes portadores da FC, a presença de linfócitos T CD28⁻ pode estar relacionada com o dano cardíaco por secretarem altos níveis de TNF- α . Além disso, a molécula acessória CTLA-4 também foi estudada entre os portadores crônicos da doença de Chagas (SOUZA et al., 2007). Essa molécula é expressa nos linfócitos T e reconhece o mesmo ligante (família B7) que a molécula CD28, entretanto exercem funções opostas, uma vez que a CTLA-4 ao interagir com CD80 e CD86 libera sinais negativos que inibem a ativação de células T (WANG; CHEN 2004) (Figura 3). Souza et al. (2007), mostraram que pacientes portadores da forma FI apresentavam níveis de expressão mais elevados dessa molécula, principalmente em células T CD8, quando comparados aos portadores da forma FC, indicando que essa molécula leva a uma modulação da resposta imune mediada por células T.

Figura 3 - Mecanismo de regulação negativa da ativação das células T.



Fonte: Adaptado de University of South Carolina (2009).

Legenda: TCR: Receptor de células T; B7: Moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e/ou CD86⁺); MHC: Complexo principal de histocompatibilidade; CD28: Ligante da molécula co-estimulatória; IL-2: Interleucina 2.

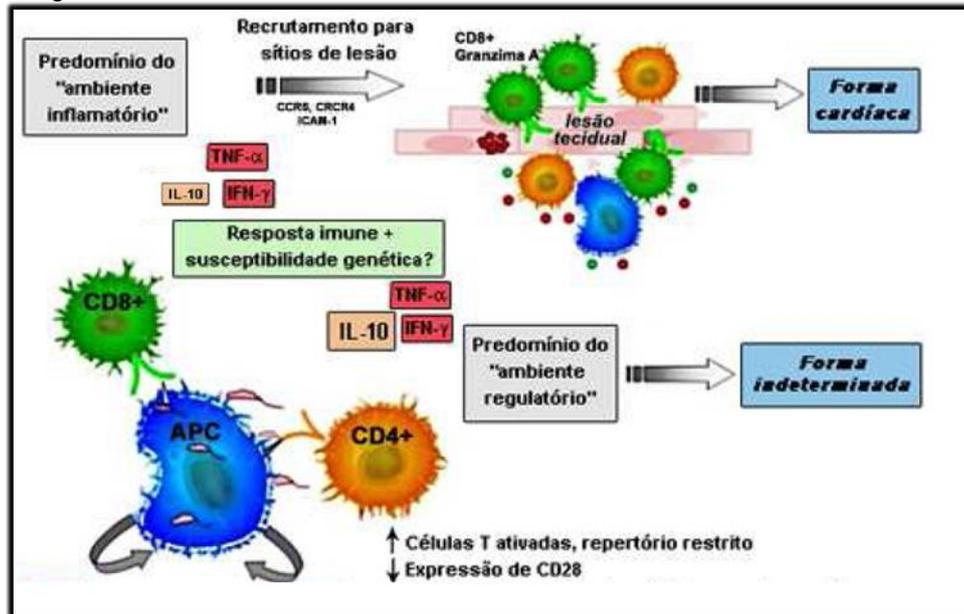
Os sinais co-estimulatórios são cruciais no desencadeamento de respostas imunes efetoras de células T. Considerando a importância de CD28 para a ativação das células T, a perda da expressão dessa molécula durante a infecção pode indicar uma possível base para eventos imunorregulatórios observados nos diferentes estágios de ativação de células T na infecção (DUTRA et al., 1996). Sendo assim, a expressão diferencial das moléculas CD28 e CTLA-4 entre os portadores crônicos da DC pode conduzir a diferentes funções dos linfócitos T (MENEZES et al., 2004).

Com relação aos perfis de citocinas nas formas crônicas da DC, vem sendo demonstrado que citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na geração do infiltrado inflamatório e no dano tecidual. Assim, nos portadores da FC há um aumento da resposta Th1 com produção de citocinas IFN- γ e TNF- α quando comparados aos portadores da FI da doença, o que resulta em um predomínio de um “ambiente inflamatório” (CUNHA-NETO et al., 1998; HIGUCHI et al., 1997; REIS et al., 1993) (Figura 4). Em contrapartida, nos portadores da FI há produção da citocina regulatória IL-10, que tem papel de controlar a resposta inflamatória resultando em um predomínio de um “ambiente regulatório” (MENEZES et al., 2004).

Esses estudos reforçam a ideia de que o hospedeiro desenvolve uma resposta imunológica forte e específica contra os antígenos do *T. cruzi* nas formas

graves da doença. Entretanto, ainda não está totalmente elucidado o motivo pelo qual dessa resposta imune ser tão diferenciada entre os portadores crônicos da DC (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; MENEZES et al., 2004).

Figura 4 - Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Menezes, Teixeira e Dutra (2009).

Legenda: CD: *Cluster of differentiation*; APC: Célula Apresentadora de Antígeno; IL: Interleucina; IFN- γ : Interferon gama; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

2.4 Tratamento etiológico da doença de Chagas

Atualmente, estão disponíveis apenas dois quimioterápicos para o tratamento da DC: o Bz e o Nifurtimox (Nf), que são os fármacos que apresentam melhores desempenhos nos países endêmicos (NEGRETTE et al., 2008). Ambas as drogas atuam sobre as formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas do *T. cruzi* (CANÇADO *in* DIAS; COURA 1997), através da formação de radicais livres intermediários e/ou metabólitos nucleofílicos que, quando produzidos, ligam-se a lipídeos, proteínas e DNA do parasito, danificando-os (MAYA, 2006; URBINA, 1999). A inexistência, no *T. cruzi*, de mecanismos de desintoxicação contra esses radicais livres, torna o parasito mais sensível ao dano celular induzido por esses metabólitos do que as células humanas (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; MAYA et al., 2006).

Os resultados obtidos acerca do tratamento com ambas as drogas variam de acordo com a fase da doença, o período de tratamento e a dose, a idade e a origem geográfica do paciente (COURA; CASTRO, 2002). Estudos longitudinais usando os

fármacos Bz e Nf mostraram que as chances de cura parasitológica são maiores se o diagnóstico da doença e o tratamento são realizados precocemente (DINIZ et al., 2013). Pesquisas realizadas no Brasil e em outros países do continente Sul-Americano (CANÇADO et al., 1976; CANÇADO, 1985) sobre a tolerância e a eficácia desses dois antiparasitários em pacientes nas fases aguda e crônica da doença, demonstraram importantes efeitos colaterais com as duas drogas, sendo o índice de cura parasitológica em torno de 60% nos pacientes que apresentam a fase aguda, mas com eficácia limitada na fase crônica (COURA et al., 1997). Na DC congênita, o tratamento precoce de recém-nascidos com Bz e Nf foi eficaz em 66% a 100% dos casos (SCHIJMAN et al., 2003).

A partir da década de 1980, o uso do Nf foi descontinuado, primeiro no Brasil e depois em outros países da América do Sul, como Argentina, Chile e Uruguai devido à sua toxicidade e ao seu efeito tripanossomicida ser menor em algumas regiões endêmicas (COURA; CASTRO 2002). Sendo assim, o único medicamento ativo contra o *T. cruzi* disponível para utilização clínica atualmente no Brasil é o Bz, uma droga nitroheterocíclica sintetizada em 1972 por Wineholt e Liebman e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (CANÇADO, 2000). A partir de abril de 2003, os direitos e a tecnologia da fabricação do Bz foram cedidos ao Brasil pela Roche e está sendo produzido e distribuído pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) (SCHOFFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

O esquema terapêutico dessa droga em adultos é realizado na dosagem de 5-7mg/kg de peso corpóreo por dia, durante 60 dias, em duas tomadas, geralmente de 12 em 12 horas. Apesar da sua atividade tripanossomicida, o uso do Bz pode causar várias reações adversas indesejáveis, que variam de leves incômodos gerais e digestivos a efeitos colaterais mais graves, como reações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (CANÇADO, 1997). Embora frequentes, os efeitos adversos geralmente desaparecem quando o tratamento é interrompido (BERN et al., 2007).

A utilização do Bz é recomendada em casos agudos, congênitos, de reativação da infecção e em crianças infectadas (CONSENSO..., 2005). Pacientes crônicos entre 18 e 50 anos também podem ser tratados, desde que não demonstrem manifestações clínicas ou que essas estejam presentes de forma branda (BERN et al., 2007). Embora cerca de 70% dos pacientes tratados com Bz

na fase aguda apresentem cura, na fase crônica tardia esse fármaco apresenta um índice de cura parasitológica pouco expressivo (MARIN-NETO et al., 2009). Já na fase crônica recente, em crianças menores de 15 anos, a taxa de cura é de 50 a 60% (FABBRO et al., 2007; STREIGER et al., 2004). A inexistência de parâmetros seguros para se determinar a eficácia da terapêutica na fase crônica tardia pode ser responsável pelos baixos índices de cura, quando se considera a negatificação sorológica convencional (SATHLER-AVELAR et al., 2007).

Alguns trabalhos demonstram que o tratamento na fase crônica da doença tem como finalidade prevenir ou retardar a evolução da DC para as formas clínicas mais severas (BERN et al., 2007; FRAGATA-FILHO et al., 1995; MACHADO-DE-ASSIS et al., 2013), proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes cronicamente infectados, mesmo sem a negatificação dos testes sorológicos ou sem a completa eliminação do parasito (ANDRADE et al., 1991; GARCIA et al., 2005). Contudo, alguns trabalhos avaliando pacientes após tratamento verificaram o fracasso da medicação na eliminação dos parasitas na fase crônica, não interferindo na progressão da doença (BRITTO et al., 2001; LAURIA-PIRES et al., 2000). Desta forma, o benefício da medicação aos portadores crônicos ainda demonstra controvérsias. A eficácia do Bz na redução da carga parasitária em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, bem como a avaliação da segurança e tolerabilidade do medicamento, estão sendo avaliadas por um estudo multicêntrico chamado BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) (MARIN-NETO et al., 2009).

2.5 Resposta imune associada ao tratamento com o benzonidazol

Acredita-se que um dos principais fatores que influenciam na eliminação do parasito, assim como no controle da morbidade, após o tratamento da DC é a ação sinérgica entre os efeitos da terapia com o Bz e a resposta imune do hospedeiro (SATHLER-AVELLAR et al., 2012). Contudo, ao contrário da imunopatogênese da DC que tem sido bastante explorada pelos pesquisadores, pouco tem sido relatado com relação ao efeito da terapia com o Bz sobre a resposta imune do hospedeiro.

Tem sido proposto que a capacidade de produção de IFN- γ está associada com a eficácia terapêutica durante a DC aguda. Da mesma forma que a manutenção de uma resposta imune com altos níveis de IFN- γ durante a fase crônica da infecção

pode favorecer a cura após o tratamento ou pode influenciar o desenvolvimento da morbidade da FC da doença na ausência da quimioterapia, sugerindo o possível papel paradoxal dessa citocina na fase crônica da doença (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). Bahia-Oliveira et al. (2000), avaliaram a produção *in vitro* de IFN- γ após estimulação antigênica de PBMC de pacientes tratados durante a fase aguda e confirmaram que indivíduos considerados curados após o tratamento com Bz produziam níveis significativamente mais elevados de IFN- γ quando comparados ao grupo de indivíduos não curados. Nesse estudo, os autores não puderam determinar se os altos níveis de IFN- γ são a causa ou a consequência da eliminação do parasito. Contudo, especula-se que níveis elevados de IFN- γ podem estar atuando de forma sinérgica com a quimioterapia durante a fase aguda para eliminar o parasito (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000).

Em contraste com os achados de Bahia-Oliveira et al (2000), Laucella et al. (2009) verificaram que indivíduos portadores crônicos submetidos ao tratamento com Bz apresentaram declínio de IFN- γ , produzidos por células T específicas, após 12 meses do tratamento e que, posteriormente, tornou-se indetectável na maioria dos indivíduos tratados, sugerindo que o tratamento durante a fase crônica da DC tem um efeito substancial na resposta imune específica ao parasito e que isso pode ser indicativo da eficácia do tratamento e cura. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o tratamento com Bz conduz para um tipo de modulação da resposta imune Th1, sendo a IL-10 um 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 específico (SATHLER-AVELAR et al., 2006; SATHLER-AVELAR et al., 2008; SATHLER-AVELAR et al., 2012).

Diante dessas incertezas a respeito do efeito do tratamento com o Bz na resposta imune de portadores crônicos da DC, são necessários estudos mais detalhados que estabeleçam os efeitos desse tratamento nas células do hospedeiro (SATHLER-AVELAR 2007). Assim, nos propomos neste estudo, avaliar moléculas presentes em linfócitos T e o padrão de resposta celular pela avaliação da produção de citocinas, de PBMC de portadores crônicos, submetidos à interação com o *T. cruzi* e ao tratamento com o Bz, a fim de observarmos as possíveis alterações na resposta imune celular que estejam associadas à droga anti-parasitária.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta aproximadamente 3 milhões de indivíduos portadores da DC. No entanto, o tratamento da DC em pacientes crônicos ainda é controverso e sua utilização pode ter a finalidade de prevenir/retardar a evolução da doença. As evidências apresentadas na literatura que avaliaram a evolução clínica em animais e em humanos submetidos ao tratamento com Bz levam a crer que essa droga é uma ferramenta eficaz no tratamento do paciente cronicamente infectado, melhorando seu estado clínico e aumentando sua sobrevida. Contudo, os fenômenos imunológicos que ocorrem após o uso do Bz ainda não estão totalmente elucidados. Desta forma, a avaliação do efeito do Bz sobre células da resposta imune de portadores crônicos pode ser uma ferramenta útil para determinar a administração da medicação nesses indivíduos.

Portanto, espera-se com este estudo conhecer e descrever alguns mecanismos que possam estar relacionados à resposta imune de indivíduos cronicamente infectados que tenham perfil para receber o tratamento, auxiliando na identificação de possíveis estratégias futuras para diminuir a disseminação do parasito e progressão da doença sintomática. Assim, acredita-se que a avaliação da ativação de células T CD4 e T CD8, bem como da produção de citocinas dos padrões Th1 e Th2 após o tratamento com o Bz poderá elucidar alguns mecanismos relacionados à resposta imune de indivíduos portadores da DC submetidos à terapia antiparasitária com o Bz. Além disso, os resultados deste trabalho podem auxiliar outros estudos em andamento, como o BENEFIT, no intuito de comprovar a indicação do uso do Bz em pacientes portadores crônicos da DC.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do benzonidazol sobre células da resposta imune e produção de citocinas após a exposição *in vitro* ao *Trypanosoma cruzi*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de células não aderentes expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com Benzonidazol;
- b) Detectar as citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN- γ em células T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de células não aderentes expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com Benzonidazol;
- c) Avaliar os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF no sobrenadante do cultivo de células mononucleares de sangue periférico expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com Benzonidazol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A manutenção do ciclo do *T. cruzi* e obtenção de formas tripomastigotas, para posterior infecção de células aderentes humanas, ocorreu em duas etapas, sendo a primeira o cultivo das células Vero e, a segunda, a infecção dessas células com as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

5.1.1 Cultivo de células Vero

Oriundas de células epiteliais renais do macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), as células Vero são muito utilizadas em cultivo celular como célula hospedeira de parasitos eucariotos, especialmente os Tripanosomatídeos, por desenvolverem bem o ciclo desses parasitos (CÂMARA et al., 2013). Essas células possuem padrão de crescimento caracterizado por uma morfologia alongada e crescimento em monocamada sobre plástico ou vidro.

As células Vero criopreservadas em meio RPMI 1640 suplementado (glutamina - 2 mM, soro bovino fetal – SBF - Sigma™ a 10%, com 1% de antibiótico - Penicilina 10.000 unidades/mL e Estreptomicina 10mg/mL), contendo dimetilsufóxido (DMSO) a 10%, foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C. Para lavagem das células, a suspensão contendo as células e meio RPMI incompleto (sem SBF) foram adicionados em tubos de polipropileno (BD Falcon™ 15 mL) para centrifugação a 400 g durante 10 minutos a 22 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células foi ressuspendido em 1 mL de meio RPMI suplementado. Em seguida, a suspensão celular foi depositada em garrafas de cultura contendo 4 mL de meio RPMI suplementado e incubadas (37° C e 5% de CO₂) até confluência total das células.

5.1.2 Infecção das células Vero

As formas tripomastigotas da cepa Y criopreservadas foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C. Em seguida, a suspensão contendo os tripomastigotas foi colocada em tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 mL) e foram

adicionados 10 mL de meio RPMI incompleto para lavagem. Após a centrifugação a 400 g durante 10 minutos a 22° C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso com 5 mL de meio RPMI suplementado a 2% de SBF. Posteriormente, a suspensão foi adicionada em garrafas de cultivo contendo as células Vero e incubadas na estufa de CO₂ a 37 °C *overnight*. Após esse período, o sobrenadante foi retirado para remoção dos parasitos que não penetraram nas células e, em seguida, foram adicionados 5 mL meio RPMI suplementado e as garrafas foram incubadas novamente. Todos os dias as garrafas foram observadas no microscópio invertido para avaliação da multiplicação dos parasitos no interior do citoplasma celular. Após ruptura das células, os tripomastigotas foram coletados, lavados e utilizados para infecção de novas células Vero e de células aderentes humanas.

5.2 População do estudo

Onze portadores crônicos da DC foram selecionados na Casa do Portador de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), Recife - PE, da Universidade de Pernambuco (UPE). Os pacientes foram incluídos no estudo através dos seguintes critérios:

- 1) Possuir sorologia reagente para a infecção pelo *T. cruzi* através de dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes ou dois testes com princípios metodológicos diferentes;
- 2) Possuir exames clínicos para caracterização da forma clínica;
- 3) Não ter sido submetido ao tratamento etiológico;
- 4) Não ter apresentado queixas digestivas como disfagia e/ou constipação;

Para caracterizar os pacientes quanto ao seu estado clínico, foram realizados exames físicos e laboratoriais, como eletrocardiograma, ecocardiograma, radiografia de tórax e esôfago, além do enema opaco, quando necessário. Esses exames clínicos permitiram a caracterização dos pacientes nos estágios de envolvimento cardíaco A e B1, estabelecida pela I Diretriz Latino-Americana para Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Os pacientes classificados no estágio A (FI) de envolvimento cardíaco são aqueles que não possuem sintomas e apresentam eletrocardiograma e RX de tórax normais. Já os pacientes classificados como B1 (FC leve) são aqueles

que apresentam alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas que não possuem disfunção ventricular. Além disso, esses pacientes podem ter alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades de contratilidade regional), porém a função ventricular global é normal. Desta forma, foram selecionados 6 pacientes da forma clínica A e 5 portadores da forma B1, que são os portadores crônicos susceptíveis a receberem o tratamento com o Bz.

Todas as informações acerca dos aspectos clínicos dos pacientes (forma clínica apresentada e presença de comorbidades) foram registradas no formulário de pesquisa específico, obtidas através dos prontuários dos pacientes e informadas pelos médicos responsáveis. Nesses formulários preenchidos no momento da coleta de sangue também foram registradas informações sociodemográficas do paciente (idade, gênero e município de residência e de origem) (Quadro 1).

Quadro 1 - Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

Iniciais	Sexo	Idade	Naturalidade	Forma Clínica
OSS	M	67	Itapetim – PE	B1
MOCS	F	43	Limoeiro do Norte – CE	A
RMM	F	33	Olinda – PE	A
AIS	M	60	Camalaú – PB	B1
MML	F	49	Quipapá – PE	B1
JSC	F	64	Terra Nova – PE	B1
IMQ	F	58	Recife – PE	A
MHFA	F	70	Timbaúba – PE	A
SVF	F	71	Aliança – PE	A
JFS	M	65	Vicência – PE	B1
JPM	M	66	Carnaíba – PE	A

Legenda: F- Feminino; M – Masculino; A – Forma indeterminada (FI); B1 – Forma cardíaca leve (FCL).

5.3 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 (sem anticoagulante) para obtenção de soro para a confirmação da sorologia para infecção pelo *T. cruzi*. Após retração do coágulo, os tubos secos foram centrifugados (900 g durante 10 minutos a temperatura ambiente) e alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C na Soroteca de doença Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz.

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

A confirmação da sorologia foi realizada no Serviço de Referência no Diagnóstico da Doença de Chagas do CPqAM/Fiocruz- PE. Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes para a confirmação da infecção pelo *T. cruzi*. Um teste imunoenzimático que utiliza uma mistura de extratos totais do *T. cruzi* adsorvidos à placa de ELISA (Chagas test ELISA III, Bioschile Ingenieria Genetica S.A.) e um teste imunoenzimático que utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de ELISA (Imuno-ELISA Chagas, Wama Diagnóstica). Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo instruções dos fabricantes. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentaram reatividade e não-reagentes quando ambos não apresentaram reatividade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Essa confirmação da sorologia foi realizada no Serviço de Referência no Diagnóstico da Doença de Chagas do CPqAM/ Fiocruz-PE.

5.5 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico

Ao sangue coletado em tubos contendo heparina, foi adicionado Salina tamponada com fosfato (PBS) filtrada e estéril (pH 7,2) na proporção de 1:2 (Sangue/PBS), sendo 15 mL de sangue e 15 mL de PBS. Quinze mililitros dessa solução foram adicionados a tubos de polipropileno (BD FalconTM; 50 mL) contendo 15 mL de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences), ficando a proporção de Sangue e PBS/Ficoll 1:2. Após a centrifugação a 900 g por 30 minutos a 20 °C, o anel de PBMC, que se forma na interface entre o Ficoll e o plasma, foi removido utilizando pipetas transfer estéril e colocados em tubos de polipropileno (BD FalconTM 15 mL). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 400 g por 10 minutos em

14 mL de meio RPMI 1640 incompleto. Após as lavagens, as células foram ressuspendidas em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado e, posteriormente, contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan em uma diluição de 1:10 (10 µL da suspensão de células e 90 µL do corante). O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10^6 células/mL.

5.6 Padronizações de etapas do co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico e *Trypanosoma cruzi* e adição de tratamento com benzonidazol

Com a finalidade de otimizar algumas etapas desse sistema de co-cultivo, foi necessária a realização de padronizações para definição dos protocolos utilizados neste projeto.

5.6.1 Padronização da cinética dose do benzonidazol *versus* resposta

Com o objetivo de definir a melhor dose de uso do Bz, foi realizada uma otimização usando duas concentrações desse fármaco: dose sub-ótima (BzSO) (0,5 µg/mL) e dose ótima (BzO) (1 µg/mL), preconizada por Romanha et al., (2010) para utilização do fármaco em ensaios *in vitro*. Para essa otimização, amostras de sangue de um indivíduo saudável foram coletadas em tubos contendo heparina para obtenção de PBMC. Em seguida, o co-cultivo PBMC e *T. cruzi* e adição de tratamento com Bz foram realizados, sendo utilizadas, separadamente, as duas concentrações do Bz a serem testadas. As placas foram levadas à estufa e as células foram cultivadas durante 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias. Ao final de cada tempo de cultivo, os sobrenadantes de cultura foram estocados para posterior análise das citocinas por CBA e as células foram removidas das placas para realização da imunofenotipagem (conforme o item 5.8), sendo marcadas com os anticorpos monoclonais de superfícies anti-CD4 e anti-CD28.

5.6.2 Padronização da cinética de tempo de cultivo *versus* resposta

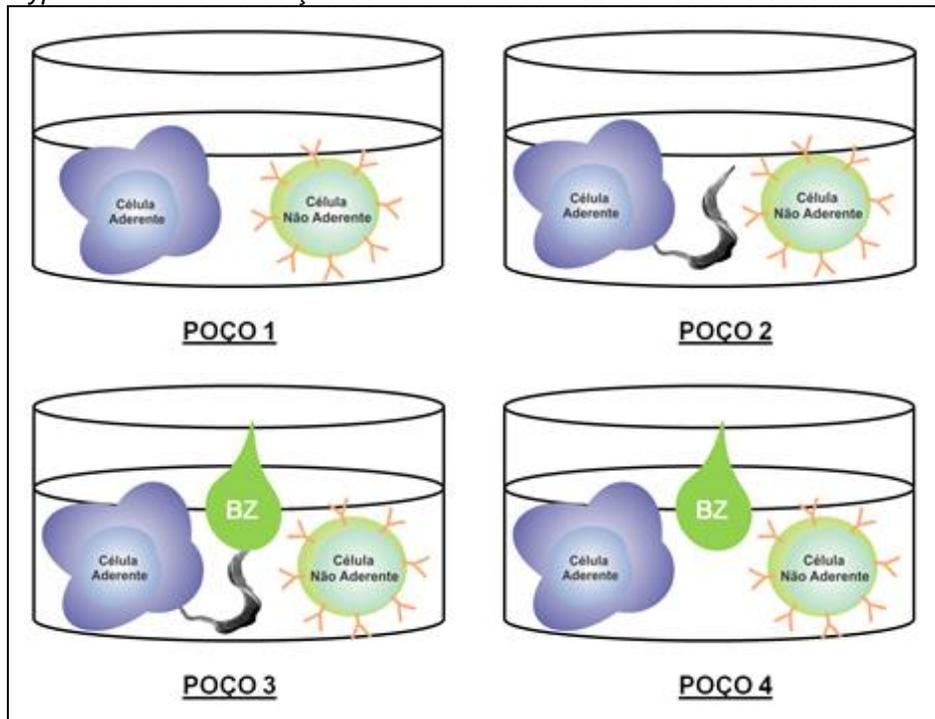
Com a finalidade de definir o melhor tempo de cultivo, foi realizada a padronização de cinética do tempo de cultivo *versus* resposta, onde PBMC de um

portador crônico da DC foram cultivadas, na presença de tripomastigotas do *T. cruzi* e do Bz (dose definida na padronização anterior), por períodos de 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias. Após o término de cada tempo, os sobrenadantes de cultura foram retirados e estocados para avaliação dos níveis de citocinas por CBA e as células foram retiradas das placas para avaliação dos níveis das células CD4⁺ e CD28⁺ por citometria de fluxo.

5.7 Co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico e *Trypanosoma cruzi* e adição de tratamento com benzonidazol

Um mililitro da suspensão de PBMC (células aderentes e não aderentes) e meio RPMI completo foi adicionado em poços de placas de cultivo de 48 poços de poliestireno durante 1h para fixação das células aderentes (principalmente macrófagos) nas placas. Nesse período, foram feitas agitações leves nas placas de 30 em 30 min. Em seguida, as células não aderentes (principalmente linfócitos) foram removidas por lavagens com meio RPMI completo e armazenadas na estufa a 37° C e 5% CO₂. As formas tripomastigotas foram adicionadas aos poços na proporção parasito:célula de 10:1. A preparação foi incubada (37° C e 5% CO₂) por 2h para interiorização dos parasitos, onde aqueles que não penetraram nas células foram removidos através de lavagens com meio RPMI completo. Em seguida, as células não aderentes foram readicionadas ao cultivo, juntamente com 25 µL do fármaco Bz diluído em meio RPMI completo. Para posterior comparação, foram utilizadas quatro condições diferentes (uma em cada poço): apenas células aderentes e não aderentes; células e tripomastigotas; células, tripomastigotas e Bz; e células e Bz (Figura 5). As placas foram incubadas na estufa (37° C e 5% CO₂) por determinados tempos de cultivos. Após o período de incubação, 200 µL do sobrenadante de cada poço foram retirados e estocados imediatamente a -20 °C para posterior utilização em ensaios de *Cytometric Bead Array* (CBA) e os linfócitos foram removidos da placa para o procedimento de marcação de superfície e intracitoplasmática para avaliação por citometria de fluxo.

Figura 5 – Co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, *Trypanosoma cruzi* e adição de tratamento com benzonidazol e seus controles.



Fonte: A autora.

Legenda – Poço 1: Células aderentes e células não aderentes; Poço 2: Células aderentes, não aderentes e formas tripomastigotas de *T. cruzi*; Poço 3: Células aderentes, células não aderentes, formas tripomastigotas e benzonidazol; Poço 4: Células aderentes, não aderentes e benzonidazol.

5.8 Fenótipo celular e marcação intracitoplasmática

Quatro horas antes do término do cultivo foram adicionados em cada cavidade da placa de cultura 10 μ L de Brefeldina A (Sigma™) (10 μ g/mL). Sua utilização promove a retenção da citocina no interior celular, uma vez que interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do Complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991). Ao final do período de incubação, as células foram removidas utilizando PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™) gelado. Depois de retiradas, as células foram colocadas em tubos de polipropileno (BD Falcon™; 15 mL) com cerca de 6 mL de PBS-Wash para centrifugação a 400 g por 10 minutos. 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 (5 mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Após lavagem das células com 2 mL de PBS-Wash e centrifugação a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD4 (1,5 μ L), anti-CD8 (1,5 μ L) e anti-

CD28 (2,5 μ L), previamente titulados e conjugados a diferentes fluorocromos (Quadro 2). Após a incubação por 30 minutos a T.A., foi realizada a permeabilização das células através da adição de 2 mL da solução de Perm/Wash (contendo SBF e saponina – BD Biosciences®) por 5 minutos ao abrigo da luz e a T.A. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos e depois o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados aos tubos os anticorpos intracitoplasmáticos anti-CTLA-4 (20 μ L), anti-IL-10 (1 μ L) e anti-IFN- γ (1 μ L), por um período de incubação de 30 minutos à T.A. e ao abrigo da luz. Após a marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de Perm/Wash e 1 mL de PBS-Wash, respectivamente. Em seguida, foram adicionados 150 μ L da solução fixadora BD Cytfix™ (BD Biosciences®) e os tubos foram incubados por 15 min. Depois do período de incubação, as células foram lavadas novamente com 2 mL de PBS-Wash. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 300 μ L de PBS-Wash e os tubos foram estocados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Quadro 2 - Características dos anticorpos utilizados nos ensaio de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD4	S3.5	Mouse IgG2a	PerCP
CD8	3B5	Mouse IgG2a	FITC
CD28	10F3	Mouse IgG1	PE
CTLA-4	BN13	Mouse IgG2a	APC
IL-10	JES3-19F1	IgG2a	PE
IFN- γ	B27	Mouse IgG1	APC

Fonte: A autora.

Legenda: CD: *Cluster of differentiation*; CTLA-4: Antígeno de linfócito T citotóxico 4; IFN- γ – Interferon gama; IL – Interleucina; APC: Alofococianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Peridininchlorophyllproteincomplex.

5.9 Aquisição e análise no citômetro de fluxo

As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo equipado com um sistema que detecta quatro fluorescências (FACScalibur) (Becton Dickson Immunocytometry Systems™), disponível na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/CPqAM/Fiocruz-PE. As aquisições e análises foram realizadas através do software CellQuestPro® e foram adquiridos 5.000 eventos dentro da população de linfócitos.

5.10 Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura

Os níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura foram quantificados através do sistema Cytometric Bead Array (CBA), seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante (BD). Primeiramente, 35 μ L da mistura de beads de captura, marcadas com anticorpos monoclonais (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF) com diferentes intensidades de fluorescências (FL3) foram transferidos para tubos destinados às amostras a serem testadas e ao controle negativo. Em seguida, 25 μ L das amostras de sobrenadante e do diluente foram adicionados aos seus respectivos tubos. Subsequentemente foram adicionados às esferas de captura, 25 μ L do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas humanas conjugadas com PE (FL2). As misturas foram incubadas por 180 minutos a TA e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 1 mL de solução de lavagem e centrifugadas a 200g por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100 μ L em cada tubo, onde foram adicionados 300 μ L de solução tampão para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras. Os dados foram adquiridos no citometro de fluxo FACScalibur e as análises foram realizadas através do Software BD CBA (Beckton Dickson).

5.11 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados de perfil celular e de produção de citocinas foram realizadas através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Os valores de expressões das moléculas de superfície e intracitoplasmáticas e os níveis das citocinas presentes no sobrenadante de cultura foram comparados entre os grupos avaliados através do teste Wilcoxon para amostras pareadas. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

5.12 Aspectos éticos

As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190) (Anexo A). Todos os indivíduos participantes responderam a um formulário de pesquisa e

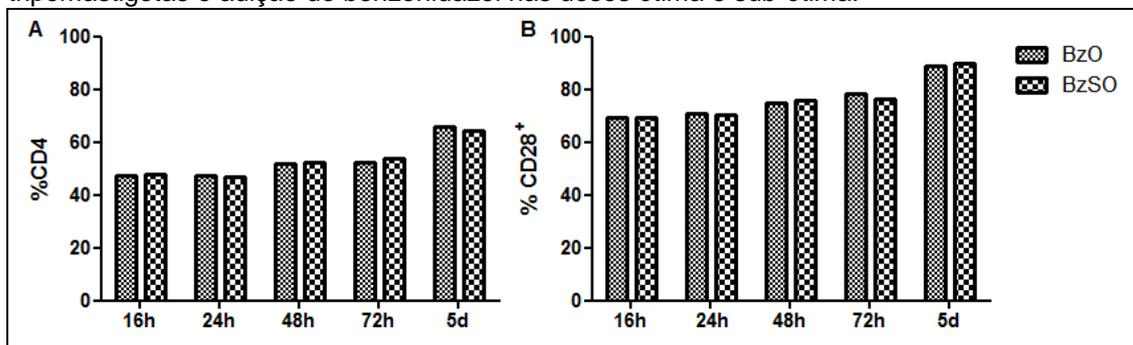
assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B).

6 RESULTADOS

6.1 Padronização da cinética dose do benzonidazol *versus* resposta

Quanto à dose do Bz, não observamos diferenças quando comparamos as frequências dos marcadores de superfície CD4 e CD28 entre as duas concentrações utilizadas (BzO e BzSO) na condição C+T+Bz nos tempos de cultivos avaliados (Figura 6).

Figura 6 – Avaliação da concentração do benzonidazol através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ no co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol nas doses ótima e sub-ótima.

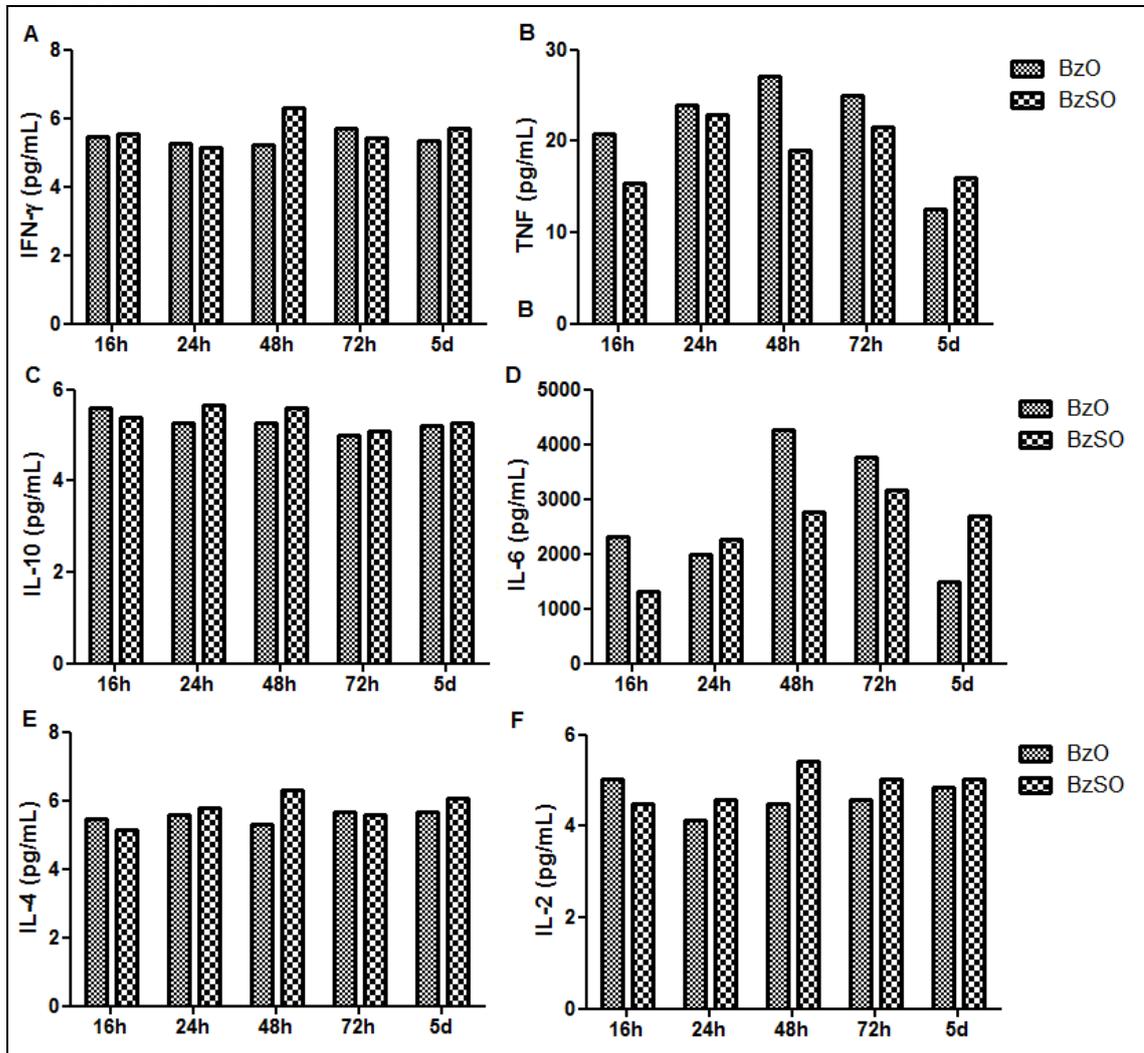


Fonte: A autora.

Legenda: (A) Linfócitos T CD4⁺; (B) Linfócitos T CD28⁺. BzO – dose ótima do benzonidazol. BzSO – dose sub-ótima do benzonidazol.

Também não verificamos diferenças entre as concentrações analisadas quanto à produção de citocinas no sobrenadante de cultura nos tempos de cultivos avaliados (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*.

Figura 7 – Avaliação da concentração do benzonidazol 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 mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol nas doses ótima e sub-ótima.



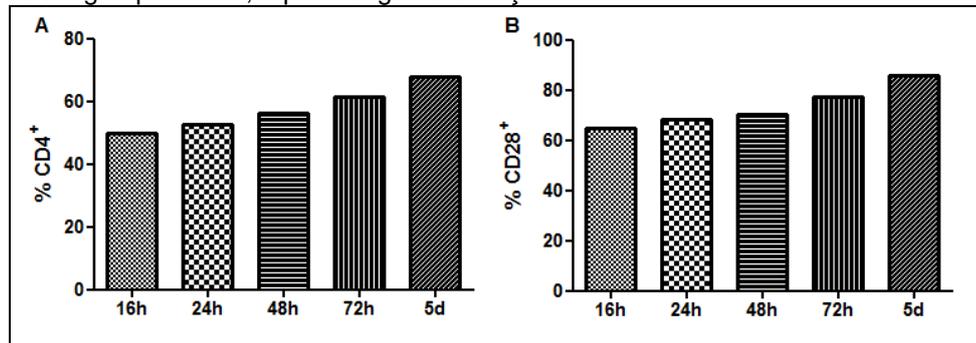
Fonte: A autora.

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

6.2 Padronização da cinética de tempo de cultivo *versus* resposta

Com relação à otimização do tempo de cultivo *versus* resposta, avaliamos os níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ presentes no co-cultivo de PBMC, tripomastigotas e Bz e, avaliamos também, a produção de citocinas no sobrenadante desse cultivo. Verificamos que os níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ aumentaram conforme maiores foram os tempos de cultivos (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação dos tempos de cultivo *versus* resposta através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ no co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol.

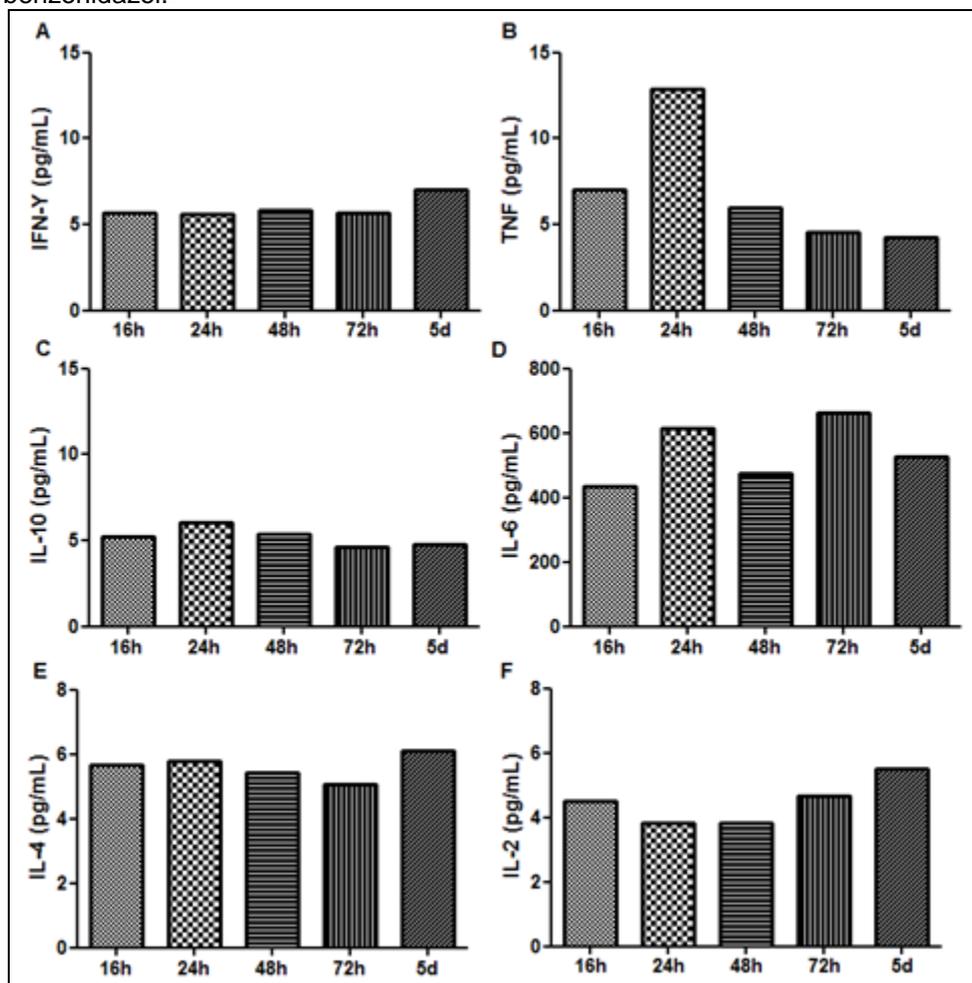


Fonte: A autora.

Legenda: (A) Linfócitos T CD4⁺; (B) Linfócitos T CD28⁺.

Com relação à produção de citocinas no sobrenadante de cultura, verificamos que houve tendência à maior produção das citocinas TNF e IL-10 no início do cultivo, enquanto IFN- γ , IL-6 e IL-2 expressaram um pico de produção após alguns dias de cultivo (Figura 9). Sendo assim, em virtude disso, foram escolhidos para nossas avaliações dois tempos de cultivos: 24h e 5d.

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 mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas e adição do benzonidazol.



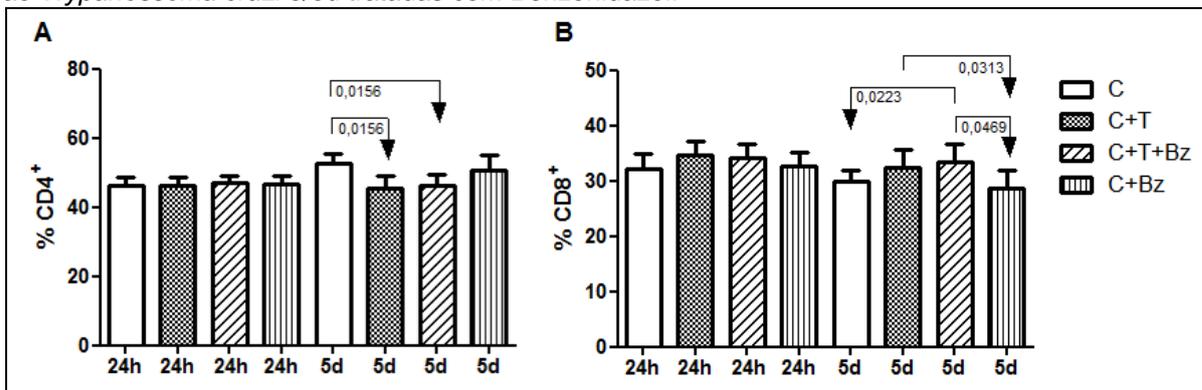
Fonte: A autora.

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

6.3 Avaliação dos níveis dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ nesses linfócitos.

Ao avaliarmos a frequência de linfócitos CD4⁺, detectamos diferenças estatísticas significativas na condição C em comparação com as condições C+T e C+T+Bz, no tempo de cultivo de 5 dias (Figura 10A). Quanto aos linfócitos T CD8⁺, detectamos níveis maiores dessas células na condição C+T +Bz em comparação às situações C e C+Bz no período de 5d de cultivo (Figura 10B). Além disso, observamos níveis maiores dessas células na situação C+T em comparação à condição C+Bz também no período de 5d de cultivo (Figura 10B).

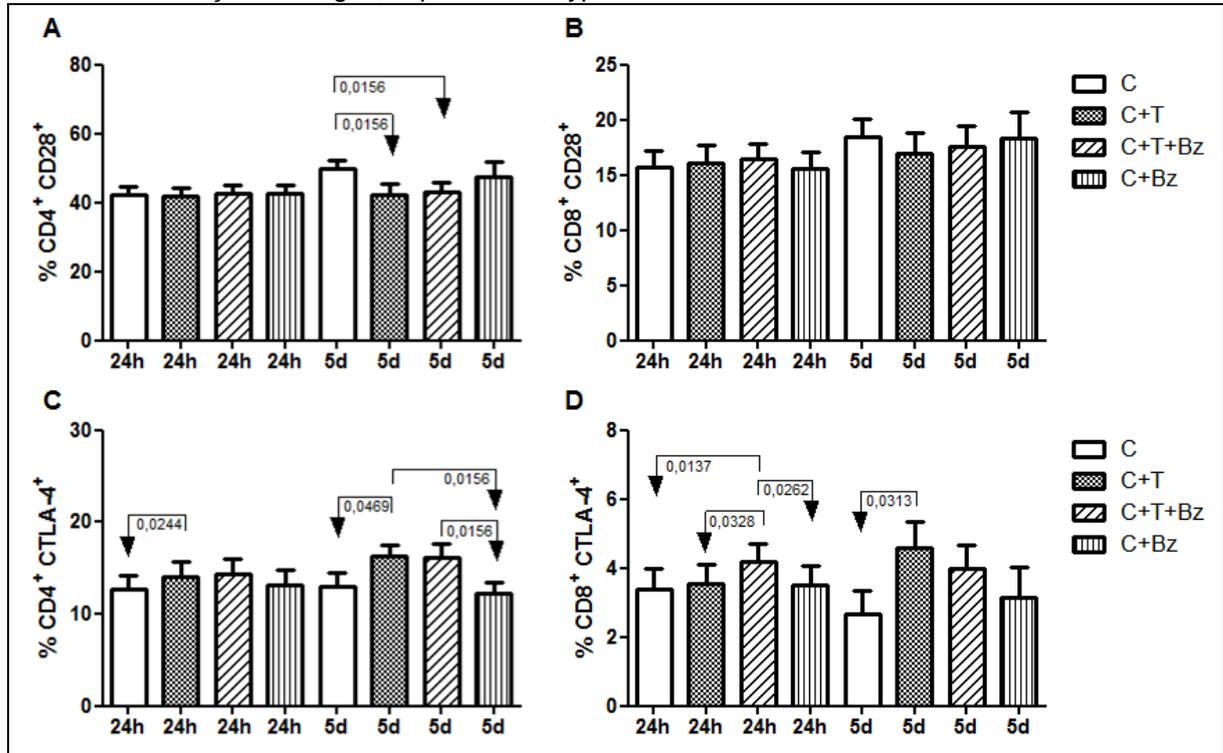
Figura 10 – Detecção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanossoma cruzi* e/ou tratadas com Benzonidazol.



Com relação à expressão da molécula CD28⁺ em linfócitos T CD4⁺, verificamos diferenças estatísticas na condição C em comparação às condições C+T e C+T+Bz no tempo de 5d (Figura 11A). Ao avaliarmos os níveis dos linfócitos T CD8⁺CD28⁺ não verificamos diferenças estatísticas significativas entre as condições avaliadas (Figura 11B).

Quanto à expressão da molécula CTLA-4⁺ em linfócitos CD4⁺, observamos níveis significativamente maiores dessas células na condição C+T quando comparado a C em 24h de cultivo. Já no tempo de 5d, verificamos níveis maiores dessas células na condição C+T quando comparado às condições C e C+Bz e, também, na condição C+T+Bz em comparação à C + Bz (Figura 11C). Verificamos também um aumento da expressão da molécula CTLA-4⁺ nas células T CD8⁺ na condição C+T+Bz em comparação às outras condições avaliadas (C, C+T, C+T+Bz) no tempo de 24h. Já no tempo de cultivo 5d verificamos apenas aumento dessas células na condição C+T quando comparada à C (Figura 11D).

Figura 11 – Expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) Linfócitos T CD4⁺CD28⁺; (B) Linfócitos T CD8⁺ CD28⁺; (C) Linfócitos T CD4⁺ CTLA-4⁺; (D) Linfócitos T CD8⁺ CTLA-4⁺; 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 o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

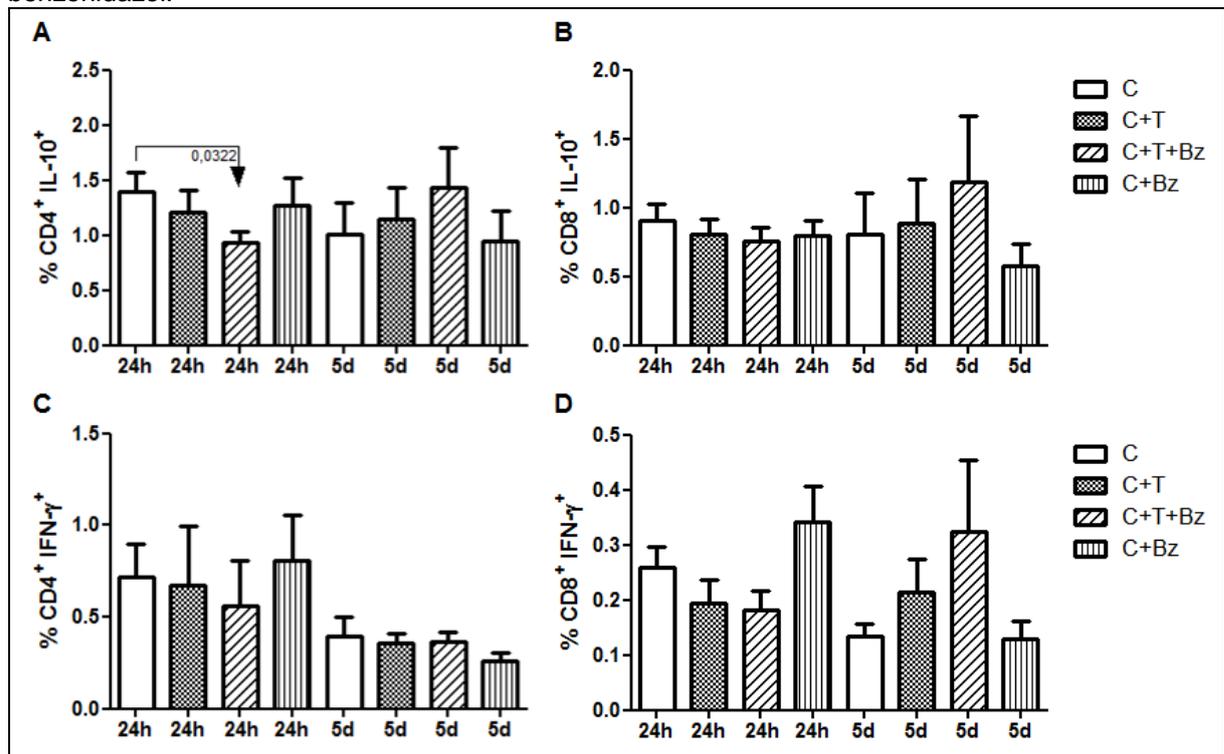
Apesar de termos evidenciado diferenças quanto aos níveis das células estudadas entre as condições, não verificamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos os tempos de cultivo 24h e 5d em cada situação avaliada (Figura 11).

6.4 Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

Ao avaliarmos a produção de citocinas intracitoplasmáticas, verificamos um aumento significativo na produção da citocina IL-10 por linfócitos T CD4⁺ no tempo de 24h de cultivo na condição C em comparação com a condição C+T+Bz (Figura 12A). Com relação à produção da citocina intracitoplasmática IFN- γ por essas células, não detectamos diferenças significativas quando as condições foram comparadas (Figura 12B).

Quanto à produção de IL-10 e IFN- γ por linfócitos T CD8⁺, também não evidenciamos diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 12C e D, respectivamente). Além disso, não observamos diferenças quando os tempos de cultivo 24h e 5d das condições foram comparados quanto a produção dessas citocinas por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 12).

Figura 12 - Detecção da produção de citocinas intracitoplasmáticas IL10 e IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de células não aderentes, obtidas de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) Linfócitos T CD4⁺IL-10⁺; (B) Linfócitos T CD8⁺ IL-10⁺; (C) Linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺; (D) Linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺; 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 o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

6.5 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo

Ao avaliarmos a produção de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes, evidenciamos que no período de 24h de cultivo houve uma maior produção dessa citocina na circunstância C+T e C+T+Bz em comparação a C+Bz. Quanto ao 5d de cultivo, observamos menor produção de IFN- γ na condição

C e C+Bz em relação a C+T e C+T+Bz. Além disso, verificamos aumentos significativos da produção de IFN- γ no tempo de cultivo de 5d em comparação ao tempo de 24h em todas as condições analisadas (Figura 13A).

Com relação à produção de TNF, não detectamos diferenças significativas entre as condições para o tempo de 24h. No período de cultivo 5d, verificamos diferença significativa na produção dessa citocina na condição C+T comparado às demais condições. Ademais, detectamos maior produção de TNF na situação C+T+Bz em comparação às condições C e C+Bz no tempo de 5d. Contudo, não verificamos diferenças quando comparamos os dois tempos estudados para cada condição (Figura 13B).

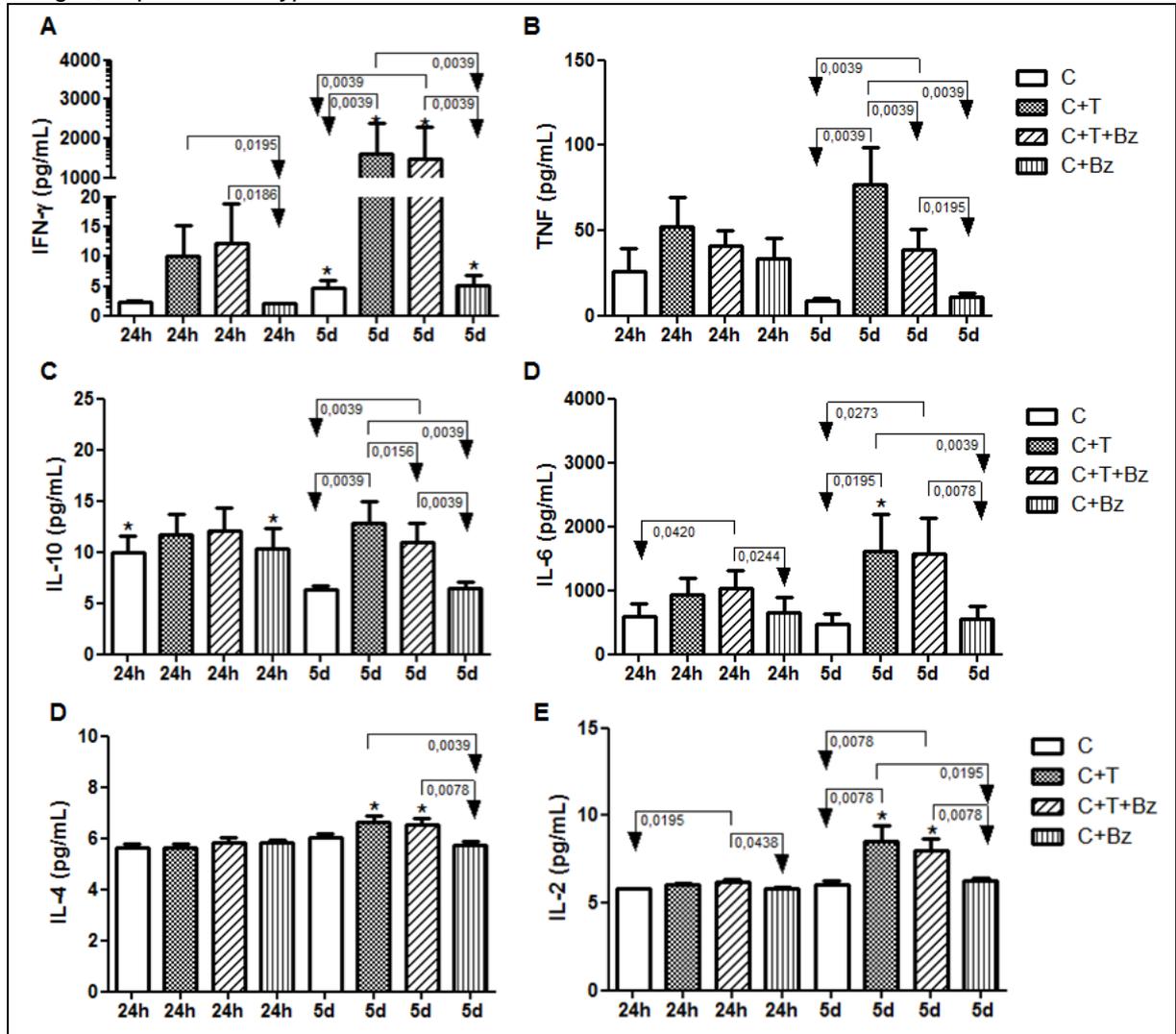
A produção da citocina IL-10 foi significativamente maior na circunstância C+T em comparação às outras condições no tempo de 5d. Além disso, verificamos maior produção na condição C+T+Bz em comparação a C e C+Bz. Quando os dois tempos de cultivo foram comparados, verificamos nas condições C e C+Bz maior produção de IL-10 no tempo de 24h comparado a produção dessa citocina no tempo de 5d (Figura 13C).

Quanto à produção de IL-6 no sobrenadante de cultura, observamos maior detecção dessa citocina na condição C+T+Bz em relação aos grupos C e C+Bz nos dois tempos de cultivos avaliados. Verificamos também níveis maiores em C+T quando comparado com C e C+Bz no tempo de 5d. Ao compararmos os dois tempos de cultivos, detectamos maior produção no tempo de 5d do que no de 24h na condição C+T (Figura 13D).

Ao avaliarmos a produção de IL-4, verificamos apenas diferenças estatísticas significativas nas condições C+T e C+T+Bz em comparação à circunstância C+Bz no cultivo de 5d. Quanto à comparação entre os dois tempos, observamos maior produção de IL-4 no tempo de 5d em relação ao de 24h para as condições C+T e C+T+Bz (Figura 13E).

Com relação à detecção de IL-2, verificamos maiores níveis dessa citocina na condição C+T+Bz em comparação a C e C+Bz no tempo de 24h. Já no cultivo de 5d, observamos maior produção nas condições C+T e C+T+Bz em comparação à C e C+Bz. Ao avaliarmos se havia diferenças entre os dois tempos estudados, verificamos maior produção de IL-2 no cultivo de 5d em comparação ao de 24h nas condições C+T e C+T+Bz (Figura 13F).

Figura 13 - Detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico de portadores crônicos da doença de Chagas, expostas ao *Trypanosoma cruzi* e/ou tratadas com benzonidazol.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) IFN- γ ; (B) TNF; (C) IL-10; (D) IL-6; (E) IL-4; (F) IL-2. 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 o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de 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 *.

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho realizamos o co-cultivo de PBMC (de portadores crônicos da DC), *T. cruzi* e o fármaco Bz. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do Bz sobre a ativação de linfócitos T e a produção das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ e IL-10 por essas células, além da produção global de citocinas do perfil Th1 e Th2 no sobrenadante desse co-cultivo.

Com relação à ação do Bz sobre ativação de linfócitos T, nossos resultados mostraram que a expressão da molécula CTLA-4⁺ em linfócitos T CD8⁺ aumentou quando as células foram expostas aos tripomastigotas e ao Bz em relação àquelas expostas apenas aos tripomastigotas nas primeiras 24h de cultivo, não persistindo no cultivo de 5d. A ativação dos linfócitos T é mediada por sinais específicos de antígenos gerados pela interação entre a molécula de MHC expressando o peptídeo e o TCR, em associação com sinais adicionais provenientes de co-receptores como CD28⁺ e CTLA-4⁺, entre outras moléculas envolvidas nesse processo. A molécula CD28 fornece sinais positivos que promovem e sustentam as respostas de células T, enquanto que a molécula CTLA-4 regula as respostas desses linfócitos (RUDD; TAILOR; SCHNEIDER, 2009).

Nossos dados sugerem que o Bz pode estar provocando uma regulação da ativação dos linfócitos T CD8⁺ através do aumento da expressão da molécula CTLA-4 nessas células, indicando que o Bz pode induzir uma modulação da resposta imune de linfócitos T CD8⁺ e, conseqüentemente, diminuir a ativação exacerbada dessas células. É importante destacar que também houve aumento da frequência de CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺, na avaliação C+T em relação ao C, tanto no período de cultivo de 24h quanto no de 5d, mas na presença do Bz esse fenômeno não ocorreu.

Nossos resultados mostraram também menores frequências dos marcadores de superfície CD4⁺ e CD4⁺/CD28⁺ em linfócitos nas condições de cultivo em que o *T. cruzi* estava presente quando comparado à condição contendo apenas células (controle). Esses dados sugerem que o *T. cruzi*, ao induzir uma diminuição da expressão de CD28, pode estar causando uma diminuição da ativação dos linfócitos T CD4⁺. Além disso, observamos maior expressão da molécula regulatória CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na presença dos tripomastigotas em relação à condição de cultivo controle, o que reafirma uma regulação da ativação dos linfócitos

T, sugerindo que o parasita também provoca uma modulação da resposta imune através desses linfócitos.

Alguns parasitas podem estimular a produção de citocinas que induzem a uma diminuição da expressão de moléculas importantes, como as moléculas de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (RUSSO et al., 1993; SOUZA et al., 2004). Desta forma, nosso trabalho mostrou alteração quanto à expressão de moléculas acessórias na ativação de células T após a exposição aos tripomastigotas, o que pode sugerir que o parasita induziu uma diminuição da expressão da molécula CD28⁺ e um aumento da expressão de CTLA-4⁺ em linfócitos T, indicando assim, um possível mecanismo de fuga do sistema imunológico.

Com relação à produção de citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e IFN- γ por linfócitos T, nossos dados mostraram a diminuição da produção de IL-10 por células TCD4⁺ na situação em que tripomastigotas e Bz estavam presentes em comparação à condição C no tempo de cultivo de 24h. Esse fato provavelmente está relacionado à presença do Bz. Quanto à produção de citocinas por linfócitos TCD8 não verificamos diferenças estatísticas significativas.

Sathler-Avelar et al (2012), avaliaram o perfil de citocinas por células da imunidade inata e adquirida de pacientes portadores da FI não tratados e tratados com o Bz. Nesse estudo, também foi verificada uma diminuição da produção de IL-10 por células T CD4⁺ em culturas estimuladas com antígenos de epimastigota (EPI) de pacientes tratados com o Bz em relação aos pacientes não tratados. Além da IL-10, uma diminuição de IL-4 e TNF- α por células T CD4⁺ também foi observada em pacientes tratados em comparação ao grupo de indivíduos não tratados. Já no estudo de Sathler-Avelar et al. (2006), a resposta imune de crianças tratadas com o Bz durante a forma crônica indeterminada recente da DC foi avaliada através da estimulação das células com antígenos EPI de *T. cruzi*. Eles verificaram que após o tratamento com o Bz houve uma maior produção por linfócitos T CD8⁺ de citocinas do perfil Th1, como TNF- α , IFN- γ , IL-12, juntamente com um aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4, modulando a resposta Th1. Além disso, também verificaram uma modulação dessa resposta através do aumento da produção de IL-10 por linfócitos TCD4⁺ e linfócitos B.

Além de estudarmos a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, avaliamos a produção de citocinas no sobrenadante de cultura. De modo semelhante ao que ocorreu com a produção de IL-10 por TCD4⁺, verificamos

diminuição nos níveis de IL-10 e também de TNF quando as células foram expostas aos tripomastigotas e ao Bz comparado à condição em que as células foram expostas apenas aos tripomastigotas, o que indica que o Bz causou uma diminuição da produção dessas citocinas.

A citocina IL-10, produzida principalmente por macrófagos e células T, apresenta capacidade de inibir a expressão da citocina IL-12, moléculas de MHC de classe I e II, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos e células dendríticas (ABBAS; LICHTAMAN; PILLAI, 2012). Além disso, a IL-10 é identificada por sua capacidade de inibir a produção da citocina IFN- γ por células T CD4⁺ (MOORE et al., 1993). Na DC a citocina IL-10 é secretada principalmente por pacientes portadores da FI, sendo associada com a proteção do hospedeiro contra o desenvolvimento de formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Já a citocina TNF- α é produzida principalmente por macrófagos, células NK e linfócitos T (ABBAS; LICHTAMAN; PILLAI, 2012). Durante a infecção aguda da DC, a citocina TNF- α está relacionada com o controle da replicação do parasita através da indução de liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos (ALIBERTI et al., 1999). Contudo, na infecção crônica, elevados níveis plasmáticos de TNF- α são correlacionados com a severidade da DC e podem contribuir para lesão do tecido cardíaco e para a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (LANNES-VIEIRA et al., 2011).

Em um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando a ação do Bz sobre a produção de quimiocinas e a expressão de receptores de quimiocinas em monócitos e em linfócitos T, foi verificado que o Bz induziu uma diminuição da produção da quimiocina CCL2 no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes experimentalmente expostas ao *T. cruzi* (NASCIMENTO, 2015). Quimiocinas e receptores de quimiocinas controlam a migração de leucócitos durante o processo inflamatório e estão envolvidos na modulação das respostas Th1 e Th2 (FLOREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ, 2012). Talvani et al. (2004) avaliaram os níveis de TNF- α e CCL2 em amostras de plasmas de pacientes portadores da cardiopatia chagásica crônica. Os portadores com a cardiopatia mais grave apresentaram maiores concentrações de TNF- α e CCL2 e, houve uma boa correlação entre os níveis dessas proteínas (principalmente TNF- α) e o grau da cardiomiopatia, demonstrando que são bons indicadores de disfunção cardíaca. Desta forma, nos nossos estudos, foi verificado que o Bz provocou uma diminuição da produção de TNF- α e CCL2 após a exposição ao *T. cruzi*, o que nos leva a

pensar que a terapia com o Bz pode ser benéfica ao paciente cronicamente infectado, uma vez que esse fármaco promove a diminuição dessas proteínas envolvidas diretamente no processo inflamatório na DC e, conseqüentemente, poderia retardar a evolução para formas mais graves da doença.

Verificamos também que a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ não aumenta ao longo do tempo na presença do Bz e dos tripomastigotas, ou seja, não há diferença significativa entre os tempos de cultivo avaliados. Contudo, esse fato não ocorre quando a produção de IFN- γ no sobrenadante de cultura foi avaliada, visto que verificamos aumento da produção dessa citocina no tempo de 5d de cultivo em relação ao tempo de 24h em todos os grupos avaliados. É importante ressaltar que as citocinas detectadas no sobrenadante de cultura são produzidas por todos os tipos celulares presentes no co-cultivo, destacando principalmente a produção por macrófagos e linfócitos. Sendo assim, esses dados indicam que esta produção é um somatório da produção de IFN- γ por todas as outras células presentes no cultivo .

Bahia-Oliveira et al (2000) avaliaram a produção de IFN- γ por PBMC de pacientes tratados durante a fase aguda da DC e verificaram que pacientes considerados curados apresentaram altos níveis de IFN- γ em comparação aos pacientes não curados, sugerindo que essa citocina pode favorecer a eficácia terapêutica. Por outro lado, Laucella et al. (2009), estudaram PBMC de portadores crônicos da DC tratados e não tratados com o Bz, avaliando a produção global das citocinas IFN- γ e IL-2 por ELISPOT e a produção intracitoplasmática de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ em culturas estimuladas com antígeno de *T. cruzi*. Os dados desse estudo trazem que o tratamento com o Bz diminuiu a produção de IFN- γ por células T específicas após 12 meses de tratamento. Contudo, nesse estudo, o Bz não alterou a produção de IL-2 por células T responsivas ao *T. cruzi*.

Além dos resultados referentes ao efeito do Bz sobre as células da resposta imune de portadores crônicos da DC, observamos também que no cultivo em que o *T. cruzi* estava presente houve uma grande produção de todas as citocinas estudadas (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) no sobrenadante de cultura, demonstrando que o parasita induz uma forte resposta imune. A exposição dos antígenos de *T. cruzi* induz macrófagos a produzirem vários mediadores endógenos, incluindo as citocinas, principalmente IL-12, IFN- γ e TNF- α . Esses mediadores inflamatórios produzidos por monócitos são importantes para modular as respostas imunológicas na DC, regulando o processo de inflamação e apresentação de

antígenos (GOMES et al., 2014), sendo necessária a presença de citocinas moduladoras como a IL-10 para contrabalancear e reduzir os danos causados pelo processo inflamatório frente à infecção pelo *T. cruzi* (SATHLER-AVELAR et al., 2012). Neste contexto, nossos resultados concordam com os de Sathler-Avelar (2006, 2008 e 2012) que verificaram maiores níveis da produção de citocinas tanto por células da imunidade inata (monócitos e células NK) quanto por células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) quando culturas estimuladas por antígenos de *T. cruzi* foram avaliadas.

Em resumo, nossos dados mostraram que o Bz pode conduzir para um perfil regulatório quanto à expressão de CTLA-4, uma molécula acessória na ativação de células T, o que consideramos que seria bom para tratamento de pacientes portadores da DC, visto que possivelmente haveria uma regulação da ativação de linfócitos T. Com relação à produção global de citocinas, não observamos alteração na produção de IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 na presença de Bz, uma vez que os níveis dessas citocinas se mantiveram altos na presença de tripomastigotas e Bz. Entretanto, verificamos que o Bz altera a produção global das citocinas IL-10 e TNF- α durante o processo de infecção pelo *T. cruzi*. Esses resultados indicam uma modulação do sistema imune influenciado pelo Bz, com níveis elevados de citocinas IFN- γ , IL-6 e IL-4 e IL-2. Por outro lado, ocorreu uma diminuição de duas citocinas importantes durante o processo de infecção pelo *T. cruzi*, sendo TNF- α do perfil Th1 e IL-10 do perfil Th2, sugerindo um contrabalanceamento das duas respostas.

8 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o tratamento com o Bz tem um impacto relevante na resposta específica ao *T. cruzi*. O Bz aumentou a expressão de CTLA-4⁺ (molécula que regula a ativação de células T) em linfócitos T CD8⁺ após a exposição ao *T. cruzi*, indicando que esse fármaco pode conduzir para um perfil regulatório, diminuindo a ativação exacerbada desses linfócitos. Apesar dessa regulação não ser via IL-10+, pois verificamos que o Bz induziu diminuição da frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10, bem como da produção global desta citocina no sobrenadante de cultura. Acreditamos que outros mecanismos regulatórios estão atuando na presença do Bz, já que verificamos também diminuição da produção de TNF, uma importante citocina pró-inflamatória na DC, com a manutenção dos níveis elevados de IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 induzidas provavelmente pela presença do *T. cruzi*. Esses dados nos sugerem que há uma modulação do sistema imune influenciado pelo Bz, com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, sendo contrabalanceado por mecanismos regulatórios.

Acreditamos que a administração do Bz aos portadores de formas clínicas brandas da DC pode ser benéfica a esses pacientes, visto que o Bz não promoveu um perfil inflamatório exacerbado. Assim, diante do que é mostrado na literatura, acreditamos que nossos resultados possam fortalecer a hipótese de que o Bz pode prevenir e/ou retardar a progressão para formas mais graves da DC, uma vez que a resposta imune do hospedeiro pode influenciar diretamente nessa evolução. Estudos prospectivos que avaliem a carga parasitária após a adição do Bz, juntamente com avaliação da ação desse fármaco sobre células da resposta imune, são necessários para esclarecimentos desses mecanismos imunes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

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

ANDRADE, S. G. et al. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitological cured mice. Bulletin of the World Organization, Geneve, v. 69, p. 191-197, 1991.

ANDRADE, L. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Experimental Parasitology, New York, v. 100, n. 4, p. 269-275, 2002.

ARAÚJO, F. F. et al. Potential role of CD4+CD25high regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. Frontiers in Bioscience, New York, v. 12, p. 2797-2806, 2007.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 127-131, 1998.

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. Journal of Infectious Disease, Chicago, v. 182, p. 634-638, 2000.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtx=31454>. Acesso em: 20 Ago 2011.

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

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. International Archives of Allergy and Immunology, New York, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

BRITTO, C. et al. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, p. 823-826, 2001.

CÁMARA, M. M. et al. Laboratory techniques to obtain different forms of *Trypanosoma cruzi*: applications to wild-type and genetically modified parasites. Folia Parasitologica, Praha, v. 60, n. 15, p. 406-410, 2013.

CANÇADO, J. R. et al. Segundo ensaio terapêutico com o nifurtimox na doença de Chagas. Revista Goiana de Medicina, Goiania, 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.

CANÇADO, J. R. Terapêutica Específica. *In*: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. cap. 27, p. 469-486.

CANÇADO, J. R. Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. *In*: BRENER, Z.; ANDADRE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Ed). Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 389-405.

CARRENO, B. M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 20, p. 29-53, 2002.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Human and experimental toxicology, Basingstoke, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CONSENSO brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, 2005. Suplemento.

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

COURA, J. R. et al. Estudo Comparativo Controlado com Emprego de Benznidazole, Nifurtimox e Placebo, na Forma Crônica da Doença de Chagas, em uma Área de Campo com Transmissão Interrompida. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 30, p. 139-144, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

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

COURA, J. R.; VINÃS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature outlook, London, p.S6-S7, 2010.

CUNHA-NETO, E. et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. Autoimmunity, London, v. 39, n. 1, p. 41-54, 2006.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, 2006.

DINIZ, L. F. et al. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 7, p. 2367, 2013.

DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 43, n. 1, p. 88-93, 1996.

DUTRA, W. O. et al. Self and Nonself Stimulatory Molecules Induce Preferential Expansion of CD5⁺ B Cells or Activated T Cells of Chagasic Patients, Respectively. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 51, n. 1, p. 91-97, 2000.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases, London, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical, Uberaba, v. 40, p. 1-10, 2007.

FLÓREZ, O.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, C. L. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. Human Immunology, New York, v. 73, n. 8, p. 852-858, 2012.

FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benznidazol. Arquivos brasileiros de cardiologia, São Paulo, v. 65, p. 71, 1995.

FUENMAYOR, C. et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. Acta Cardiologica, Leuven, v. 60, n. 1, p. 33-37, 2005.

GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations in mice. Antimicrobial agents and chemotherapy, 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. Infection and Immunity, Bethesda, v. 71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 115-121, 2009.

GOMES, J. A. et al. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. Human Immunology, New York, v. 75, n.1, p. 20-28, 2014.

HIGUCHI, M. D. et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 485-489, 1997.

HUDSON, T. H.; GRILLO, F. G. Brefeldin-A Enhancement of Ricin A-chain Immunotoxins and Blockade of Intact Ricin, Modeccin, and Abri. The Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 266, n. 28, p. 18586-18592, 1991.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Org.). Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 73-100.

LANNES-VIEIRA, J. et al. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 691, p. 221-230, 2011.

LAUCELLA, S. A. et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-Specific Immune Responses after Treatment: Surrogate Markers of Treatment Efficacy. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 49, p. 1675-1684, 2009.

LAURIA-PIRES, L. et al. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 63, p. 111-118, 2000.

LENSCHOW, D. J. et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. Journal of Immunology, Baltimore, v. 153, n. 5, p. 1990-1997, 1994.

LINSLEY, P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annual Review of Immunology, Palo alto, v. 11, p. 191-212, 1993.

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

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n.1, p. 1-12, 2004.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F. et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p. 873-880, 2013.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 319-324, 2009.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology, Oxford, v. 146, p. 601-620, 2006.

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

MOORE, K. W., et al. Interleukin 10. Annual Review of Immunology, Palo alto, v. 11, p. 165, 1993.

MUNOZ-SARAVIA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease – From pathogenesis to treatment regimes. Applied Cardiopulmonary Pathophysiology, v. 16, p. 55-81, 2012.

NASCIMENTO, A. V. 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 subsequente com benzonidazol. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

NEGRETTE, O. S. et al. Serological Evaluation of Specific-Antibody Levels in Patients Treated for Chronic Chagas' Disease. Clinical and Vaccine Immunology, Washington, v. 15, n. 2, p. 297-302, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Chagas Disease: Fact Sheet and Poster. Research and Training in Tropical Diseases. Geneve, 2009. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/AD/DPC/CD/dch-poster.htm>>. Acesso em: 7 Mar 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza. Boletim Epidemiológico, Washington, 2009. Disponível em: <http://www.paho.org/bulletins/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id565>. Acesso em: 20 Fev 2014.

PETHERICK, A. et al. Chagas disease. Nature outlook, London, p. 10-11, 2010.

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

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 637-642, 1993.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

RUDD, C. E.; TAYLOR, A.; SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunological Review, Copenhagen, v. 229, n. 1, p. 12-26, 2009.

RUSSO, D. M. et al. Human T cell responses in Leishmania infection and. Progress and Clinical Parasitology, New York, v. 3, p. 119–144, 1993.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 64, p. 554 – 563, 2006.

SATHLER-AVELAR, R. Efeito do tratamento com benznidazol no perfil fenotípico e no padrão de citocinas leucocitárias de crianças brasileiras portadoras da forma crônica indeterminada recente da doença de Chagas. 2007. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. Microbes and infection, Paris, v. 10, p. 103-113, 2008.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with trypanosome cruzi antigens. BMC Infectious Disease, London, v. 12, p. 12, 2012.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitology, London, v. 22, n. 12, p. 583, 2006.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 6 - 8, 2011.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. American Society for Microbiology, Washington, v. 72, p. 5283–5291, 2004.

SOUZA, P. E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Differential Modulation of Costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease. Infection and Immunity, Bethesda, v. 75, n. 4, p. 1886-1894, 2007.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *T. cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 60, n. 1, p. 25-32, 2008.

STREIGER, M. L. et al. Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 37, p. 365-375, 2004.

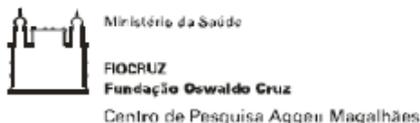
TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 38, v. 7, p. 943-950, 2004.

URBINA, J. A. Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible? Is it Relevant? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, p. 349-355, 1999.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁻CD56⁺ Natural Killer T cells and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocytes. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

WANG, S.; CHENG, L.T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 37–42, 2004.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente



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 Benzonidazol 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-Infirmação

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 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle



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 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) 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) 2101-2566, 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; () 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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM



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

