



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Saúde Coletiva



Mestrado em Saúde Pública

**Avaliação da resposta imune celular de
pacientes chagásicos após estímulo *in
vitro* com os antígenos recombinantes
CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

Virginia Maria Barros de Lorena

Recife, 2006

Virginia Maria Barros de Lorena

Avaliação da resposta imune celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada à Pós-graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz com vistas à obtenção do título de Mestre na área de concentração Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes
Co-orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira

Recife, 2006

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- L868a Lorena, Virginia Maria Barros de.
Avaliação da resposta celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* / Virginia Maria Barros de Lorena. — Recife: V. M. B. de Lorena, 2006.
109 p. : il., tabs.
- Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 16 fev. 2006.
Orientadora: Yara de Miranda Gomes
Co-orientadora: Valéria Rêgo Alves Pereira.
1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Citocinas - secreção. 3. Marcadores biológicos. 4. Proteínas recombinantes. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Pereira, Valéria Rêgo Alves. III. Título.

CDU 616.937

Esta dissertação intitulada:

Avaliação da resposta celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Apresentada por Virginia Maria Barros de Lorena

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Revisor/ 1º Titular:

Dra. Sílvia Lucena Montenegro
Pesquisadora titular do Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

2º Titular:

Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza
Professora adjunta do Departamento de Patologia da UPE

Suplentes:

Dr. Frederico Guilherme Abath
Pesquisador titular do Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

Dra. Silvana de Fátima Ferreira da Silva
Professora titular do Departamento de Patologia da UPE

Recife, 16 de fevereiro de 2006.

Aos portadores da doença de Chagas que com toda boa vontade permitiram a coleta de seu sangue contribuindo com este estudo. Sem os quais essa dissertação não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães;

à coordenação do curso de Mestrado em Saúde Pública;

ao Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz;

ao Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas;

à Bio-Manguinhos;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço de coração àquelas que contribuíram com meu crescimento profissional ensinando e repassando seus sábios conhecimentos. Agradeço àquelas pessoas que contribuíram com este trabalho de alguma forma. E agradeço àquelas que, mais que tudo, torceram por mim e pelos experimentos, sofreram com os problemas enfrentados, ajudaram com pequenos e grandes gestos, riram nos momentos de descontração e amizade.

Obrigada a todos vocês!!!!

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas humana estão associadas com as distintas e complexas relações parasito-hospedeiro que envolvem diretamente o sistema imune. Nesse contexto, nos propomos analisar a relação entre a resposta imune celular de pacientes chagásicos, após estímulo *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) ou FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *Trypanosoma cruzi*, e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. O grupo de pacientes chagásicos consistiu de 36 indivíduos que foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco e submetidos a uma triagem padronizada que incluiu, exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi*, eletrocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago. Dezesete portadores da forma cardíaca (FC) e 19 da forma indeterminada (FI) participaram deste estudo. Um grupo de 19 indivíduos não chagásicos (NC) foi incluído como um grupo controle. PBMC foram isoladas por centrifugação através de um gradiente de densidade de Ficoll-Paque. As células foram estimuladas com Fitohemaglutinina, Concanavalina, CRA, FRA ou com antígeno solúvel de Epimastigota (Ag-Epi) por 24h, 72h ou 6 dias. Culturas sem estímulo foram utilizadas como controles negativos. A proliferação celular foi avaliada após estímulo por 6 dias de cultivo através da quantificação de ³H-timidina incorporada.

As citocinas foram detectadas em sobrenadantes de cultura obtidos após 24h (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) e 6 dias (IFN- γ) através de ELISA de captura. Os resultados mostraram que apesar de apresentarem índices de estimulação baixos, as células dos pacientes chagásicos estimuladas com os antígenos recombinantes apresentaram maiores respostas proliferativas quando comparados com as dos indivíduos NC. Porém, não foi possível estabelecer um padrão de resposta linfoproliferativa entre os pacientes portadores das formas clínicas FC e FI da doença. Com relação às citocinas secretadas no sobrenadante de cultura após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, os resultados mostraram que CRA, bem como Ag-Epi, foram capazes de estimular a produção de TNF- α e IFN- γ em pacientes chagásicos quando comparado aos indivíduos NC. Porém, os níveis dessas citocinas mostraram-se similares entre os pacientes chagásicos portadores das formas clínicas FC e FI. Apesar de não apresentarem a capacidade de diferenciar as formas clínicas da doença de Chagas através do ensaio de linfoproliferação e da detecção de citocinas de sobrenadante de cultura por ELISA, os antígenos poderiam ser utilizados em estudos sobre a imunopatogênese da doença, investigando papéis imunorregulatórios antígeno-específicos. Além disso, esses antígenos poderiam dar continuidade ao desenvolvimento de marcadores de evolução de prognóstico das formas clínicas severas da doença de Chagas através da avaliação de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Citocinas, Antígenos recombinantes

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that different clinical manifestations of human Chagas' disease are associated with distinct and complex host-parasite relationships directly involving the immune system. Given this, we propose to analyze the relation between the cellular immune response of Chagas patients, after stimulation *in vitro* of PBMC (peripheral blood mononuclear cells) with the recombinant antigens CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) or FRA (Flagellar Repetitive Antigen) of *Trypanosoma cruzi*, and the chronic clinical forms of Chagas' disease. The group of patients with Chagas' disease, 36 individuals in total, were selected at the Chagas' disease clinic at the University of Pernambuco's Oswaldo Cruz Hospital and submitted to a standard screening protocol that included physical examination, serological test for *T. cruzi* infection, electrocardiogram, chest and esophagus X-ray. Seventeen patients with the cardiac form (CF) and 19 with the indeterminate form (IF) participated in this study. One group of 19 healthy individuals was included as a control group. The PBMC were isolated by centrifugation using the Ficoll-Paque density gradient. The cells were stimulated using Phytohemagglutinin, Concanavalin, CRA, FRA or a soluble antigen of Epimastigota (Ag-Epi) for 24h, 72h or 6 days. Cultures not submitted to stimulation were used as negative controls. The proliferation of cells was evaluated after 6 days of culture by quantification of incorporated ³H-thymidine. Cytokines were measured in the supernatants obtained after 24h (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) and

6 days (IFN- γ) using ELISA. The results showed that, although the index of stimulation was small, the cells of the Chagas patients stimulated with the recombinant antigens exhibited higher proliferation responses compared with that of NC individuals. However, when proliferation was compared between patients with the CF or IF of the disease, it was not possible to establish a difference in the response. So far as the cytokines secreted in the culture supernatants after stimulation in vitro with *T. cruzi* antigens were concerned, the results showed that CRA, as well as Ag-Epi, were able to stimulate the production of TNF- α and IFN- γ in Chagas patients as compared with NI individuals. However, the cytokine levels after stimulation with the *T. cruzi* antigens were not different between the patients with CF and IF. Although they do not show the ability to differentiate the clinical forms of Chagas' disease using cellular proliferation and detection of cytokines in culture supernatants by ELISA, the recombinant antigens could be used in studies of the pathology of the Chagas' disease, investigating possible mechanisms that regulate parasite-specific lymphocyte responses. Moreover, these antigens could be used in further studies that aim to discover prognostic markers of the evolution of severe clinical forms of Chagas' disease by evaluating intracytoplasmic cytokines using flow cytometry.

Keywords: Chagas' disease, Cytokines, Recombinant antigens

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Resposta proliferativa de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos.....	45
Figura 2 Resposta proliferativa de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 3 Detecção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo.....	48
Figura 4 Detecção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de <i>T. cruzi</i>	49
Figura 5 Detecção de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo.....	51
Figura 6 Detecção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo.....	53
Figura 7 Detecção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 8 Detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo.....	56
Figura 9 Detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de <i>T. cruzi</i>	57

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Características dos pacientes chagásicos estudados.....	35
Tabela 2 Estatísticas descritivas da produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.....	47
Tabela 3 Estatísticas descritivas da produção de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.....	50
Tabela 4 Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.....	52
Tabela 5 Estatísticas descritivas da produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.....	55
Tabela 6 Perfil de citocinas produzidas e detectadas em sobrenadantes de cultura após estímulo <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>T. cruzi</i> .	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

x g	Aceleração da gravidade
ABTS	2,2'-azino-di[sulfato (6) de 3-etil benzitiazolina]
Ag-Epi	Antígeno solúvel de formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>
Ags-Recs	Antígenos recombinantes
BSA	Albumina sérica bovina
CD28	<i>Cluster of differentiation 28</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
ConA	Concanavalina
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CPM	Contagem por minuto
CRA	<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>
EIE	Ensaio Imunoenzimático
EIE-Rec	Ensaio Imunoenzimático-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Forma cardíaca
FD	Forma digestiva
FI	Forma indeterminada
FRA	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
°C	Graus Celsius
h	hora
HC	Hospital das Clínicas
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigens-D-related</i>
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
³ H-Timidina	Timidina triciada

IE	Índice de estimulação
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG3	Imunoglobulina G 3
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
®	Marca registrada
μ Ci	Micro Curie
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
M	Molar
min.	Minutos
mL	Mililitro
n	Número de amostra
NC	Não chagásico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFR	<i>Paraflagellar Rod Proteins</i>
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SBF	Soro bovino fetal
TGF- β	Fator de crescimento beta e transformação
TA	Temperatura ambiente
Th1	Linfócitos T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliar do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

	Pág.
Folha de rosto	
Folha de avaliação	
Dedicatória	
Agradecimentos	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução.....	17
1.1. Aspectos gerais sobre a doença de Chagas.....	17
1.2. Indicadores preditivos de progressão para as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.....	21
1.3. Os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i>	25
2 Justificativa.....	28
3 Pergunta condutora.....	29
4 Objetivos.....	29
4.1. Objetivo geral.....	29
4.2. Objetivos específicos.....	29
5 Materiais e Métodos.....	30
5.1. Materiais.....	30
5.1.1. Equipamentos.....	30
5.1.2. Reagentes e produtos.....	31
5.2. Métodos.....	32
5.2.1. Antígenos de <i>T. cruzi</i>	32

5.2.2. População do estudo.....	33
5.2.2.1. Aspectos éticos.....	36
5.2.3. Coleta de sangue.....	36
5.2.4. Sorologia para infecção pelo <i>T. cruzi</i>	37
5.2.5. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	37
5.2.6. Ensaio de proliferação celular.....	38
5.2.6.1. Padronização do ensaio.....	38
5.2.6.2. Avaliação da proliferação celular.....	39
5.2.7. Citocinas de sobrenadante de cultura.....	40
5.2.7.1. Padronização da cultura celular	40
5.2.7.2. Obtenção do sobrenadante de cultura.....	41
5.2.7.3. Detecção das citocinas	41
5.2.8. Análise estatística.....	43
6 Resultados.....	44
6.1. Proliferação celular.....	44
6.1.1. Resposta induzida por mitógenos.....	44
6.1.2. Resposta induzida por antígenos de <i>T. cruzi</i>	45
6.2. Detecção de citocinas de sobrenadante de cultura.....	46
6.2.1. Produção de TNF- α	46
6.2.2. Produção de IL-4.....	49
6.2.3. Produção de IL-10.....	51
6.2.4. Produção de IFN- γ	54
6.3. Resumo do perfil de citocinas identificado em pacientes chagásicos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.....	57
7 Discussão.....	59
7.1. Resposta proliferativa dos pacientes chagásicos.....	61
7.2. Produção das citocinas por PBMC de pacientes chagásicos.....	63
7.3. Considerações finais.....	67

8 Conclusões.....	70
9 Perspectivas.....	70
Referências.....	71
Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/ Fiocruz.....	80
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente.....	81
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Voluntário..	82
Apêndice C - Formulário de Pesquisa.....	83
Apêndice D - Artigo em preparação.....	84

1 Introdução

1. 1. Aspectos gerais sobre a doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é um sério problema endêmico que afeta milhões de pessoas na América Central e na América do Sul. A forma clássica de transmissão é a vetorial, através de insetos hematófagos, conhecidos como barbeiros. Porém, várias são as formas de transmissão da doença. Dentre elas, a mais importante é a transmissão transfusional (WENDEL, 1998), além da congênita, via oral, transplante de órgãos contaminados, aleitamento e acidentes de laboratório.

Nas últimas décadas, a doença expandiu-se por vários países em virtude dos movimentos migratórios. O crescente número de indivíduos infectados e o risco real de contaminação por transfusões sanguíneas (DIAS et al., 2002) foram determinantes para a criação da Comissão Intergovernamental de Doença de Chagas, em 1991. Formada por países do Cone Sul, a comissão tinha o propósito de elaborar um plano de ação para a eliminação do vetor e para a interrupção da transmissão por via transfusional (SILVEIRA, 2002). Desde então, métodos para eliminar o barbeiro, como o uso de inseticidas, e práticas para melhorar a qualidade da triagem de sangue vêm sendo utilizados.

No entanto, apesar dos avanços alcançados no controle da transmissão natural da doença, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a prevalência da infecção humana em 15 países endêmicos é de 17 milhões de

casos (MONCAYO, 2003) e que cerca de 120 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença (WHO, 2002a).

Ainda não existe uma quimioterapia segura para o tratamento da doença. Os tradicionais antiparasitários, nifurtimox e benzonidazol, são parcialmente eficazes apenas na fase aguda da infecção (CANÇADO, 1985), e o potencial de cura parasitológica é dependente do tipo de cepa albergada pelo hospedeiro (ANDRADE et al., 1985). Além disso, podem provocar diversos efeitos colaterais.

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

A fase crônica da doença inicia-se cerca de dois a quatro meses após o final da fase aguda. Este período é marcado pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados níveis de anticorpos. Geralmente, o indivíduo chagásico permanece por um longo período de latência clínica chamada de forma indeterminada (FI), que pode durar de dez a trinta anos ou por toda a vida do

doente. Ao final destes anos, os indivíduos infectados podem ou não apresentar manifestações relacionadas ao envolvimento de órgãos como o coração, esôfago, cólon e/ou sistema nervoso, caracterizando as formas clínicas sintomáticas da doença de Chagas (PRATA, 2001).

No entanto, a evolução clínica dos indivíduos chagásicos não é previsível. A maioria dos pacientes (cerca de 50-60%) permanece com a forma indeterminada (FI), e não apresentam sintomatologia relacionada com o coração e o sistema digestivo. Cerca de 20-30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca (FC), caracterizada pela cardiomiopatia chagásica, e 8-10% apresentam a forma digestiva (FD), caracterizada por vários graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e/ ou do cólon (DIAS, 1989). Menos freqüentemente, há alterações no sistema nervoso, caracterizando a forma clínica nervosa da doença.

Em virtude da ausência de sintomas entre os pacientes chagásicos portadores da FI, a descoberta da doença ocorre geralmente através da realização de provas sorológicas por ocasião de inquéritos epidemiológicos em áreas endêmicas, triagem para doações de sangue ou órgãos e ainda na avaliação para admissão em empresas. Neste caso, a identificação de infecção pelo *T. cruzi* poderia prejudicar ou até mesmo provocar a recusa desses indivíduos durante o processo de admissão ao emprego.

A FI desperta grande interesse entre médicos e pesquisadores, pois é nesta fase que parece se determinar a evolução do paciente chagásico. Este aspecto da evolução da FI para as formas clínicas sintomáticas ainda é muito

obscuro. Em razão dos questionamentos sobre a evolução do doente portador da FI, a comunidade médica ainda não possui uma conduta terapêutica universal.

O diagnóstico clínico nos pacientes chagásicos é bastante limitado. De acordo com os critérios estabelecidos pela OMS, os pacientes portadores da FI possuem eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais (WHO, 2002b). Embora, essas técnicas convencionais sejam rotineiramente utilizadas para caracterizar as formas clínicas da doença de Chagas, elas possuem limitações na detecção de alterações precoces da função cardíaca e digestiva. Assim, quando se quer avaliar mais profundamente o estado clínico do indivíduo, outras técnicas mais sensíveis podem ser utilizadas.

Métodos propedêuticos não-invasivos e invasivos têm detectado alterações no coração e/ou no tubo digestivo de alguns dos pacientes chagásicos portadores da FI (OLIVEIRA JR., 1996). Porém ainda é questionável a avaliação da evolução para as fases severas da doença, pois essas técnicas apenas mostram o estado de saúde atual do paciente, não tendo o poder de prever quando e para qual forma clínica crônica o indivíduo evoluirá.

Nesse sentido, investigações que elucidem o potencial evolutivo da doença de Chagas através de estudos longitudinais em pacientes chagásicos, por meio do desenvolvimento de marcadores de formas clínicas devem ser assumidos por grupos de pesquisas, a fim de progredir nas condutas terapêuticas, melhorando a qualidade de vida dos doentes, e contribuir para a garantia dos direitos trabalhistas dos pacientes frente às empresas e ao INSS.

1. 2. Indicadores preditivos de progressão para as formas clínicas crônicas da doença de Chagas

Um estudo clínico realizado no Serviço de Cardiologia do Hospital Eva Peron em Buenos Aires, na Argentina, acompanhou, por 8 anos, 856 chagásicos distribuídos em portadores das formas clínicas indeterminada, e cardíaca com graus variados de acometimento cardíaco. O acompanhamento foi feito através de eletrocardiograma, ecocardiograma e avaliação clínica. Desta análise, a equipe médica construiu um *score* de risco clínico que poderia ser utilizado para prever a progressão da miocardite chagásica crônica (VIOTTI et al., 2005). Um estudo tão grandioso como este poderia estar aliado a outros tipos de avaliações que pudessem auxiliar no prognóstico dos indivíduos chagásicos.

Nesse sentido, diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento da imunidade celular em todas as formas clínicas da doença de Chagas. No entanto, a patogenia das lesões que levam às formas severas da doença ainda é desconhecida. Estudos sugerem que a resposta imune do indivíduo contra o parasito contribui para a evolução da doença (DUTRA et al, 1994; GOMES et al, 2003; BARROS-MAZON et al., 2004). Neste contexto, o possível papel dos mecanismos imunes para o desenvolvimento das formas clínicas severas da doença de Chagas tem sido avaliado. Assim, vários grupos de pesquisa têm buscado um padrão de resposta imune entre os pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas.

Trabalhos têm estudado a resposta imune humoral nos pacientes chagásicos utilizando antígenos do parasito para identificar um padrão de

anticorpos nas diferentes formas clínicas da doença. Estudos realizados por Primavera et al. (1988, 1990) identificaram uma estreita correlação entre IgA anti-amastigota e a FD da doença. Zauza e Borges-Pereira (2001) monitoraram os títulos de IgG contra antígenos complexos do parasito de pacientes portadores da FC durante 10 anos. O estudo concluiu que a progressão da cardiopatia chagásica possui correlação positiva com o aumento dos níveis de IgG. As subclasses IgG1 e IgG3, têm sido identificadas como predominantes na doença de Chagas (GUSMÃO et al., 1982; MICHAILEWSKY et al., 2003), porém, nenhuma correlação com as formas clínicas crônicas tem sido observada (VAN VOORHIS et al., 1991; CETRON et al., 1993).

Ensaio de proliferação celular, utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram realizados entre os pacientes chagásicos após estímulos com antígenos complexos de formas epimastigotas e tripomastigotas ou frações celulares do *T. cruzi*. Diferenças na intensidade da resposta proliferativa entre a FI e as formas sintomáticas foram reportadas, sugerindo que este padrão de reatividade imune poderia estar envolvido na patogenia das lesões tissulares na doença de Chagas (DE TITTO et al. 1985; CETRON et al. 1993; BARROS-MAZON et al. 2004). Porém, outros estudos não encontraram diferenças nas respostas proliferativas entre os pacientes chagásicos portadores da FI e aqueles portadores das formas sintomáticas (MORATO et al., 1986; GAZZINELLI et al., 1990; MICHAILEWSKY et al., 2003).

As dificuldades de estabelecer um perfil distinto de linfoproliferação entre os pacientes chagásicos, através apenas do ensaio de proliferação celular,

têm levado os estudos para a detecção das citocinas secretadas por PBMC após estímulo com antígenos de *T. cruzi*.

Abordagens para a investigação de padrões de secreção de citocinas em PBMC de pacientes chagásicos têm sido realizadas utilizando antígenos complexos das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstraram que a IL-10 é a citocina secretada por pacientes portadores da FI. Já os pacientes chagásicos com doença cardíaca têm maiores níveis de IFN- γ (BAHIA-OLIVEIRA et al, 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003). Além disso, os elevados níveis de IFN- γ estão correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução da FC. Por outro lado, a IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da FI contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, os autores sugerem que pacientes portadores da FI, que são capazes de manter baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-10, poderiam não desenvolver a doença cardíaca.

Essa proposta de que o dano tissular poderia ser mais severo na ausência de mecanismos regulatórios que envolvessem as respostas imunológicas entusiasmou as pesquisas na área da imunologia básica. A ausência da molécula co-estimulatória 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 chagásicos portadores da FC a presença de linfócitos T CD28⁻ pode estar relacionada com o dano cardíaco por secretarem altos níveis de TNF- α . Nessa mesma linha de

investigação, foi demonstrado que pacientes chagásicos portadores da FI possuem células T regulatórias, que poderiam ser capazes de controlar a atividade citotóxica deletéria por inibir a ativação de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ (VITELLI-AVELAR et al., 2005).

Em contraposição a esses estudos, Laucella et al. (2004) ao analisarem as respostas de células T CD8⁺ específicas a peptídeos (derivados de amastigotas e tripomastigotas) e lisado (de formas amastigotas) de *T. cruzi* em PBMC de pacientes chagásicos portadores da FI e em indivíduos com diferentes níveis de acometimento cardíaco, mostraram que pacientes com a forma mais severa da doença cardíaca apresentaram baixos níveis de IFN- γ quando comparados aos pacientes portadores da FI.

Assim, apesar de pouco entendimento sobre os mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas e, conseqüentemente, poucos conhecimentos para prever a evolução para as formas clínicas severas da doença, as citocinas secretadas pelas células dos pacientes poderiam ser a chave para o estabelecimento de marcadores biológicos que auxiliassem no prognóstico das formas graves da doença.

Porém, a maioria dos estudos para investigação da resposta imunológica de pacientes chagásicos é realizada utilizando preparações antigênicas solúveis do parasito. Essas preparações, por apresentarem uma mistura complexa de antígenos, não permitem a detecção de uma resposta imune específica.

O uso de materiais definidos do parasito é claramente um requisito não apenas para o desenvolvimento de testes sorológicos e *screening* em bancos de

sangue, mas também para a identificação de moléculas importantes na interação parasito-hospedeiro e nos estudos para o entendimento da imunopatologia da doença de Chagas (LORCA et al., 1992). Assim, antígenos específicos do *T. cruzi* poderiam ter bom desempenho na discriminação das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Poucos estudos foram realizados com antígenos purificados do parasito. Estudo recente mostrou que PBMC de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com PFR (*Paraflagellar Rod Proteins*), antígenos derivado da porção flagelar do parasito, secretavam altos níveis de IFN- γ e TNF- α , porém, nenhuma diferença foi encontrada entre os pacientes portadores das formas clínicas cardíaca e indeterminada (MICHAILOWSKY et al., 2003). Uma resposta predominante de IFN- γ foi relatada em pacientes portadores de cardiomiopatia quando PBMC foram estimuladas com trans-sialidase (RIBEIRÃO et al., 2000), com a proteína recombinante B13 de *T. cruzi* (ABEL et al., 2001) e com subfrações purificadas de antígeno de tripomastigotas (CUNA et al., 2000). Um outro trabalho, realizado por Arnholdt et al. (1993), também evidenciou a produção de IFN- γ por linhagens de células T após estímulo com cruzipaina.

1. 3. Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Em 1989, Lafaille et al. realizaram a clonagem e a caracterização de dois genes de *T. cruzi*. Estes genes codificam proteínas com estruturas onde há a repetição de um mesmo epítipo. Em função de suas estruturas e localização,

esses antígenos foram denominados de CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen* ou antígeno citoplasmático repetitivo), presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen* ou antígeno flagelar repetitivo), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (LAFAILLE et al. 1989; KRIEGER et al., 1992).

Esses dois antígenos recombinantes (Ags-Recs) foram desenvolvidos pelo grupo do Dr. Samuel Goldenberg do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e, atualmente, são produzidos na forma de *kit* para diagnóstico da infecção chagásica por Bio-Manguinhos/ Fiocruz. O referido *kit* (Ensaio-Imunoenzimático-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos, EIE-Rec) foi utilizado com sucesso no imunodiagnóstico da doença de Chagas (GOLDENBERG, 1991; KRIEGER et al., 1992; GOMES et al, 2001). O EIE-Rec também foi utilizado para avaliar a cura da doença de Chagas em pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte, que foram tratados na fase aguda da infecção (SILVA et al., 2002), podendo ser utilizado para monitoramento do tratamento etiológico.

Além disso, um estudo comparativo do EIE-Rec e de um ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) convencional frente ao teste de hemaglutinação indireta, utilizado na ocasião em bancos de sangue, mostrou que o uso de dois ELISAs com preparações antigênicas diferentes é mais eficaz e poderia ser adotado para o *screening* de doadores de sangue (GADELHA et al., 2003). Esse trabalho foi reconhecido através de dois prêmios: 1) Prêmio Edmundo Chapadeiro durante a XVII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas

realizada em Uberaba-MG, em 2001; 2) Prêmio de Incentivo em Ciências e Tecnologias para o SUS, em 2003. Ainda na área de diagnóstico, os Ags-Recs CRA e FRA foram avaliados para o desenvolvimento de um biosensor no departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife (DINIZ et al., 2003).

As características moleculares dessas proteínas, associadas à resposta anticórpica dos pacientes portadores da doença de Chagas, incentivaram as investigações sobre as propriedades imunogênicas do CRA e do FRA dissociados, pelo grupo de Dra. Yara Gomes do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/ Fiocruz. Assim, os Ags-Recs foram avaliados em protocolos de imunizações em camundongos isogênicos mostrando serem capazes de induzir respostas imune humoral e celular (PEREIRA et al., 2003a; 2003b; 2004; 2005).

Além disso, em um estudo piloto realizado por Pereira et al. (2002) CRA e FRA foram capazes de estimular PBMC de pacientes chagásicos (n=6) a produzir determinado padrão de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas através de citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que FRA estimulou PBMC de pacientes portadores da FC a produzirem IFN- γ e TNF- α e, CRA estimulou a produção de IL-10 por indivíduos portadores da FI, sugerindo que os Ags-Recs, juntos, poderiam identificar distintos perfis de citocinas entre os indivíduos chagásicos portadores das diferentes formas clínicas crônicas da doença. Sendo assim, a continuação do estudo de Pereira et al. (2002), aumentando o número da amostra, assim como a detecção de citocinas no sobrenadante de PBMC, desses

pacientes, estimuladas com CRA ou FRA também seria uma abordagem interessante.

2 Justificativa

Considerando a importância da resposta imune contra os antígenos do parasito evidenciada pela produção de anticorpos específicos contra CRA ou FRA por pacientes chagásicos, e o potencial valor prognóstico dos Ags-Recs mostrado por Pereira et al (2002), nos propomos a avaliar a resposta imune celular específica de pacientes chagásicos a esses antígenos e correlacioná-la com a presença das formas clínicas da doença.

Um estudo longitudinal com seguimento do grupo de pacientes portadores da FI se faria necessário se este perfil diferenciado fosse devidamente confirmado. Desta forma, mecanismos capazes de bloquear ou amenizar o desenvolvimento das formas severas da doença, como por exemplo, estratégias de tratamento durante a fase crônica da doença, poderiam melhorar a qualidade vida dos indivíduos.

3 Pergunta condutora

Qual a relação da resposta imune celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença Chagas?

4 Objetivos

4.1. Objetivo geral

Analisar a relação entre a resposta imune celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* de PBMC com os Ags-Recs CRA ou FRA de *T. cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

4. 2. Objetivos específicos

- Relacionar a resposta de proliferação de PBMC com as formas clínicas crônicas da doença de Chagas;
- Relacionar o perfil das citocinas TNF- α , IL-4, IL-10 e IFN- γ com as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

5 Materiais e Métodos

5. 1. Materiais

5. 1. 1. Equipamentos

- Balanças analíticas: Hangping FA 1604; Ohaus Corporation modelo TS 400 D.

- Câmara de Neubauer: Loptik Labor

- Capela de fluxo laminar vertical: modelo MR 115, Núcleo equipamentos.

- Centrífuga refrigerada: modelo TJ-6R, Beckman Instruments, Inc.

- Centrífuga para placas: modelo Z 320, BHG HERMLE

- Coletor semi-automático de células: Skatron Instruments AS.

- Cintilador: LKB-Wallac Rack Beta, modelo 1209, Pharmacia.

- Deep-freezer (-70°C): Revco INC

- Espectrofotômetro: modelo Ultrospec 3000, Pharmacia.

- Estufa de CO₂: Forma Scientific Inc.

- Leitor de ELISA: modelo 3550, Biorad Laboratories.

- Microscópio invertido: Leitz Labovert FS.

- PHmetro: modelo Chemcadet pHmeter 5984-50, Cole Parmer Instruments.

5. 1. 2. Reagentes e produtos

- Ácido cítrico – VETEC Química fina
- Albumina Sérica Bovina - SIGMA
- Anticorpos anti-citocinas e padrões - RD Systems
- Azul de Trypan - SIGMA
- Concanavalina - SIGMA
- Ficoll-Paque - Ficoll-Paque™ Plus, Amersham Biosciences
- Fitohemaglutinina - Cultilab
- Fosfato de sódio bibásico P.A. - Nuclear
- Fosfato de sódio monobásico P.A. - Reagentes analíticos Dinâmica
- Líquido de cintilação Scintisafe Plus™ 50% - Fisher Scientific
- Meio RPMI 1640 - SIGMA ou Cultilab
- Membrana filtrante - Millipore Corporation
- Cloreto de Sódio P.A. - ISOFAR
- Papel de filtro (102 x 256 mm) para 12 poços - Skatron Instruments
- Placas de cultura - Corning Incorporated Costar, 3548 (placas de 48 poços), 3595 (placas de 96 poços).
- Placas para ELISA (96 poços) Maxisorp - Nalge Nunc International Corporation
- Solução reveladora para ELISA - KPL
- Solução de Penicilina/ Estreptomicina - SIGMA
- Soro bovino fetal - SIGMA

- Streptavidina-peroxidase - Pharmingen
- ³H-timidina - Amersham Biosciences
- Tris - VETEC
- Tubos de coleta à vácuo com heparina - BD Systems ou VACUETTE
- Tween 20 - SIGMA

5. 2. Métodos

5. 2. 1. Antígenos de *T. cruzi*

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz. Todos os lotes de antígenos tiveram seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (LAEMLI, 1970) e coloração para proteínas *Comassie Blue*. Além disso, contaminação por proteínas e carboidratos bacterianos também foi analisada através da coloração pela prata (MORRISSEY, 1981) e pelo ácido periódico de Schiff (JANN et al., 1975) respectivamente. O antígeno solúvel de epimastigota (Ag-Epi) da cepa Y de *T. cruzi*, obtido segundo Pereira et al. (1997), foi utilizado a partir do descongelamento de alíquotas armazenadas no Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/ Fiocruz.

5. 2. 2. População do estudo

Trinta e seis pacientes chagásicos portadores das formas crônicas chagásicas foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Osvaldo Cruz – HUOC, na Universidade de Pernambuco – UPE. A seleção dos indivíduos chagásicos foi baseada no preenchimento de 3 critérios: 1) realização dos exames clínicos para a caracterização das formas clínicas; 2) sorologia positiva para a infecção chagásica (dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes); e 3) não ter sido submetido ao tratamento etiológico.

Os pacientes foram atendidos e examinados por médicos que fazem parte do ambulatório após instruções detalhadas repassadas pela Dra. Glória Cavalcanti, médica do HUOC/ UPE e colaboradora deste estudo, sobre a caracterização das formas clínicas. Para esta caracterização foram realizadas análises clínicas e laboratoriais: exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi* (ELISA e/ou hemaglutinação indireta e/ou imunofluorescência indireta), eletrocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago.

Os pacientes portadores da FC (n=19) foram selecionados por apresentarem alteração no eletrocardiograma e/ou dilatação do coração, ausência de dilatação do esôfago, ausência de queixas digestivas (engasgos e constipação) e sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Os pacientes portadores da FI (n=17) foram selecionados por não apresentarem quaisquer alterações cardíacas e digestivas, mas com sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Um grupo de indivíduos voluntários não chagásicos (NC) (n=19) foi composto para comparação com indivíduos chagásicos através do preenchimento de 3 critérios: 1) nunca ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; 2) nunca ter recebido transfusão de sangue; e 3) ter apresentado teste sorológico negativo para a doença de Chagas.

As características dos pacientes chagásicos que participaram desse estudo encontram-se presente na tabela 1.

Tabela 1: Características dos pacientes chagásicos estudados

	Registro CPqAM	Sexo	Idade	Naturalidade	Forma clínica
1.	HUOC 041	F	65	Limoeiro-PE	FC
2.	HUOC 043	M	51	Iguaraci-PE	FI
3.	HUOV 045	M	53	Timbaúba-PE	FC
4.	HUOV 049	F	51	Orobó-PE	FI
5.	HUOV 050	M	59	Itambé-PE	FC
6.	HUOC 051	M	68	Nazaré da Mata-PE	FC
7.	HUOC 052	F	NI	Limoeiro-PE	FC
8.	HUOC 054	M	33	União dos Palmares-PE	FC
9.	HUOC 056	M	43	São José do Egito-PE	FI
10.	HUOC 057	F	45	Recife-PE	FI
11.	HUOC 061	M	58	Nazaré da Mata-PE	FC
12.	HUOC 062	F	61	Vicência-PE	FC
13.	HUOC 064	M	48	Santana do Mandaú-PE	FI
14.	HUOC 065	F	63	São José da Laje-PE	FI
15.	HUOC 067	M	59	Buíque-PE	FC
16.	HUOC 074	M	36	Monteiro-PE	FI
17.	HUOC 075	M	36	Maraial-PE	FC
18.	HUOC 078	F	23	São Paulo-SP	FI
19.	HUOC 079	F	62	Timbaúba-PE	FC
20.	HUOC 080	F	52	Timbaúba-PE	FI
21.	HUOC 081	F	69	Recife-PE	FI
22.	HUOC 082	F	82	Limoeiro-PE	FC
23.	HUOC 084	F	52	Pedra de Buíque-PE	FI
24.	HUOC 087	M	22	Pedra-PE	FI
25.	HUOC 088	M	44	Serra Talhada-PE	FI
26.	HUOC 089	M	59	Igarassu-PE	FC
27.	HUOC 090	F	62	Pindobinha-PE	FC
28.	HUOC 091	F	55	Cachoeirinha-PE	FI
29.	HUOC 092	F	41	Buenos Aires-PE	FI
30.	HUOC 093	M	46	Recife-PE	FC
31.	HUOC 094	F	53	Floresta-PE	FC
32.	HUOC 096	M	51	Nazaré da Mata-PE	FI
33.	HUOC 097	F	56	São Benedito do Sul-PE	FC
34.	HUOC 098	M	73	São Sebastião do Umbuzeiro-PE	FC
35.	HUOC 102	F	29	Sumé-PE	FI
36.	HUOC 103	M	66	Limoeiro-PE	FC

NI: não informado

5. 2. 2. 1. Aspectos éticos

As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética do CPqAM/ Fiocruz (Anexo A).

Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito: para pacientes chagásicos (Apêndice A) e para indivíduos voluntários NC (Apêndice B). Além disso, um questionário clínico-epidemiológico foi aplicado em indivíduos chagásicos (Apêndice C).

5. 2. 3. Coleta de sangue

De trinta a quarenta mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica para utilização nos ensaios de cultura celular. Cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo seco para obtenção de soro através de centrifugação (1800 x g/ 10min a temperatura ambiente-TA) dos tubos após a retração do coágulo. As alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20°C.

5. 2. 4. Sorologia para infecção pelo *T. cruzi*

Como os pacientes chagásicos selecionados já apresentavam um ou mais testes sorológicos positivos, e como é recomendada a realização de dois testes sorológicos diferentes para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, foi realizado mais um teste diagnóstico visando atender esta recomendação para todos os indivíduos. Para isso, foi utilizado um teste imunoenzimático que utiliza uma mistura de antígenos do *T. cruzi* adsorvidos à placa de ELISA (EIE-Chagas-Biomanguinhos®) proveniente de Bio-Manguinhos/ Fiocruz. Ainda foi aplicado ao referido *kit* as amostras de soro dos indivíduos voluntários NC.

5. 2. 5. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

Em condições estéreis, o sangue heparinizado foi misturado a PBS pH 7,2 na proporção de 1:2 e adicionado a tubos falcons 50mL contendo Ficoll-hypaque (1 parte de Ficoll-Paque e 3 da mistura sangue-PBS). Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (900 x g/ 40 min a 20° C) e através de pipeta *transfer* o anel de PBMC foi removido e depositado em tubos falcons de 15mL. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g/ 10 min a 20° C) em meio RPMI 1640 (na proporção de 1 parte de células para 2 partes de meio). Ao fim das lavagens, as células foram contadas em câmara de Neubauer

através do corante de vitalidade Azul de Trypan e ajustadas para as concentrações desejadas (ver itens 5.2.6.2. e 5.2.7.2.) adicionando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

5. 2. 6. Ensaio de proliferação celular

5. 2. 6. 1. Padronização do ensaio

Três pacientes chagásicos do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE foram selecionados para investigar as condições ideais para o ensaio de proliferação celular. Como controle negativo, um indivíduo NC foi incluído nesse estudo. PBMC foram estimuladas com diferentes concentrações de CRA ou FRA obtidas por diluição seriada com fator 2 (20 a 0,156 μ g/mL) e com Fitohemaglutinina-PHA (10 a 1,25 μ g/mL) por 5 ou 6 dias. As concentrações dos estímulos foram escolhidas de acordo com a resposta proliferativa desempenhada após os períodos de cultivo, levando-se em consideração os mínimos custos. Assim, as concentrações estabelecidas foram: 1) CRA=0,312 μ g/mL; 2) FRA=0,156 μ g/mL; 3) PHA=2,5 μ g/mL. A proliferação celular foi mais elevada após 6 dias de cultivo. (LORENA et al., 2005a). No entanto, ao realizar ensaios de proliferação celular aumentando o número de pacientes foi verificado que não havia diferenças significativas entre as diversas concentrações de Ags-Recs utilizadas. Assim, após

resultados da padronização da cultura celular para obtenção de sobrenadante de cultura (ver o item 5.2.7.1. adiante) as concentrações dos estímulos utilizadas na proliferação foram as mesmas utilizadas para a obtenção de sobrenadante de cultura.

5. 2. 6. 2. Avaliação da proliferação celular

As suspensões celulares (2×10^5 células/poço) foram depositadas em placas de cultura de 96 poços, em triplicata, e estimuladas com PHA ($2,5 \mu\text{g/mL}$), Concanavalina-ConA ($2,5 \mu\text{g/mL}$) e Ags-Recs CRA ou FRA ($2 \mu\text{g/mL}$). Suspensões celulares sem nenhum estímulo foram usadas como controle negativo. O volume total foi $200 \mu\text{L}$ por poço. As placas foram levadas à estufa (37°C a $5\% \text{CO}_2$) por 6 dias. Dezesesseis horas antes do fim do tempo de incubação, $0,5 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina foi adicionada aos poços da placa. Após o fim do tempo de incubação, o material da cultura celular foi coletado através do coletor semi-automático de células e depositado em papel de fibra de vidro. A incorporação de ^3H -timidina foi quantificada através da adição de $1,8 \text{mL}$ de líquido de cintilação aos tubos contendo o material. A leitura foi processada no cintilador, onde as radiações β emitidas são expressas em contagem por minuto (CPM). O índice de estimulação (IE) foi calculado dividindo-se a média da CPM das culturas estimuladas pela média da CPM das culturas sem estímulo.

5. 2. 7. Citocinas de sobrenadante de cultura

5. 2. 7. 1. Padronização da cultura celular

Nove portadores da FC e cinco da FI foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC/ UPE. Como controle negativo, dois indivíduos NC foram incluídos no estudo. PBMC foram estimuladas com diferentes concentrações de CRA ou FRA obtidas por diluição seriada com fator 2 (2 a 0,125µg/mL) e com PHA (10 a 2,5µg/mL) por 24h, 48h, 72h e 6 dias de cultivo. As concentrações dos estímulos foram escolhidas de acordo com as maiores médias de densidade óptica apresentadas pelos pacientes chagásicos após a realização do ELISA de captura para detectar as citocinas nos sobrenadantes das culturas. Da mesma forma, foram analisados os períodos de cultivo para a coleta de sobrenadante. Assim, as concentrações dos estímulos escolhidas foram: 1) Ags-Recs CRA ou FRA=2µg/mL e 2) PHA=10µg/mL. Os tempos de cultivo escolhidos foram: 24h para detecção de TNF- α ; 72h para detecção de IL-10 e 6 dias para detecção de IFN- γ (LORENA et al., 2005b). Para a IL-4 apenas realizamos o ELISA com amostras coletadas após 24h de cultivo.

5. 2. 7. 2. Obtenção do sobrenadante de cultura

Suspensões celulares (5×10^5 células/ poço) foram depositadas em placas de cultura de fundo plano de 48 poços e estimuladas com PHA (10 μ g/mL), ConA (2,5 μ g/mL) e Ags-Recs CRA ou FRA (2 μ g/mL). Suspensões celulares sem nenhum estímulo, foram usadas como controle negativo. O volume total foi 500 μ L por poço. As placas foram incubadas (37°C a 5% CO₂) por diferentes períodos (24 horas, 72 horas e 6 dias). Os sobrenadantes de cultura foram coletados ao fim do tempo de incubação através da centrifugação da placa (400 x g/ 5min a TA). As alíquotas de sobrenadante foram devidamente identificadas e estocadas imediatamente a -70°C.

5. 2. 7. 3. Detecção das citocinas

As citocinas de sobrenadante de cultura celular foram determinadas através de ELISA de captura. Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ L/poço dos anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas (TNF- α =2 μ g/mL, IL-4=2 μ g/mL, IL-10=2 μ g/mL, e IFN- γ =0,5 μ g/mL) diluídos em PBS pH 7,2 e incubadas *overnight* a 4°C. Após lavagem (3 x 200 μ L/poço de PBS-Tween 0,05%), as placas foram bloqueadas com uma solução de PBS-Tween 0,05% e albumina sérica bovina-BSA 1% por 4h à TA. Após lavagem (3 x 200 μ L de PBS-Tween 0,05%), 50 μ L/poço de sobrenadante de cultura, bem como dos

padrões (citocinas recombinantes) foram adicionados em duplicata e incubados *overnight* a 4°C. As diferentes concentrações de padrões foram obtidas através de diluição seriada com fator 2 (TNF- α =2.000 a 3,9pg/mL; IL-4=8.000 a 15,6pg/mL; IL-10=8.000 a 15,6pg/mL; IFN- γ =32.000 a 62,5pg/mL) em RPMI 1640 2% SBF. Após lavagem (3 x 200 μ L de PBS-Tween 0,05%), 50 μ L/poço dos anticorpos monoclonais anti-citocinas conjugados à biotina (TNF- α =100ng/mL; IL-4=12,5ng/mL; IL-10=500ng/mL e IFN- γ =125ng/mL) diluídos em tampão Tris-NaCl pH 7,2 foram adicionados por 2h à TA. Após lavagem (3 x 200 μ L de PBS-Tween 0,05%), 50 μ L de streptavidina-peroxidase diluída 1:10.000 em PBS-Tween 0,1% BSA foram adicionados por 1,5h à TA. Após lavagem (3 x 200 μ L de PBS-Tween 0,05%), os imunocomplexos foram detectados utilizando 50 μ L da solução reveladora (H₂O₂ e ABTS) durante 15 min para TNF- α , 35 min para IL-4, 35 min para IL-10, e 35 min para IFN- γ à TA. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2M e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 405nm.

As referidas concentrações de anticorpos (de captura e biotinilado) e padrões foram estabelecidas previamente através de ensaios de titulação recomendados pelo fabricante.

O programa Microplate Manager® versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc. Molecular Bioscience Group) foi utilizado para a obtenção da média da duplicata e para a determinação das concentrações de citocinas das amostras através da construção de uma curva-padrão obtida com a diluição seriada das citocinas recombinantes identificando a sensibilidade do ensaio para cada citocina.

5. 2. 8. Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de medidas descritivas como: média e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a existência de diferenças entre as culturas estimuladas e sem estímulo dentro de cada grupo estudado foi utilizado o teste Wilcoxon para amostras pareadas. Para comparar a diferença de médias entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, quando existiu diferença entre médias. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o Statistical Package for Social Sciences Incorporation 13.0.

6 Resultados

6. 1. Proliferação celular

6. 1. 1. Resposta induzida por mitógenos

A estimulação mitogênica através de PHA e ConA foi usada como controle positivo para verificar a capacidade proliferativa de PBMC cultivadas em resposta aos antígenos de *T. cruzi*. A resposta de PBMC estimuladas com os mitógenos foi inicialmente comparada entre os grupos de pacientes chagásicos e indivíduos NC. Como mostrado na Figura 1, a incorporação de ³H-timidina foi significativamente maior em pacientes chagásicos após estímulo com ConA, quando comparado aos indivíduos NC. Apesar de elevados IEs, não houve diferença significativa quando os grupos de pacientes chagásicos foram comparados ao grupo de indivíduos NC após estímulo com PHA. Ao analisar a proliferação celular entre os pacientes chagásicos, ou seja, entre os pacientes portadores da FC e da FI, não observamos diferença entre os dois grupos de pacientes.

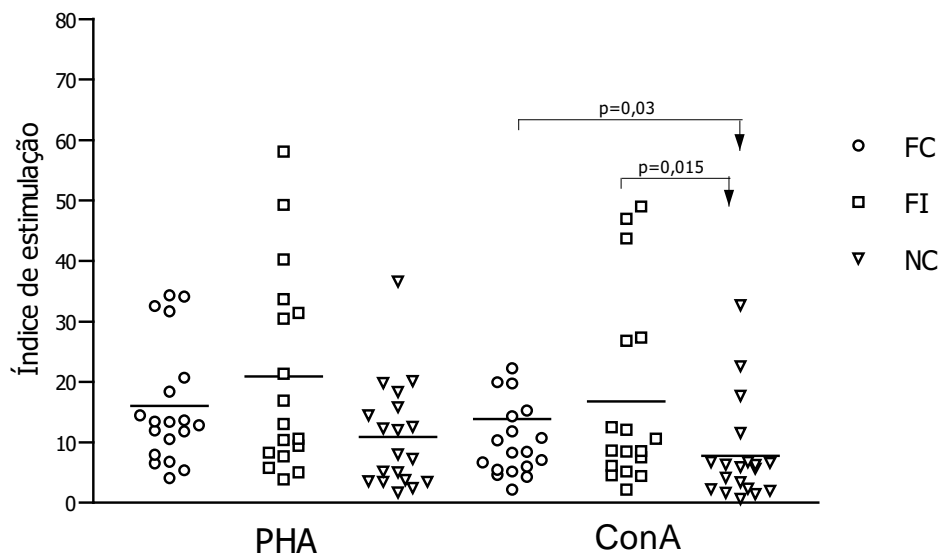


Figura 1: Resposta proliferativa de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos. Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina (ConA). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média das triplicatas em CPM dos estímulos dividida pela média das triplicatas em CPM da cultura sem estímulo de cada indivíduo. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão mostradas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 1. 2. Resposta induzida por antígenos de *T. cruzi*

Quando a proliferação celular antígeno-específica foi avaliada, observou-se que tanto os pacientes chagásicos da FC quanto da FI apresentaram uma resposta proliferativa maior que os indivíduos NC após estímulos com CRA, FRA e Ag-Epi (Figura 2). Porém, não houve diferença da resposta proliferativa entre os indivíduos FC e FI após estímulo com ambos os Ags-Recs, bem como com Ag-Epi.

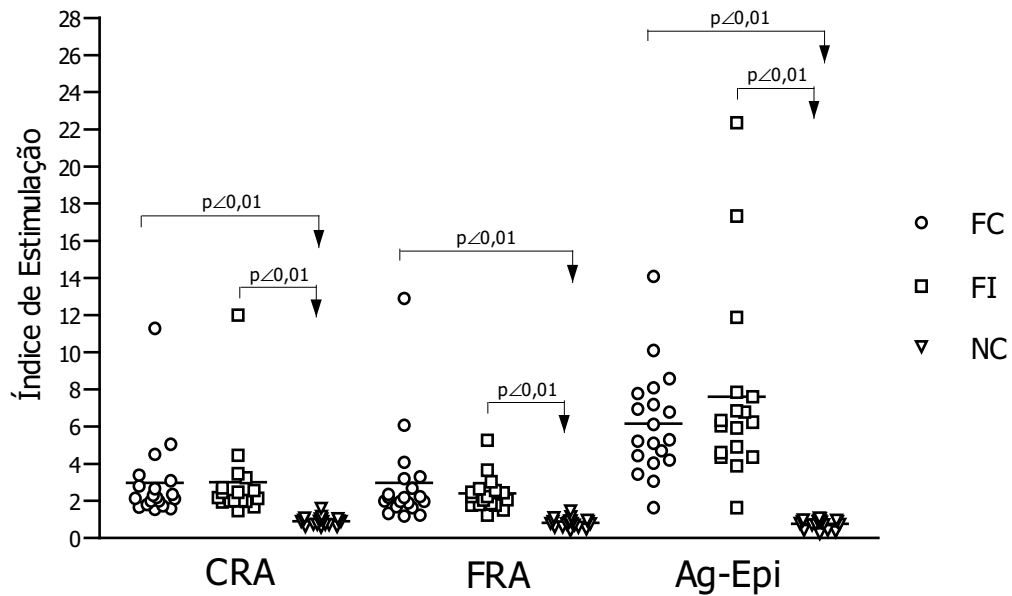


Figura 2: Resposta proliferativa de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média das triplicatas em CPM dos estímulos dividida pela média das triplicatas em CPM da cultura sem estímulo de cada indivíduo. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão mostradas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 2. Detecção de citocinas de sobrenadante de cultura

6. 2. 1. Produção de TNF- α

A produção de TNF- α , avaliada através da comparação das culturas estimuladas com as culturas sem estímulo, dentro de cada grupo, está indicada na Tabela 2.

Tabela 2: Estatísticas descritivas da produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.

Grupo	Culturas	n	Média (pg/mL)	Desvio padrão	p-valor
FC		19			
	Sem Estímulo		432,63	259,96	
	PHA		698,35	273,91	<0,001 *
	ConA		837,50	295,64	<0,001 *
	CRA		662,52	294,01	<0,001 *
	FRA		805,08	352,03	<0,001 *
	AgEpi		478,97	259,93	0,007 *
FI		17			
	Sem Estímulo		356,17	237,26	
	PHA		712,68	232,63	<0,001 *
	ConA		855,80	236,49	<0,001 *
	CRA		652,16	239,88	<0,001 *
	FRA		844,78	221,89	<0,001 *
	AgEpi		460,64	270,72	0,001 *
NC		19			
	Sem Estímulo		237,56	189,67	
	PHA		447,17	224,63	<0,001 *
	ConA		718,04	239,82	<0,001 *
	CRA		386,60	203,80	<0,001 *
	FRA		736,40	247,82	<0,001 *
	AgEpi		253,55	207,51	0,085

FC= Forma cardíaca

FI= Forma indeterminada

NC= não chagásico

PHA= Fitohemaglutinina

ConA= Concanavalina

CRA= *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*

FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*

Ag-Epi= Antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi*

* = $p \leq 0,05$

Após estímulo com os mitógenos, os pacientes portadores da FC e da FI produziram mais TNF- α que os indivíduos NC quando as células foram estimuladas com PHA e com ConA. Porém, apenas houve diferença estatística após estímulo com PHA. Os pacientes portadores da FC e da FI apresentaram

níveis elevados de TNF- α nas culturas celulares sem estímulo antigênico, quando comparado às culturas dos indivíduos NC. No entanto, apenas a produção de TNF- α pelos pacientes chagásicos portadores da FC foi estatisticamente diferente quando comparado ao grupo de indivíduos NC (Figura 3).

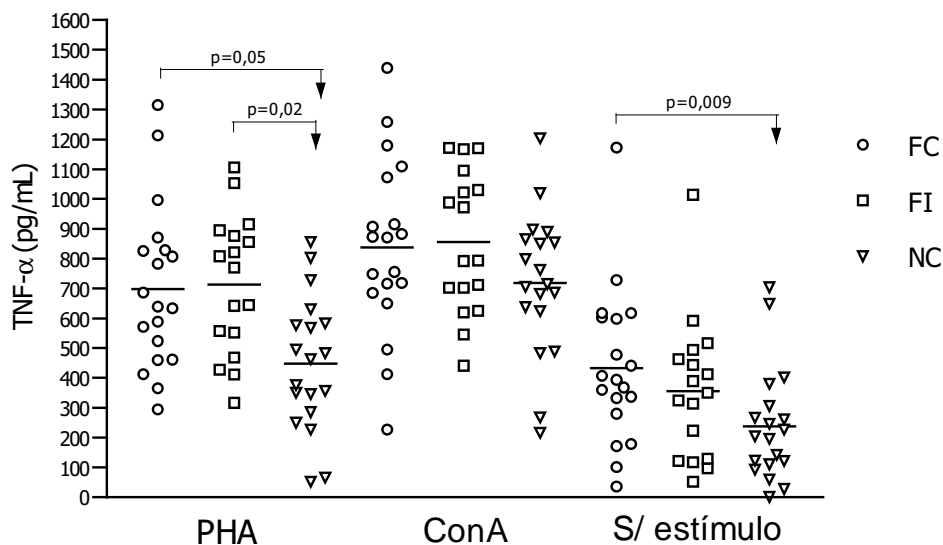


Figura 3: Detecção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo. Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina (ConA). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

A avaliação da capacidade de produção de TNF- α entre os grupos de pacientes chagásicos e indivíduos NC após estímulo com antígenos de *T. cruzi* está mostrada na Figura 4. Sob estimulação com o Ag-Rec CRA, os níveis de TNF- α detectados foram estatisticamente maiores tanto nos pacientes portadores da FC, quanto nos indivíduos portadores da FI, quando comparados aos indivíduos NC. O mesmo ocorreu após estímulo com Ag-Epi (Figura 4).

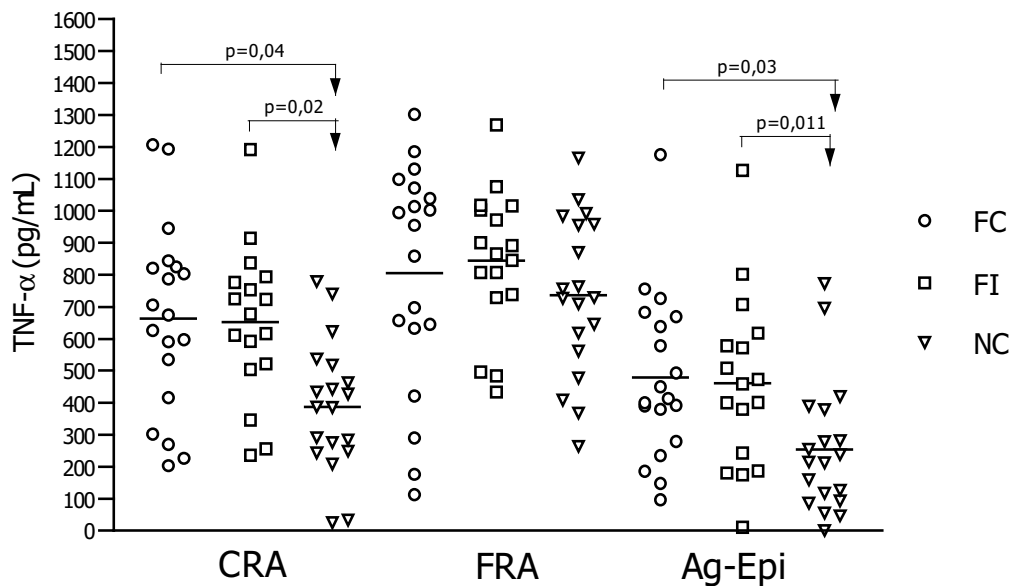


Figura 4: Detecção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 2. 2. Produção de IL-4

A produção de IL-4, avaliada através da comparação das culturas estimuladas com as culturas sem estímulo, dentro de cada grupo, está indicada na Tabela 3. Não houve diferença estatística quando as células foram estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, quando comparado à cultura sem estímulo.

Tabela 3: Estatísticas descritivas da produção de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.

Grupo	Culturas	n	Média (pg/mL)	Desvio padrão	p-valor
FC		19			
	Sem Estímulo		39,66	69,84	
	PHA		196,10	230,21	0,005 *
	ConA		238,57	281,91	0,001 *
	CRA		131,98	254,17	0,123
	FRA		67,58	102,89	0,221
	AgEpi		68,14	125,43	0,260
FI		17			
	Sem Estímulo		52,04	127,25	
	PHA		84,44	95,72	0,770
	ConA		114,69	145,99	0,041 *
	CRA		36,67	66,28	1,000
	FRA		42,83	75,86	0,594
	AgEpi		63,99	79,46	0,075
NC		19			
	Sem Estímulo		10,60	26,41	
	PHA		38,78	60,58	0,058
	ConA		62,47	86,03	0,011 *
	CRA		5,08	12,49	0,465
	FRA		12,54	36,00	0,917
	AgEpi		1,02	0,07	0,109

FC= Forma cardíaca

FI= Forma indeterminada

NC= não chagásico

PHA= Fitohemaglutinina

ConA= Concanavalina

CRA= *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*

FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*

Ag-Epi= Antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi*

* = $p \leq 0,05$

A produção de IL-4 por PBMC de pacientes chagásicos e NC após estimulação com os mitógenos PHA e ConA e sem estímulo está apresentada na Figura 5. Os pacientes chagásicos apresentaram maiores níveis de IL-4 na presença dos mitógenos, quando comparados aos indivíduos NC. No entanto,

apenas os pacientes portadores da FC apresentaram produção de IL-4 estatisticamente significativas quando comparados aos indivíduos NC (Figura 5).

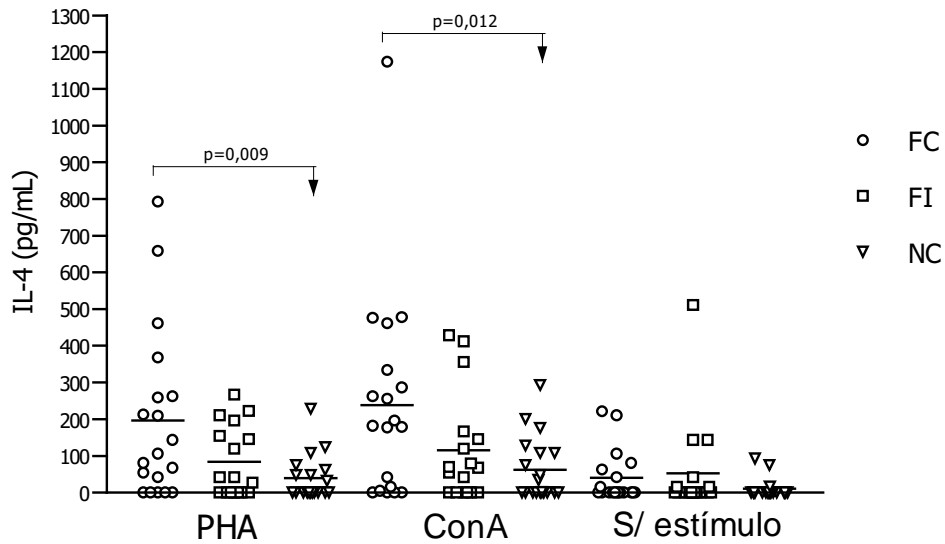


Figura 5: Detecção de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo. Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina (ConA). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 2. 3. Produção de IL-10

A produção de IL-10, avaliada através da comparação das culturas estimuladas com as culturas sem estímulo, dentro de cada grupo, está indicada na Tabela 4.

Tabela 4: Estatísticas descritivas da produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.

Grupo	Culturas	n	Média (pg/mL)	Desvio padrão	p-valor
FC		19			
	Sem Estímulo		177,65	184,11	
	PHA		693,47	297,64	<0,001 *
	ConA		748,19	419,06	<0,001 *
	CRA		244,76	232,86	0,011 *
	FRA		533,64	425,36	<0,001 *
	AgEpi		180,98	187,32	0,605
FI		17			
	Sem Estímulo		158,09	127,67	
	PHA		562,50	266,16	<0,001 *
	ConA		712,23	399,21	<0,001 *
	CRA		260,30	176,98	0,001 *
	FRA		649,09	398,54	<0,001 *
	AgEpi		195,00	185,30	0,074
NC		19			
	Sem Estímulo		88,38	94,38	
	PHA		515,21	231,52	<0,001 *
	ConA		735,24	350,01	<0,001 *
	CRA		219,12	165,40	<0,001 *
	FRA		641,48	376,14	<0,001 *
	AgEpi		133,33	122,30	0,003 *

FC= Forma cardíaca

FI= Forma indeterminada

NC= não chagásico

PHA= Fitohemaglutinina

ConA= Concanavalina

CRA= *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*

FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*

Ag-Epi= Antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi*

* = $p \leq 0,05$

Apesar da produção de IL-10 por PBMC de pacientes chagásicos, tanto portadores da FC como da FI, após estímulos com mitógenos e com os Ags-Recs, ter sido detectada (Tabela 4) nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados (Figuras 6 e 7).

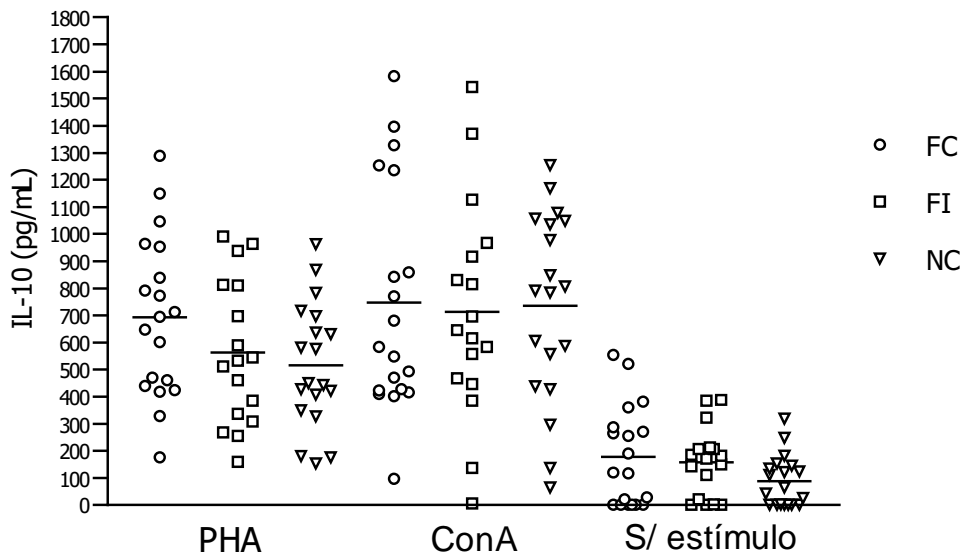


Figura 6: Detecção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo. Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina (ConA). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

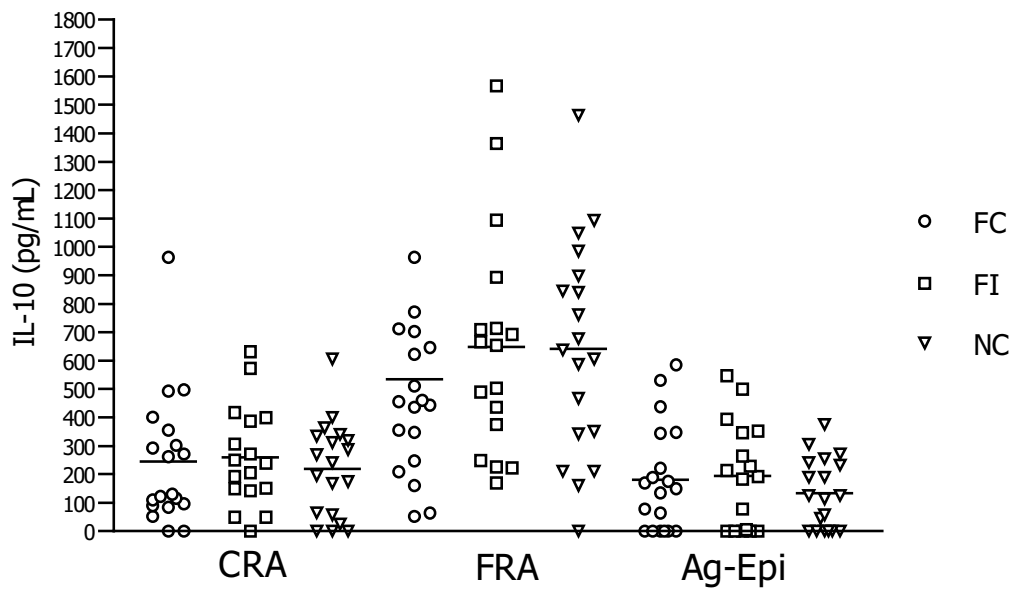


Figura 7: Detecção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 2. 4. Produção de IFN- γ

A produção de IFN- γ , avaliada através da comparação das culturas estimuladas com as culturas sem estímulo, dentro de cada grupo, está indicada na Tabela 5.

Tabela 5: Estatísticas descritivas da produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após comparação das culturas estimuladas com a cultura sem estímulo.

Grupo	Culturas	n	Média (pg/mL)	Desvio padrão	p-valor
FC	Sem Estímulo	19	1976,04	2642,32	
	PHA		7030,56	5569,61	<0,001 *
	ConA		12980,05	7157,83	<0,001 *
	CRA		2725,56	2786,60	0,013 *
	FRA		2793,87	2853,60	0,028 *
	AgEpi		5749,14	5084,95	<0,001 *
FI	Sem Estímulo	15	1367,38	1479,65	
	PHA		7331,44	4497,26	0,001 *
	ConA		14646,62	5767,15	0,001 *
	CRA		1821,22	1578,22	0,055
	FRA		1716,34	1546,41	0,133
	AgEpi		8181,38	4683,94	0,001 *
NC	Sem Estímulo	19	670,09	1538,69	
	PHA		5230,96	4891,16	<0,001 *
	ConA		17538,21	5542,98	<0,001 *
	CRA		977,80	2087,44	0,346
	FRA		1071,77	1669,32	0,013 *
	AgEpi		600,67	1331,80	0,508

FC= Forma cardíaca

FI= Forma indeterminada

NC= não chagásico

PHA= Fitohemaglutinina

ConA= Concanavalina

CRA= *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*

FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*

Ag-Epi= Antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi*

* = $p \leq 0,05$

Não houve diferença entre os grupos estudados quanto à detecção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura após estímulo com os mitógenos PHA e ConA. A produção de IFN- γ foi significativamente mais elevada em pacientes portadores da FC, quando comparados aos indivíduos do grupo NC, em culturas sem estímulo (Figura 8).

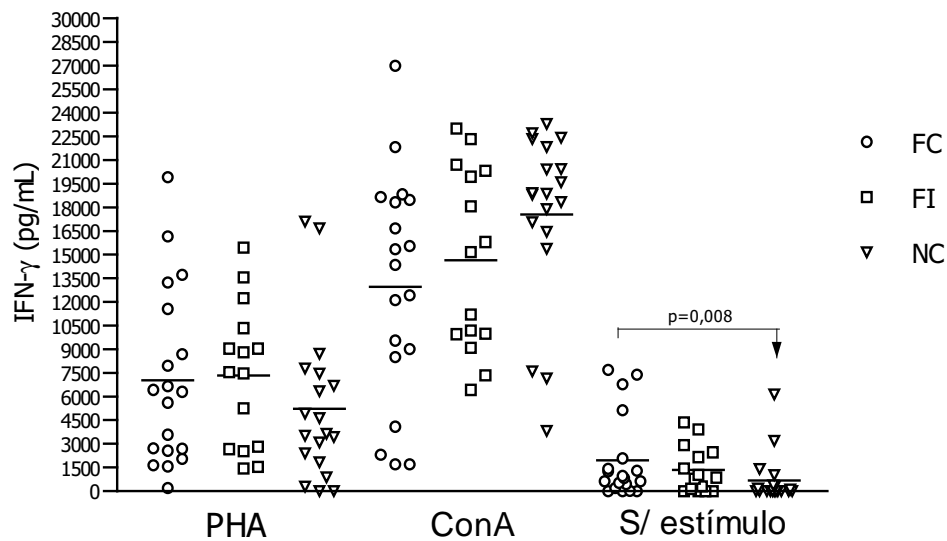


Figura 8: Detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com mitógenos e em cultura sem estímulo. Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina (ConA). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=15) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (O, \square , ∇) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

Com relação à produção de IFN- γ após estímulo com os Ags-Recs, apenas o Ag-Rec CRA foi capaz de induzir a produção da citocina em pacientes chagásicos. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos de pacientes portadores das formas clínicas estudadas. O mesmo ocorreu quando o estímulo foi o Ag-Epi (Figura 9).

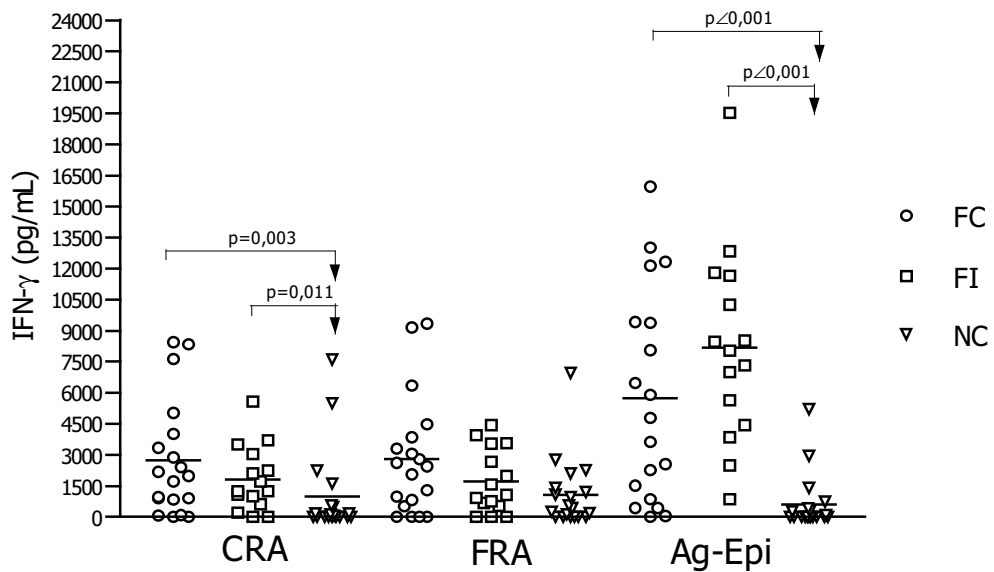


Figura 9: Detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Pacientes portadores das formas clínicas cardíaca (FC) (n=19) e indeterminada (FI) (n=15) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os símbolos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética e as diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

6. 3. Resumo do perfil de citocinas identificado em pacientes chagásicos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas

A caracterização de um perfil de citocinas produzidas e detectadas em sobrenadantes de cultura após estímulo *in vitro* com os antígenos de *T. cruzi* é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Perfil de citocinas produzidas e detectadas em sobrenadantes de cultura após estímulo *in vitro* com os antígenos de *T. cruzi*

Citocinas estudadas	Antígenos de <i>T. cruzi</i>					
	CRA		FRA		Ag-Epi	
	FC	FI	FC	FI	FC	FI
TNF- α	x	x	-	-	x	x
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	-	-
IFN- γ	x	x	-	-	x	x

FC= Forma cardíaca

FI= Forma indeterminada

CRA= *Cytoplasmatic Repetitive Antigen*

FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*

Ag-Epi= Antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi*

X= indicação da detecção da citocina com diferença estatística

- = indicação de ausência de diferença estatística

A tabela mostra, de forma resumida, os resultados obtidos após análise da produção de citocinas. São expressos apenas os resultados em que houve produção de citocinas, que apresentaram diferença estatística, quando os grupos de indivíduos chagásicos (FC ou FI) foram comparados com o grupo de indivíduos NC, lembrando que não houve diferenças estatísticas entre os indivíduos FC e FI para nenhuma das citocinas estudadas.

7 Discussão

Vários estudos têm sugerido uma participação efetiva da imunidade celular na patologia da doença de Chagas, sobretudo na cardiopatia chagásica. De fato, as células T compreendem quase a totalidade das células presentes nos infiltrados inflamatórios de pacientes com miocardiopatia (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al., 1997). Desta forma, a habilidade das células T na reatividade contra o parasito e seus antígenos tem sido demonstrada, encorajando trabalhos que caracterizassem fenotipicamente e funcionalmente essas células com o intuito de investigar seus papéis no estabelecimento das respostas patológicas (indivíduos portadores das formas severas) ou protetoras (indivíduos da forma indeterminada) (DUTRA et al., 2005).

Da avaliação dessas características imunológicas, poderia surgir o desenvolvimento de um marcador de evolução de prognóstico das formas clínicas severas. A utilização de marcadores biológicos identificaria antecipadamente a evolução das formas clínicas da doença de Chagas, auxiliando no direcionamento da conduta terapêutica pelos médicos. Nesse sentido, muitos estudos foram propostos (GOMES et al., 2003; MICHAILOWSKY et al., 2003; BARROS-MAZON et al., 2004; LAUCELLA et al., 2004).

Apesar de vários achados importantes ao se estudar a imunidade celular na infecção chagásica, pouco foi encontrado sobre distintos perfis de resposta celular entre os pacientes chagásicos portadores das formas cardíaca, digestiva ou indeterminada da doença. Muitas vezes, isso se deve ao fato desses trabalhos fazerem uso de antígenos complexos de formas tripomastigota e

epimastigota de *T. cruzi* com mais frequência. A utilização de antígenos que pudessem identificar respostas específicas ao *T. cruzi* aliada aos resultados prévios obtidos por Pereira et al. (2002), onde distintos perfis de citocinas foram encontrados entre os pacientes portadores das formas clínicas cardíaca e indeterminada, impulsionaram o presente estudo com os Ags-Recs CRA e FRA.

Dessa forma, a pergunta que conduziu esse estudo foi: Qual a relação da resposta imune celular de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA ou FRA de *T. cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas? Para isso, estudamos a linfoproliferação e a produção de TNF- α , IL-4, IL-10 e IFN- γ em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes chagásicos com as formas cardíaca e indeterminada da doença.

Apesar de Pernambuco possuir maiores frequências de megaesôfago e megacólon chagásicos na Região Nordeste (VASCONCELOS, 1996), nesse estudo, apenas utilizamos células de pacientes chagásicos portadores das formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença. Não foi possível selecionar pacientes portadores da forma clínica FD, pois os poucos indivíduos com comprometimento digestivo que foram atendidos pelos médicos do HUOC/ UPE, também apresentavam alterações cardíacas, sendo denominados da forma clínica mista. Além disso, alguns pacientes não apresentavam os exames clínicos completos e, assim, não podiam fazer parte da população de estudo. Durante a seleção dos pacientes, apenas um indivíduo portador da FD foi selecionado para a realização das culturas celulares. No entanto, não foi possível incluí-lo na análise dos resultados em virtude da restrita amostragem.

7.1. Resposta proliferativa dos pacientes chagásicos

O ensaio de proliferação celular mostrou que a imunidade celular está bem preservada entre os indivíduos chagásicos, já que a resposta linfoproliferativa dos linfócitos aos mitógenos PHA e ConA foi similar a dos indivíduos NC (Figura 1).

Apesar de evidenciada uma resposta proliferativa contra os Ags-Recs nos indivíduos chagásicos, quando comparada com o grupo de indivíduos NC, essa resposta dos pacientes poderia ser considerada bastante baixa (Figura 2). Muitos trabalhos que investigam a resposta proliferativa consideram positivas as respostas com IE igual ou acima de 2 ou de 3 (DE TITTO et al., 1985; MICHAILOWSKY et al., 2003).

Morato et al. (1986) identificaram que 30% dos pacientes chagásicos portadores da FI e 33,3% portadores da FC apresentaram baixa responsividade a seis antígenos derivados de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*. A diminuição da resposta linfoproliferativa também foi relatada em um estudo longitudinal da resposta imune feito por Mosca et al. (1985), onde níveis de parasitemia (avaliada através de xenodiagnóstico artificial) estavam correlacionados com diminuição da proliferação celular em pacientes chagásicos portadores da FI, sugerindo que, em pacientes com a doença cardíaca, um mecanismo modulatório poderia ter sido perdido. Além disso, pacientes curados mostraram altas respostas proliferativas em comparação com os indivíduos não-curados após estímulo com antígeno solúvel de epimastigota e/ ou tripomastigota (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). Segundo os autores, uma possível explicação para este fato, é um número maior

de células T de memória em pacientes que foram submetidos ao tratamento e considerados curados.

A proliferação celular, decorrente da ativação de antígeno solúvel de tripomastigota, foi significativamente maior em pacientes chagásicos (tanto portadores da FC, quanto da FI, quando comparados aos indivíduos NC, após as culturas terem sido tratadas com indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas (BARROS-MAZON et al., 2004), indicando que as respostas celulares de pacientes chagásicos são reguladas negativamente por prostaglandinas. Além disso, as prostaglandinas podem induzir a diminuição dos níveis de IL-2 e de seu receptor (RINCON et al., 1988), contribuindo para a inibição da proliferação celular.

Macrófagos e/ou células dendríticas sintetizam citocinas ou mediadores solúveis, como os intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, que podem aumentar ou suprimir as respostas proliferativas (SCHLEIFER & MANSFIELD, 1993; PINGE FILHO et al., 1999). A IL-10 é sintetizada por macrófagos, entre outras células, e é considerada uma potente supressora das respostas proliferativas de linfócitos (DE WALL MALEFYT et al., 1993).

De forma geral, há poucas informações sobre os mecanismos que regulam as respostas linfocitárias parasito-específicas em pacientes chagásicos. A proliferação celular, após estímulos com os Ags-Recs, poderia ser investigada com relação ao papel imunorregulatório das células T e seus fatores solúveis na cultura celular entre indivíduos portadores das formas severas da doença e portadores da FI.

7. 2. Produção das citocinas por PBMC de pacientes chagásicos

Vários estudos utilizando animais, especialmente camundongos, têm mostrado que a infecção pelo *T. cruzi* induz a produção de citocinas. Estas têm o papel de modular a resposta imune na resistência do hospedeiro contra o parasito. Porém, pouco ainda é conhecido sobre a participação das citocinas na proteção e/ou nos mecanismos patológicos da doença de Chagas humana.

Estudos em pacientes chagásicos cardíacos têm revelado uma resposta imune do tipo 1, com produção elevada de TNF- α e IFN- γ . Cunha-Neto et al. (1998) estudaram a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de células T obtidas de biópsias de coração de 8 pacientes portadores da FC. Os resultados mostraram que as células de 7/8 biópsias produziram IFN- γ , 6/8 produziram TNF- α e 3/8 produziram IL-10. IL-4 e IL-12 não foram detectadas. A presença de IFN- γ e TNF- α , na ausência de IL-4, indica um padrão de resposta inflamatória do tipo 1 em indivíduos portadores da cardiomiopatia chagásica. Apesar de um número bastante pequeno de indivíduos estudados por Cunha-Neto et al. (1998), essa predominância de TNF- α e IFN- γ está em concordância com outros estudos anteriores (REIS et al., 1993; REIS et al., 1997). Além disso, TNF- α tem sido demonstrada por modular a expressão de moléculas de adesão, participando, desta forma, dos processos inflamatórios por recrutar linfócitos ao sítio de inflamação e contribuindo com a progressão da reação inflamatória local na cardiopatia chagásica (BACHMAIER et al., 1997).

Apesar de alguns estudos mostrarem que os pacientes portadores da FI da doença produzem níveis elevados de IFN- γ por PBMC (GOMES et al., 2003;

LAUCELLA et al., 2004), além de outras citocinas inflamatórias, está claro que IFN- γ está relacionada com a FC da doença. Elevados níveis de IFN- γ têm sido associados com a severidade da doença cardíaca em pacientes chagásicos crônicos (DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; BARROS-MAZON et al., 2004), provavelmente por uma exacerbação da resposta imune, particularmente nas fibras cardíacas, promovendo a destruição dessas células. Por outro lado, também existe uma correlação positiva entre os níveis da citocina e a cura parasitológica da doença de Chagas, quando o tratamento foi feito na fase aguda da doença, sugerindo que IFN- γ poderia estar agindo sinergicamente com a quimioterapia durante o início da doença, apresentando um papel protetor contra o parasito (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; 2000).

Se células T do tipo 1 são relatadas por estarem envolvidas com a severidade da doença de Chagas, seria esperado que PBMC de pacientes portadores da FC produzissem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias quando estimuladas pelos antígenos de *T. cruzi* (CRA, FRA e Ag-Epi). No presente estudo, altos níveis de TNF- α e IFN- γ foram detectados em pacientes chagásicos após estímulo de PBMC com CRA e com Ag-Epi quando comparado aos indivíduos NC. Porém, ao contrário da literatura relatada, não foi identificada a presença de maiores níveis em pacientes portadores da FC, quando comparados aos pacientes portadores da FI (Figuras 4 e 9).

É importante salientar que, por se tratar de um estudo com humanos, apesar de categorizado clinicamente, são grupos extremamente heterogêneos. Os pacientes têm idades diferentes (Tabela 1) e certamente apresentam respostas imunológicas distintas de acordo com seus estágios de infecção (DUTRA et al.,

1997). Nesse sentido, Gomes et al. (2003), ao estudarem a produção de IFN- γ , dividiram o grupo de pacientes com alterações cardíacas de acordo com a severidade da doença através de exames clínicos mais sensíveis. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação entre "altos" e "baixos" produtores de IFN- γ e o estado clínico do paciente.

Com relação aos pacientes chagásicos portadores da FI da doença, estes têm sido identificados por apresentarem uma resposta do tipo 2, com secreção elevada de IL-10 (GOMES et al., 2003), sugerindo, assim, uma proteção imunológica para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica.

De fato, citocinas imunorreguladoras (IL-10, IL-4 e TGF- β) são importantes por controlar a infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992). As células T regulatórias têm sido descritas como uma população de células T que regulam as respostas imunes inata e adaptativa e têm a capacidade de controlar as respostas imunes excessivas ou mal direcionadas, incluindo as respostas aos patógenos ou a antígenos próprios (MALOY & POWRIE, 2001; TRZONSKOWSKI et al., 2004). No entanto, podem contribuir com o escape do *T. cruzi* do sistema imunológico do hospedeiro e com o estabelecimento da fase crônica da doença (SILVA et al., 1992).

Monócitos/ macrófagos em PBMC, de indivíduos com a FI da doença, são as principais células produtoras de IL-10 (GOMES et al., 2003) e podem estar envolvidas na regulação da resposta imune na doença de Chagas, que podem modular a expressão e a função de IL-12 e IFN- γ (BRENER & GAZZINELLI, 1997). O processo destrutivo nos pacientes portadores da FC poderia, por esta razão, resultar de uma falha na regulação da resposta Th1 pela IL-10.

Linfócitos T também estão envolvidos na imunorregulação da doença de Chagas e são estudados para a diferenciar os pacientes portadores da FI daqueles que apresentam as formas severas da doença (MENEZES et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2005). Linfócitos T secretam diferente perfil de citocinas entre as duas formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença, exercendo papel oposto por secretar IL-10 em pacientes chagásicos portadores da FI e, TNF- α em pacientes com a FC (MENEZES et al., 2004). Segundo os autores, essas células são importantes na imunorregulação da doença chagásica, sugerindo que podem ter participação nos mecanismos imunológicos para o controle ou para o desenvolvimento da patologia.

Além disso, indivíduos com sorologia positiva para a infecção, e sem alterações eletrocardiográficas e residentes em áreas endêmicas apresentaram níveis elevados de IL-4, uma outra citocina secretada por células T do tipo 2 (SAMUDIO et al., 1998), sugerindo que as repetidas exposições ao parasito poderiam influenciar um perfil diferenciado de citocinas. Os resultados do presente estudo mostraram que não houve produção de IL-4 após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Tabela 3), estando de acordo com recentes estudos (CUNA et al., 2000; ABEL et al., 2001; MICHAILOWSKY et al., 2003; LAUCELLA et al., 2004), onde a seleção de pacientes não ocorreu restritamente a uma área endêmica da doença. Além disso, apesar da detecção de produção de níveis elevados de IL-10 em sobrenadantes de PBMC de indivíduos chagásicos (FC e FI) após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, sobretudo com FRA (Figura 7), não houve diferença significativa desta produção quando comparado ao grupo de indivíduos NC.

Os resultados do presente estudo mostraram que, através da detecção de citocinas em sobrenadantes de cultura, não foi possível discriminar as formas clínicas da doença de Chagas utilizando os Ags-Recs. É importante salientar que o Ag-Epi foi utilizado para uma comparação com respostas obtidas em estudos anteriores que tinham a mesma proposta de investigação. Nossos dados discordam com os da literatura onde Ag-Epi foi capaz de induzir a produção de IFN- γ por pacientes chagásicos portadores da FC, e IL-10 por chagásicos portadores da FI (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000; GOMES et al., 2003). Assim, outros fatores poderiam estar envolvidos e interferindo nesta resposta.

7.3. Considerações finais

Os achados descritos por Pereira et al. (2002), onde foi evidenciado um perfil distinto de citocinas entre os indivíduos das formas FC e FI utilizando os Ags-Recs CRA e FRA, poderiam ser explicados através de alguns aspectos: o pequeno número de indivíduos estudados por Pereira et al. (2002) poderia não ser representativo. Além disso, as diferenças observadas entre nossos resultados e aqueles apresentados anteriormente podem ser devido à sensibilidade do ELISA de captura, metodologia utilizada no presente estudo, e ao fato que, na avaliação das citocinas intracitoplasmáticas através de citometria de fluxo realizado por esses autores, as citocinas são aprisionadas no interior do citoplasma. Deste modo, a detecção de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo é mais representativa (PRUSSIN & METCALFE, 1995). Os resultados encontrados no

presente trabalho poderiam estar relacionados aos baixos níveis das citocinas nas culturas e/ou ao consumo por receptores celulares, impedindo sua detecção através de ELISA (BAROJA & CEUPPENS, 1987).

Uma outra justificativa para a não identificação de um perfil de secreção de citocinas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs de *T. cruzi* poderia estar relacionado às diferentes localidades para a realização das pesquisas. O estudo realizado por Pereira et al. (2002) foi realizado com pacientes do estado de Minas Gerais e o nosso grupo analisou indivíduos provenientes do estado de Pernambuco (Tabela 1). Estudos em áreas endêmicas distintas, como foi feito por Pereira et al. (2002) e por nosso grupo, poderiam identificar distintas respostas imunológicas já estabelecidas, devido aos diferentes tipos de cepas do parasito.

Uma forte correlação evidenciada entre níveis de anticorpos e a severidade da doença de Chagas foi estudada (TIBAYRENE et al., 1986; PEREZ-FUENTES et al., 2003) em pacientes de um estado mexicano. Os autores concluíram que isto poderia ocorrer em virtude das respostas imunes naturalmente iniciadas contra clones de *T. cruzi* circulantes da área. Da mesma forma, Samudio et al. (1998) ao estudarem indivíduos chagásicos residentes de áreas endêmicas, com ou sem alterações eletrocardiográficas, sugeriram que a frequência de exposição ao parasito poderia influenciar a progressão clínica da cardiomiopatia chagásica através da expressão diferenciada de citocinas.

Um outro ponto a ser comentado é que, apesar de haver uma classificação clínica para os indivíduos chagásicos estabelecida pela OMS (WHO, 2002b), sendo esta adotada pelo presente trabalho, estes critérios podem ser falhos em classificar fidedignamente as formas crônicas da doença. Segundo Dutra

et al. (2005), a categorização dos pacientes chagásicos é baseada na presença e severidade dos sintomas e não faz uso de exames refinados, sendo de grande importância para estudos epidemiológicos, e não necessariamente para estudos clínicos e imunológicos. Assim, pequenas alterações clínicas podem não terem sido identificadas pelos exames convencionais utilizados.

Desta forma, os estudos imunológicos que visem o desenvolvimento de marcadores biológicos devem incluir diferentes metodologias, onde a sensibilidade, especificidade e desempenho devam ser levados em consideração. A possibilidade de avaliação de indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas, onde circulam outras cepas de *T. cruzi*, também é um ponto importante a ser estudado. Porém, preocupação maior seria o estabelecimento da utilização de exames clínicos mais sensíveis para categorizar devidamente as formas clínicas e os níveis de acometimento dos órgãos (coração, esôfago e cólon) dos pacientes chagásicos.

8 Conclusões

O ensaio de proliferação de PBMC, bem como a detecção de citocinas presentes no sobrenadante de cultura, após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs, não foram capazes de distinguir os indivíduos portadores da FC dos indivíduos portadores da FI, indicando que esses antígenos, nas condições utilizadas, não induzem a produção de citocinas que pudessem funcionar como marcadores biológicos da doença de Chagas. Contudo, apesar de o ensaio de proliferação celular não discriminar as respostas de pacientes chagásicos portadores das formas clínicas cardíaca e indeterminada, os resultados obtidos podem sugerir que existam mecanismos imunorreguladores presentes nesses pacientes.

9 Perspectivas

- Estudar o papel imunorregulatório das células T e seus fatores solúveis na cultura celular entre indivíduos portadores das formas clínicas crônicas após estímulos *in vitro* com o CRA e FRA.
- Continuar a investigação dos Ags-Recs para o desenvolvimento de marcadores biológicos das formas clínicas da doença de Chagas através da avaliação de citocinas intracitoplasmáticas, por citometria de fluxo, em pacientes chagásicos de diferentes áreas endêmicas, onde circulam cepas de *T. cruzi* de diferentes biotemas.

Referências

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 63, p. 721-726, 1985.

ABEL, L. C. J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, Londres, v. 17, p. 99-108, 2001.

ARNHOLDT, A. C. et al. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p. 3171-3179, 1993.

BACHMAIER, K. et al. INOS expression and nitrotyrosine for may ion in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. **Circulation**, Dallas, v. 96, p. 585-591, 1997.

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. G. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **The Journal of Infections Diseases**, Chicago, v. 182, n. 2, p.634-638, 2000.

BAROJA, M. L. & CEUPPENS, J. L. More exact quantification of interleuk-2 production by addition of anti-Tac monoclonal antibody to cultures of stimulated lymphocytes. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.98, n.2, p.267-270, 1987.

BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 111, n. 1, p. 137-145, 2004.

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

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

CETRON, M. S. et al. Humoral and cellular immune response of adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 3, p. 370-382, 1993.

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

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

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.

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

DE TITTO, E. H. et al. Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 9, p. 249-254, 1985.

DE WALL MALEFYT, R.; YSSEL, H.; VRIES, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cells clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 11, p.4754-4765, 1993.

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

DIAS, J. C. et al. The impact of Chagas' disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.5, p. 603-612, 2002.

DINIZ, F. B. et al. Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas' disease: antigen-antibody interactions on metallic electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 79-84, 2003.

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

DUTRA, W. O. et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 45, n.1 , p. 74-80, 1997.

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

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

GAZZINELLI, R. T. et al. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 1437-1444, 1990.

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

GOMES, Y. M. et al. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, 2001.

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.

GUSMÃO, R. D. et al. Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 31, n. 3, p. 452-458, 1982.

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

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

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

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

LAFAILLE, J. J. et al. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, 1989.

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

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

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

LORENA, V. M. B.; PEREIRA, V. R. A.; GOMES, Y. M. Avaliação dos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores de evolução das formas clínicas crônicas da Doença de Chagas. In: IX Jorbada Científica da

Pós-graduação da Fiocruz e XIII Reunião Anual de Iniciação Científica da Fiocruz, 2005, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Anais da IX Jornada Científica da Pós-graduação da Fiocruz e XIII Reunião Anual de Iniciação Científica da Fiocruz, 2005a, p. 144.

LORENA, V. M. B. et al. Perfil de citocinas produzidas por pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. In: XXI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e IX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2005, Uberaba. **Resumos...** Uberaba: Anais da XXI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e IX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2005b, p. 9.

MALOY, K. J. & POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n.9, 816-822, 2001.

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

MICHAJLOWSKY, V. et al. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*- derived Paraflagellar Rod Proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 3165-3171, 2003.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.5, p. 577-591, 2003.

MORATO, M. J. et al. Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 35, n. 3, p. 505-511, 1986.

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

MOSCA, W. et al. Longitudinal study of immune response in human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.22, n.3, p.438-441, 1985.

OLIVEIRA JR, W. Forma Crônica: Forma Indeterminada. In: Malta J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Editora Savier, 1996. p. 43-47.

PEREIRA, V. R. A. Identificação de antígenos insolúveis de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* pelo soro de indivíduos chagásicos. **Tese**, Recife, 1997.

PEREIRA, V. R. A. et al. Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores de evolução de formas clínicas. In: XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e VI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2002, Uberaba. **Resumos...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002, p. 27.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003a.

PEREIRA, V. R. A. et al. Antibody isotype responses in BALB/c mice immunized with the Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 823-825, 2003b.

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

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

PÉREZ-FUENTES, R. et al. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/ antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 33, p. 293-299, 2003.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO C. E.; ABRAHAMSOHN I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, New York, v. 193, n. 1, p. 90-98, 1999.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PRIMAVERA, K. S. et al. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 2101-4, 1988.

PRIMAVERA, K. S. et al. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 172-80, 1990.

PRUSSIN, C. & METCALFE, D. D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.188, n.1, p.117-128, 1995.

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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n.5, p. 637-642, 1993.

REIS, M. M. et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical immunology and immunopathology**, New York, v. 83, n. 2, p. 165-172, 1997.

RIBEIRÃO, M. et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunology**, Oxford, v.22, n.1, p. 49-55, 2000.

RINCÓN, M. et al. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. **European journal of immunology**, Weinheim, v.18, n.11, p. 1791-1796, 1988.

SAMUDIO, M. et al. Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. **Acta Tropica**, Basel, v. 69, p. 89-97, 1998.

SCHLEIFER, K. W. & MANSFIELD, J. M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and

prostaglandins. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 10, p. 5492-5503, 1993.

SILVA, E. D. et al. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 132-136, 2002.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 175, n.1, 169-174, 1992.

SILVEIRA, A. C. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. In: SILVEIRA A. C., ARIAS A. R., SEGURA E., GUILLÉN G., RUSSOMANDO G., SCHENONE H., DIAS J. C. P., PADILLA J. V., LORCA M., SALVATELLA R. **O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001.** Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002, p. 15-42.

TIBAYRENE, M. et al. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, n.1 , p. 115-119, 1986.

TRZONSKOWSKI, P. et al. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 112, n. 3, p. 258-267, 2004.

VAN VOORHIS, W. C.; SCHLEKAWY, L.; LE TRONG, H. Molecular mimicry by *Trypanosma cruzi*: the FL-160 epitopo that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 5993-5997, 1991.

VASCONCELOS, D. Fase Crônica: Forma Digestiva. In: Malta J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Editora Savier, 1996. p. 48-58.

VIOTTI, R. et al. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. **Revista Espanhola de Cardiologia**, Madri, v. 58, n. 9, p. 1037-1044, 2005.

VITELLI-AVELAR D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T

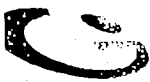
cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

WENDEL, S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 5, p. 406-411, 1998.

WHO-World Health Organization. Chagas disease: multi-governmental strategies. (<http://www.who.int.tdr.research.progress9900/partnership/chagas.html>) [capturado em 22/07/2002]a.

WHO-World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series, v. 905, p. 109, 2002b.

ZAUZA, P. L. & BORGES-PEREIRA, J. Sera levels of Ig G anti-*Trypanosoma cruzi* on evolution of the chronic chagasic cardiopathy in interval of 10 years. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.



Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/ Fiocruz

COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

Projeto

“Caracterização das propriedades imunogênicas dos antígenos recombinantes
CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*”

Coordenador: Yara de Miranda Gomes

Depto. de Imunologia/CPqAM

PARECER

A Comissão 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.

Recife, 08 de março de 2001

Nilma Cintra Leal

Coordenador

Apêndice A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE

Título de projeto: Avaliação dos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Objetivo: Investigar o potencial dos antígenos recombinantes CRA e FRA como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Metodologia: Serão coletados 30 a 40mL de sangue por punção venosa no antebraço, através de um tubo vacuntainer estéril contendo anticoagulante. O sangue será cultivado e avaliado quanto a proliferação celular e dosagens de citocinas, quando estimulado com os antígenos acima citados.

Riscos: Todo o procedimento para coleta de sangue será realizado com material estéril descartável, podendo ser considerado um procedimento isento de riscos.

Benefícios: Os antígenos CRA e FRA funcionando como marcadores das formas clínicas da doença será de grande auxílio para direcionar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente.

Desta forma, eu _____

RG nº _____ expedido por _____

Abaixo assinado, atesto que entendi o conteúdo deste consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade participar desse estudo. E que esclareci todas as minhas dúvidas com o médico (a) responsável pela avaliação clínica.

Assinatura do Paciente

Data: __/__/__

Testemunha

Data: __/__/__

Assinatura do médico responsável

Data: __/__/__

Responsáveis pelo projeto:

Dra. Yara de Miranda Gomes
Pesquisadora Titular do departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559

Virginia Maria Barros de Lorena
Mestranda do Curso em Saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559 e 2101-2566

Apêndice B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIO

Título de projeto: Avaliação dos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Objetivo: Investigar o potencial dos antígenos recombinantes CRA e FRA como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Metodologia: Serão coletados 30 a 40mL de sangue por punção venosa no antebraço, através de um tubo vacuntainer estéril contendo anticoagulante. O sangue será cultivado e avaliado quanto a proliferação celular e dosagens de citocinas, quando estimulado com os antígenos acima citados.

Riscos: Todo o procedimento para coleta de sangue será realizado com material estéril descartável, podendo ser considerado um procedimento isento de riscos.

Benefícios: Os antígenos CRA e FRA funcionando como marcadores das formas clínicas da doença será de grande auxílio para direcionar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente.

Desta forma, eu _____

RG nº _____ expedido por _____

Abaixo assinado, atesto que entendi o conteúdo deste consentimento informado e concordo de livre e espontânea vontade participar desse estudo como voluntário e que esclareci todas as minhas dúvidas com os responsáveis pelo projeto.

Assinatura do voluntário

Data: __/__/__

Testemunha

Data: __/__/__

Assinatura do médico responsável

Data: __/__/__

Responsáveis pelo projeto:

Dra. Yara de Miranda Gomes
Pesquisadora Titular do departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559

Virginia Maria Barros de Lorena
Mestranda do Curso em saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559 e 2101-2566

Apêndice C – Formulário de pesquisa

1. Nome: _____

Prontuário HUOC n°: _____ Registro CPqAM: _____

Data da coleta: _____ Amostra para: () Alinne () Virginia () Dra Glória

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino

3. Idade: _____ (1) De 0 a 12 anos
(2) De 13 a 19 anos
(3) De 20 a 59 anos
(4) A partir de 60 anos
(9) IGN

4. Situação trabalhista: (1) Empregado
(2) Desempregado
(3) Aposentado
(4) Do lar
(5) INSS
(9) IGN

Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____

Telefone: (____) - _____ Celular: (____) - _____

5. Município de nascimento: _____ 6. Estado: _____

6. Forma de contaminação: (1) Vetorial
(2) Transfusional
(3) Congênita
(4) Oral
(5) Transplante de órgão
(6) Acidente de laboratório
(9) IGN

7. Exames clínicos convencionais:

RX coração: (1) normal (2) dilatação
ECG: (1) normal (2) anormal
RX esôfago (1) normal (2) dilatação

8. Sorologia:

IFI: (1) positivo (2) negativo
HAI: (1) positivo (2) negativo
ELISA: (1) positivo (2) negativo

9. Forma clínica crônica: (1) Forma cardíaca
(2) Forma digestiva
(3) Forma indeterminada
(4) Forma mista

10. Medicação: (1) Sim - ano: _____ (2) Não

Apêndice D – Artigo em preparação

Resposta Imune Celular de Indivíduos Chagásicos frente a *Cytoplasmic Repetitive Antigen e Flagellar Repetitive Antigen* de *Trypanosoma cruzi*

Lorena VMB¹, Verçosa AFA¹, Machado RCA¹, Silva L.M¹, Melo MFAD¹, Carvalho CL¹, Modesto T¹, Cavalcanti MGA², Silva ED³, Ferreira AGP³, Correa-Oliveira R⁴, Pereira VRA¹, Gomes YM¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/Fiocruz, Recife-PE, ²Hospital Oswaldo Cruz – HUOC/Universidade de Pernambuco/UPE, Recife-PE, ³Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, ⁴ Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR/Fiocruz, Belo Horizonte, MG.

Correspondência para: Yara M. Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil. Fax: 55-81-34532449, Phone: 55-81-2101-2559. email: yara@cpqam.fiocruz.br

Abstract

Several studies have demonstrated that different clinical manifestations of human Chagas' disease are associated with distinct and complex host-parasite relationships directly involving the immune system. Given this, we propose to analyze the relation between the cellular immune response of Chagas patients, after stimulation *in vitro* of PBMC (peripheral blood mononuclear cells) with the recombinant antigens CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) or FRA (Flagellar Repetitive Antigen) of *Trypanosoma cruzi*, and the chronic clinical forms of Chagas' disease. Seventeen patients with the cardiac form (CF) and 19 with the indeterminate form (IF) participated in this study. One group of 19 healthy individuals was included as a control group. The PBMC were isolated by

centrifugation using the Ficoll-Paque density gradient. The cells were stimulated using Phytohemagglutinin, Concanavalin, CRA, FRA or a soluble antigen of Epimastigota (Ag-Epi) for 24h, 72h or 6 days. The proliferation of cells was evaluated after 6 days of culture by quantification of incorporated ^3H -thymidine. Cytokines were measured in the supernatants obtained after 24h (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) and 6 days (IFN- γ) using ELISA. Although they do not show the ability to differentiate the clinical forms of Chagas' disease using cellular proliferation and detection of cytokines in culture supernatants, the recombinant antigens could be used in studies of the pathology of the Chagas' disease, investigating possible mechanisms that regulate parasite-specific lymphocyte responses. Moreover, these antigens could be used in further studies that aim to discover prognostic markers of the evolution of severe clinical forms of Chagas' disease by evaluating intracytoplasmic cytokines using flow cytometry.

Keywords: Chagas' disease, Cytokines, Recombinant antigens

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas humana estão associadas com as distintas e complexas relações parasito-hospedeiro que envolvem diretamente o sistema imune. Nesse contexto, nos propomos analisar a relação entre a resposta imune celular de pacientes chagásicos, após estímulo *in vitro* de PBMC com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) ou FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *T. cruzi*, e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Dezesete portadores da forma cardíaca (FC) e 19 da forma indeterminada (FI) participaram deste estudo. Um grupo de 19 indivíduos não infectados (NC) foi incluído como um grupo controle. PBMC foram estimuladas com CRA, FRA ou com antígeno solúvel de Epimastigota (Ag-Epi) por 24h, 72h ou 6 dias. A proliferação celular foi avaliada após estímulo por 6 dias de cultivo através da quantificação de ^3H -timidina incorporada. As citocinas foram detectadas em sobrenadantes de cultura obtidos após 24h (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) e 6 dias (IFN- γ) através de ELISA de captura. Apesar de não apresentarem a capacidade de diferenciar as

formas clínicas da doença de Chagas através do ensaio de linfoproliferação e da detecção de citocinas de sobrenadante de cultura, os antígenos poderiam ser utilizados em estudos sobre a imunopatogênese da doença, investigando papéis imunorregulatórios antígeno-específicos. Além disso, esses antígenos poderiam dar continuidade ao desenvolvimento de marcadores de evolução de prognóstico das formas clínicas severas da doença de Chagas através da avaliação de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Citocinas, Antígenos recombinantes

Introdução

Diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento da imunidade celular em todas as formas clínicas da doença de Chagas. No entanto, a patogenia das lesões que levam às formas severas da doença ainda é desconhecida. Estudos sugerem que a resposta imune do indivíduo contra o parasito contribui para a evolução da doença (DUTRA et al, 1994; GOMES et al, 2003; BARROS-MAZON et al., 2004). Neste contexto, o possível papel dos mecanismos imunes para o desenvolvimento das formas clínicas severas da doença de Chagas tem sido avaliado. Assim, vários grupos de pesquisa têm buscado um padrão de resposta imune entre os indivíduos chagásicos portadores das diferentes formas clínicas.

Ensaio de proliferação celular, utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram realizados entre os pacientes chagásicos após estímulos com antígenos complexos de formas epimastigotas e tripomastigotas ou frações celulares do *T. cruzi*. Diferenças na intensidade da resposta proliferativa entre a FI e as formas sintomáticas foram reportadas, sugerindo que este padrão de reatividade imune poderia estar envolvido na patogenia das lesões tissulares na doença de Chagas (DE TITTO et al. 1985; CETRON et al. 1993; BARROS-MAZON et al. 2004). Porém, outros estudos não encontraram diferenças nas respostas proliferativas entre os pacientes assintomáticos e aqueles portadores das formas sintomáticas (MORATO et al., 1986; GAZZINELLI et al., 1990; MICHAILOWSKY et al., 2003).

Abordagens para a investigação de padrões de secreção de citocinas em PBMC de pacientes chagásicos têm sido realizadas utilizando antígenos complexos de *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstraram que a IL-10 é a citocina secretada por pacientes na FI. Já os pacientes com a FC têm maiores níveis de IFN- γ (BAHIA-OLIVEIRA et al, 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

Além disso, os elevados níveis de IFN- γ estão correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução da FC. Por outro lado, a IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro na FI contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, é oportuno especular que pacientes na FI que são capazes de manter baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-10 poderiam não desenvolver a doença cardíaca.

Essa proposta de que o dano tissular poderia ser mais severo na ausência de mecanismos regulatórios que envolvessem as respostas imunológicas entusiasmou as pesquisas na área da imunologia básica. A ausência da molécula co-estimulatória CD28 em linfócitos T foi estudada por Menezes et al. (2004), mostrando que essas células, em indivíduos FI, tem papel protetor. Já em indivíduos com a FC podem estar relacionadas com o dano cardíaco. Nessa mesma linha de investigação, foi demonstrado que pacientes chagásicos portadores da FI possuem células T regulatórias, que poderiam ser capazes de controlar a atividade citotóxica deletéria por inibir a ativação de células T CD8+ HLA-DR+ (VITELLI-AVELAR et al., 2005).

Em contraposição a esses estudos, Laucella et al. (2004) ao analisarem as respostas de células T CD8+ específicas a peptídeos (derivados de amastigotas e tripomastigotas) e lisado (de formas amastigotas) de *T. cruzi* em PBMC de pacientes chagásicos com a FI e com diferentes níveis de acometimento cardíaco, mostraram que pacientes com a forma mais severa da doença cardíaca apresentaram baixos níveis de IFN- γ quando comparados aos indivíduos com a FI.

A utilização de materiais definidos do parasito é claramente um requisito não apenas para o desenvolvimento de testes sorológicos e *screening* em

bancos de sangue, mas também para a identificação de moléculas importantes na interação parasito-hospedeiro e nos estudos para o entendimento da imunopatologia da doença de Chagas (LORCA et al., 1992). Assim, antígenos específicos do *T. cruzi* poderiam ter bom desempenho na discriminação das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Poucos estudos foram realizados com antígenos purificados do parasito. Estudo recente mostrou que PBMC de indivíduos chagásicos após estímulo *in vitro* com PFR, antígeno derivado da porção flagelar do parasito, secretavam altos níveis de IFN- γ e TNF- α , porém, nenhuma diferença foi encontrada entre os indivíduos FC e FI (MICHAILOWSKY et al., 2003). Uma resposta predominante de IFN- γ foi relatada em pacientes portadores de cardiomiopatia quando PBMC foram estimuladas com trans-sialidase (RIBEIRÃO et al., 2000), com a proteína recombinante B13 de *T. cruzi* (ABEL et al., 2001) e com subfrações purificadas de antígeno de tripomastigotas (CUNA et al., 2000). Um outro trabalho, realizado por Arnholdt et al. (1993), também evidenciou a produção de IFN- γ por linhagens de células T após estímulo com cruzipáina.

Dois antígenos recombinantes (Ags-Recs) foram utilizados com sucesso no imunodiagnóstico da doença de Chagas (GOLDENBERG, 1991; KRIEGER et al., 1992; GOMES et al., 2001; GADELHA et al., 2003). Os Ags-Recs também foram utilizados para avaliar a cura da doença de Chagas em pacientes de Minas Gerais que foram tratados na fase aguda da infecção (SILVA et al., 2002). Em função de suas estruturas e localização, esses antígenos foram denominados de CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen* ou antígeno citoplasmático repetitivo), presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen* ou antígeno flagelar repetitivo), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (LAFAILLE et al. 1989; KRIEGER et al., 1992).

Os Ags-Recs foram avaliados em protocolos de imunizações em camundongos isogênicos mostrando serem capazes de induzir respostas imune humoral e celular (PEREIRA et al., 2003a; 2003b; 2004; 2005). Além disso, em um estudo piloto realizado por Pereira et al. (2002) CRA e FRA foram capazes de induzir a produção de citocinas, avaliadas através de citometria de fluxo, por

PBMC de indivíduos chagásicos. FRA estimulou PBMC de pacientes com a FC a produzirem IFN- γ e TNF- α e, CRA estimulou a produção de IL-10 por indivíduos portadores da FI da doença, sugerindo que os Ags-Recs, juntos, poderiam identificar distintos perfis de citocinas entre os indivíduos portadores das diferentes formas clínicas da doença.

Considerando a importância da resposta imune contra os antígenos do parasito evidenciada pela produção de anticorpos específicos contra CRA ou FRA por indivíduos chagásicos, e o potencial valor prognóstico dos Ags-Recs mostrado por Pereira et al (2002), nos propomos a avaliar a resposta imune celular específica de indivíduos chagásicos a esses antígenos e correlacioná-la com a presença das formas clínicas da doença.

Metodologia

Antígenos de *T. cruzi*

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz. O antígeno solúvel de epimastigota (Ag-Epi) da cepa Y de *T. cruzi*, obtido segundo Pereira et al. (1997), foi utilizado a partir do descongelamento de alíquotas armazenadas no Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/ Fiocruz.

População do estudo

Trinta e seis pacientes chagásicos portadores das formas crônicas chagásicas foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC, na Universidade de Pernambuco – UPE. A seleção dos indivíduos chagásicos foi baseada no preenchimento de 3 critérios: 1) realização dos exames clínicos para a caracterização das formas clínicas; 2) sorologia positiva para a infecção chagásica (dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes); e 3) não ter sido submetido ao tratamento etiológico. Para esta caracterização foram realizadas análises clínicas e laboratoriais: exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi* (ELISA e/ou

hemaglutinação indireta e/ou imunofluorescência indireta), raio-X de tórax, raio-X de esôfago e eletrocardiograma. Os indivíduos portadores da FC (n=19) foram selecionados por apresentarem alteração no eletrocardiograma e/ou dilatação do coração, ausência de dilatação do esôfago, ausência de queixas digestivas (entalos e constipação) e sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*. Os indivíduos portadores da FI (n=17) foram selecionados por não apresentarem quaisquer alterações cardíacas e digestivas, mas com sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*. Um grupo de indivíduos voluntários não chagásicos (NC) (n=19) foi composto para comparação com indivíduos chagásicos através do preenchimento de 3 critérios: 1) nunca ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; 2) nunca ter recebido transfusão de sangue; e 3) ter apresentado testes sorológicos negativos para a doença de Chagas. As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética do CPqAM/ Fiocruz. Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito.

Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico

De 30 a 40mL de sangue heparinizado foi misturado a PBS pH 7,2 (1:2) e adicionado a tubos contendo Ficoll-hypaque (1:3 da mistura sangue-PBS). Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (900 x g por 40 min. a 20° C) onde o anel de PBMC foi removido. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g por 10 min. a 20° C) em meio RPMI 1640. Ao fim das lavagens, as células foram contadas em câmara de Neubauer através do corante de vitalidade Azul de Trypan e ajustadas para as concentrações desejadas adicionando meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF).

Ensaio de proliferação celular

As suspensões celulares (2×10^5 células/poço) foram depositadas em placas de cultura de 96 poços e estimuladas com Fitohemaglutinina-PHA (2,5µg/mL), Concanavalina-ConA (2,5µg/mL) e Ags-Recs CRA ou FRA (2µg/mL). Suspensões celulares sem nenhum estímulo foram usadas como controle negativo. O volume

total foi 200 μ L por poço. As placas foram levadas à estufa (37°C/5% CO₂) por 6 dias. Dezesesseis horas antes do fim do tempo de incubação, 0,5 μ Ci de ³H-timidina/poço foi adicionada. O material da cultura celular foi coletado através do coletor semi-automático de células e depositado em papel de fibra de vidro. A incorporação de ³H-timidina foi quantificada através das radiações β emitidas expressas em contagem por minuto (CPM). O índice de estimulação (IE) foi calculado dividindo-se a média da CPM das culturas estimuladas pela média da CPM das culturas sem estímulo.

Avaliação das citocinas de sobrenadante de cultura

Suspensões celulares (5 x 10⁵ células/ poço) foram depositadas em placas de cultura de fundo plano de 48 poços e estimuladas com PHA (10 μ g/mL), ConA (2,5 μ g/mL) e Ags-Recs CRA ou FRA (2 μ g/mL). Suspensões celulares sem nenhum estímulo, foram usadas como controle negativo. O volume total foi 500 μ L por poço. As placas foram incubadas (37°C/5% CO₂) por diferentes períodos (24 horas, 72 horas e 6 dias). As alíquotas de sobrenadante foram devidamente identificadas e estocadas imediatamente a -70°C. As citocinas foram determinadas através de ELISA de captura. Placas de microtitulação de 96 poços sensibilizadas com os anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas (TNF- α =2 μ g/mL, IL-4=2 μ g/mL, IL-10= μ g/mL, e IFN- γ =0,5 μ g/mL) e incubadas *overnight* a 4°C. O sobrenadante de cultura (50 μ L/poço), bem como os padrões (citocinas recombinantes) foram adicionados em duplicata e incubados *overnight* a 4°C. Os padrões foram obtidos através de diluição seriada com fator 2 a partir das concentrações iniciais: TNF- α =2.000 pg/mL; IL-4=8.000 pg/mL; IL-10=8.000 pg/mL; IFN- γ =16.000 pg/mL em RPMI 1640 2% SBF. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas conjugados à biotina (TNF- α =100ng/mL; IL-4=12,5ng/mL; IL-10=500ng/mL e IFN- γ =125ng/mL) foram adicionados por 2h à TA e em seguida, a streptavidina-peroxidase (1:10.000) foi adicionada por 1,5h à TA. Os imunocomplexos foram detectados utilizando 50 μ L da solução reveladora (H₂O₂ e ABTS) durante 15 min a 35 min à TA. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2M e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 405nm.

Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. Para testar a suposição de normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a existência de diferenças entre os estímulos e a cultura sem estímulo dentro de cada grupo estudado foi utilizado o teste Wilcoxon para amostras pareadas. Para comparar a diferença de médias entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, quando existiu diferença entre médias. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o Statistical Package for Social Sciences Incorporation 13.0.

Resultados e Discussão

Vários estudos têm sugerido uma participação efetiva da imunidade celular na patologia da doença de Chagas, sobretudo na cardiopatia chagásica. De fato, as células T compreendem quase a totalidade das células presentes nos infiltrados inflamatórios de pacientes com miocardiopatia (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al., 1997). Desta forma, a habilidade das células T na reatividade contra o parasito e seus antígenos tem sido demonstrada, encorajando trabalhos que caracterizassem fenotipicamente e funcionalmente essas células com o intuito de investigar seus papéis no estabelecimento das respostas patológicas (indivíduos portadores das formas severas) ou protetoras (indivíduos da forma indeterminada) (DUTRA et al., 2005).

Da avaliação dessas características imunológicas, poderia surgir o desenvolvimento de um marcador de evolução de prognóstico das formas clínicas severas. A utilização de marcadores biológicos identificaria antecipadamente a evolução das formas clínicas da doença de Chagas, auxiliando no redirecionamento da conduta terapêutica pelos médicos. Nesse sentido, muitos estudos foram propostos (GOMES et al., 2003; MICHAILOWSKY et al., 2003; BARROS-MAZON et al., 2004; LAUCELLA et al., 2004).

O ensaio de proliferação celular mostrou que a imunidade celular está bem preservada entre os indivíduos chagásicos, já que a resposta linfoproliferativa dos linfócitos aos mitógenos PHA e ConA foi similar a dos indivíduos NC

Apesar de evidenciada uma resposta proliferativa contra os Ags-Recs nos indivíduos chagásicos, quando comparada com o grupo de indivíduos NC, essa resposta dos pacientes poderia ser considerada bastante baixa (Figura 1). Muitos trabalhos que investigam a resposta proliferativa consideram positivas as respostas com IE igual ou acima de 2 ou de 3 (DE TITTO et al., 1985; MICHAILOWSKY et al., 2003).

Morato et al. (1986) identificaram que 30% dos indivíduos chagásicos da FI e 33,3% da FC apresentaram baixa responsividade a seis antígenos derivados de diferentes cepas e clones de *T. cruzi*. A diminuição da resposta linfoproliferativa também foi relatada em um estudo longitudinal da resposta imune feito por Mosca et al. (1985), onde níveis de parasitemia (avaliada através de xenodiagnóstico artificial) estavam correlacionados com diminuição da proliferação celular em indivíduos com a FI, sugerindo que, em pacientes com a FC, um mecanismo modulatório poderia ter sido perdido. Além disso, pacientes curados mostraram altas respostas proliferativas em comparação com os indivíduos não-curados após estímulo com antígeno solúvel de epimastigota e/ ou tripomastigota (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). Segundo os autores, uma possível explicação para este fato, é um número maior de células T de memória em pacientes que foram submetidos ao tratamento e considerados curados.

Estudos têm demonstrado que vários fatores poderiam interferir nessa supressão linfocitária. Proliferação celular, decorrente da ativação de antígeno solúvel de tripomastigota, foi significativamente maior em indivíduos chagásicos (tanto portadores da FC, quanto da FI) e não em indivíduos NC, quando as culturas foram tratadas com indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas (BARROS-MAZON et al., 2004), indicando que as respostas celulares de pacientes chagásicos são reguladas negativamente por prostaglandinas. Além disso, as prostaglandinas podem induzir a diminuição dos

níveis de IL-2 e de seu receptor (RINCON et al., 1988), contribuindo para a inibição da proliferação celular.

Macrófagos e/ou células dendríticas sintetizam citocinas ou mediadores solúveis, como os intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, que podem aumentar ou suprimir as respostas proliferativas (SCHLEIFER & MANSFIELD, 1993; PINGE FILHO et al., 1999). A IL-10 é sintetizada por macrófagos, entre outras células, e é considerada uma potente supressora das respostas proliferativas de linfócitos (DE WALL MALEFYT et al., 1993).

De forma geral, há poucas informações sobre os mecanismos que regulam as respostas linfocitárias parasito-específicas em pacientes chagásicos. A proliferação celular, após estímulos com os Ags-Recs, poderia ser investigada com relação ao papel imunorregulatório das células T e seus fatores solúveis na cultura celular entre indivíduos portadores das formas severas da doença e portadores da FI.

Com relação à produção de citocinas, estudos em pacientes cardíacos têm revelado uma resposta imune do tipo 1, com produção elevada de TNF- α e IFN- γ . Cunha-Neto et al. (1998) estudaram a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de células T obtidas de biópsias de coração de 8 pacientes com a FC. Os resultados mostraram que as células de 7/8 biópsias produziram IFN- γ , 6/8 produziram TNF- α e 3/8 produziram IL-10. IL-4 e IL-12 não foram detectadas. A presença de IFN- γ e TNF- α , na ausência de IL-4, indica um padrão de resposta inflamatória do tipo 1 em indivíduos portadores da cardiomiopatia chagásica. Apesar de um número bastante pequeno de indivíduos estudados por Cunha-Neto et al. (1998), essa predominância de TNF- α e IFN- γ está em concordância com outros estudos anteriores (REIS et al., 1993; REIS et al., 1997). Além disso, TNF- α tem sido demonstrada por modular a expressão de moléculas de adesão, participando, desta forma, dos processos inflamatórios por recrutar linfócitos ao sítio de inflamação e contribuindo com a progressão da reação inflamatória local na cardiopatia chagásica (BACHMAIER et al., 1997).

Apesar de alguns estudos mostrarem que os indivíduos com a FI da doença produzem níveis elevados de IFN- γ por PBMC (GOMES et al., 2003;

LAUCELLA et al., 2004), além de outras citocinas inflamatórias, está claro que IFN- γ está relacionada com a FC da doença. Elevados níveis de IFN- γ têm sido associados com a severidade da doença cardíaca em indivíduos chagásicos crônicos (DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; BARROS-MAZON et al., 2004), provavelmente por uma exacerbação da resposta imune, particularmente nas fibras cardíacas, promovendo a destruição dessas células. Por outro lado, também existe uma correlação positiva entre os níveis da citocina e a cura parasitológica da doença de Chagas, quando o tratamento foi feito na fase aguda da doença, sugerindo que IFN- γ poderia estar agindo sinergicamente com a quimioterapia durante o início da doença, apresentando um papel protetor contra o parasito (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; 2000).

Se células T do tipo 1 são relatadas por estarem envolvidas com a severidade da doença de Chagas, seria esperado que PBMC de pacientes com a FC produzissem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias quando estimuladas pelos antígenos de *T. cruzi* (CRA, FRA e Ag-Epi). No presente estudo, altos níveis de TNF- α e IFN- γ foram detectados em indivíduos chagásicos após estímulo de PBMC com CRA e com Ag-Epi. Porém, ao contrário da literatura relatada, não foi identificada a presença de maiores níveis em pacientes com a FC da doença de Chagas, quando comparados aos indivíduos da FI (Figuras 2 e 3).

É importante salientar que, por se tratar de um estudo com humanos, apesar de categorizado clinicamente, são grupos extremamente heterogêneos. Os pacientes têm idades diferentes e certamente apresentam respostas imunológicas distintas de acordo com seus estágios de infecção (DUTRA et al., 1997). Nesse sentido, Gomes et al. (2003), ao estudarem a produção de IFN- γ , dividiram o grupo de pacientes com alterações cardíacas de acordo com a severidade da doença através de exames clínicos mais sensíveis. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação entre "altos" e "baixos" produtores de IFN- γ e o estado clínico do paciente.

Com relação aos indivíduos portadores da FI da doença, estes têm sido identificados por apresentarem uma resposta do tipo 2, com secreção elevada de

IL-10 (GOMES et al., 2003), sugerindo, assim, uma proteção imunológica para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica.

De fato, citocinas imunorreguladoras (IL-10, IL-4 e TGF- β) são importantes por controlar a infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992). As células T regulatórias têm sido descritas como uma população de células T que regulam as respostas imunes inata e adaptativa e têm a capacidade de controlar as respostas imunes excessivas ou mal direcionadas, incluindo as respostas aos patógenos ou a antígenos próprios (MALOY & POWRIE, 2001; TRZONSKOWSKI et al., 2004). No entanto, podem contribuir com o escape do *T. cruzi* do sistema imunológico do hospedeiro e com o estabelecimento da fase crônica da doença (SILVA et al., 1992).

Monócitos/ macrófagos em PBMC, de indivíduos com a FI da doença, são as principais células produtoras de IL-10 (GOMES et al., 2003) e podem estar envolvidas na regulação da resposta imune na doença de Chagas, que podem modular a expressão e a função de IL-12 e IFN- γ (BRENER & GAZZINELLI, 1997). O processo destrutivo nos pacientes com a FC poderia, por esta razão, resultar de uma falha na regulação da resposta Th1 pela IL-10.

Linfócitos T também estão envolvidos na imunorregulação da doença de Chagas e são estudados para a diferenciar os pacientes assintomáticos daqueles que apresentam as formas severas da doença (MENEZES et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2005). Linfócitos T secretam diferente perfil de citocinas entre as duas formas clínica cardíaca e assintomática da doença, exercendo papel oposto por secretar IL-10 em pacientes com FI e, TNF- α em pacientes com a FC (MENEZES et al., 2004). Segundo os autores, essas células são importantes na imunorregulação da doença chagásica, sugerindo que podem ter participação nos mecanismos imunológicos para o controle ou para o desenvolvimento da patologia.

Além disso, indivíduos com sorologia positiva para a infecção, e sem alterações eletrocardiográficas e residentes em áreas endêmicas apresentaram níveis elevados de IL-4, uma outra citocina secretada por células T do tipo 2 (SAMUDIO et al., 1998), sugerindo que as repetidas exposições ao parasito

poderiam influenciar um perfil diferenciado de citocinas. Os resultados do presente estudo mostraram que não houve produção de IL-4 após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, estando de acordo com recentes estudos (CUNA et al., 2000; ABEL et al., 2001; MICHAILOWSKY et al., 2003; LAUCELLA et al., 2004), onde a seleção de pacientes não ocorreu restritamente a uma área endêmica da doença. Além disso, apesar da detecção de produção de níveis elevados de IL-10 em sobrenadantes de PBMC de indivíduos chagásicos (FC e FI) após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, sobretudo com FRA (Figura 4), não houve diferença significativa desta produção com o grupo de indivíduos NC.

Os resultados do presente estudo mostraram que, através da detecção de citocinas em sobrenadantes de cultura, não foi possível discriminar as formas clínicas da doença de Chagas utilizando os Ags-Recs. É importante salientar que o Ag-Epi foi utilizado para uma comparação com respostas obtidas em estudos anteriores que tinham a mesma proposta de investigação. Nossos dados discordam com os da literatura onde Ag-Epi foi capaz de induzir a produção de IFN- γ por indivíduos FC, e IL-10 por chagásicos com a FI (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000; GOMES et al., 2003). Assim, outros fatores poderiam estar envolvidos e interferindo nesta resposta.

Os achados descritos por Pereira et al. (2002), onde foi evidenciado um perfil distinto de citocinas entre os indivíduos das formas FC e FI utilizando os Ags-Recs CRA e FRA, poderiam ser explicados através de alguns aspectos: o pequeno número de indivíduos estudados por Pereira et al. (2002) poderia não ser representativo. Além disso, as diferenças observadas entre nossos resultados e aqueles apresentados anteriormente podem ser devido à sensibilidade do ELISA de captura, metodologia utilizada no presente estudo, e ao fato que, na avaliação das citocinas intracitoplasmáticas através de citometria de fluxo realizado por esses autores, as citocinas são aprisionadas no interior do citoplasma. Deste modo, a detecção de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo é mais representativa (PRUSSIN & METCALFE, 1995). Os resultados encontrados no presente trabalho poderiam estar relacionados aos baixos níveis das citocinas nas

culturas e/ou ao consumo por receptores celulares, impedindo sua detecção através de ELISA (BAROJA & CEUPPENS, 1987).

Uma outra justificativa para a não identificação de um perfil de secreção de citocinas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs de *T. cruzi* poderia estar relacionado aos diferentes localidades para a realização das pesquisas. O estudo realizado por Pereira et al. (2002) foi realizado com pacientes do Estado de Minas Gerais e o nosso grupo analisou indivíduos provenientes do Estado de Pernambuco (Tabela 1). Estudos em áreas endêmicas distintas, como foi feito por Pereira et al. (2002) e por nosso grupo, poderiam identificar distintas respostas imunológicas já estabelecidas, devido aos diferentes tipos de cepas do parasito.

Uma forte correlação evidenciada entre níveis de anticorpos e a severidade da doença de Chagas foi estudada (TIBAYRENE et al., 1986; PEREZ-FUENTES et al., 2003) em pacientes de um Estado mexicano. Os autores concluíram que isto poderia ocorrer em virtude das respostas imunes naturalmente iniciadas contra clones de *T. cruzi* circulantes da área. Da mesma forma, Samudio et al. (1998) ao estudarem indivíduos chagásicos residentes de áreas endêmicas, com ou sem alterações eletrocardiográficas, sugeriram que a frequência de exposição ao parasito poderia influenciar a progressão clínica da cardiomiopatia chagásica através da expressão diferenciada de citocinas.

Um outro ponto a ser comentado é que, apesar de haver uma classificação clínica para os indivíduos chagásicos estabelecida pela OMS (WHO, 2002), sendo esta adotada pelo presente trabalho, estes critérios podem ser falhos em classificar fidedignamente as formas crônicas da doença. Segundo Dutra et al. (2005), a categorização dos pacientes chagásicos é baseada na presença e severidade dos sintomas e não faz uso de exames refinados, sendo de grande importância para estudos epidemiológicos, e não necessariamente para estudos clínicos e imunológicos. Assim, pequenas alterações clínicas podem não terem sido identificadas pelos exames convencionais utilizados.

Desta forma, os estudos imunológicos que visem o desenvolvimento de marcadores biológicos devem incluir diferentes metodologias, onde a sensibilidade, especificidade e desempenho devam ser levados em consideração. A

possibilidade de avaliação de indivíduos residentes em diferentes áreas endêmicas, onde circulam outras cepas de *T. cruzi*, também é um ponto importante a ser estudado. Porém, preocupação maior seria o estabelecimento da utilização de exames clínicos mais sensíveis para categorizar devidamente as formas clínicas e os níveis de acometimento dos órgãos (coração, esôfago e cólon) dos pacientes chagásicos.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Mineo Nakazawa pela sua excelente assistência técnica, a Carlos Luna, Vanessa e Alessandro pela assistência na análise estatística, e as Dras. Cristina Tavares, Marisa Melo e Sílvia, e ao Dr. Jarabas Malta pela seleção de alguns pacientes chagásicos que foram selecionados neste estudo Este trabalho foi financiado por Biomanguinhos/Fiocruz, (grant Nº 239/05), CNPq e CAPES. Gomes Y. M. é pesquisadora do CNPq, Carvalho C. L., Melo M. F. A. D. e Machado R. C. A. são bolsistas do PIBIC/Fiocruz, Verçosa A. F. A. e Lorena V. M. B. são bolsistas da CAPES do curso de Mestrado em Saúde Pública-CPqAM/Fiocruz.

Referências

ABEL L. C. J.; RIZZO L. V.; IANNI B.; ALBUQUERQUE F.; BACAL F.; CARRARA D.; BOCCHI E. A.; TEIXEIRA H. C.; MADY C.; KALIL J.; CUNHA-NETO E. Chronic Chagas' disease cardiomypathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, Londres, v. 17, p. 99-108, 2001.

ARNHOLDT A. C.; PIUVEZAM M. R.; RUSSO D. M.; LIMA A. P.; PEDROSA R. C.; REED S. G.; SCHARFSTEIN J. Analysis and partial epitope mapping of human t cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p. 3171-3179, 1993.

BACHMAIER K.; NEU N.; PUMMERER C.; DUNCAN G. S.; MAK T. W.; MATSUYAMA T.; PENNINGER J. M. INOS expression and nitrotyrosine for may ion in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. **Circulation**, Dallas, v. 96, p. 585-591, 1997.

BAHIA-OLIVEIRA L. M. G., GOMES J. A. S., ROCHA M. O. C., MOREIRA M. C. V., LEMOS E. M., LUZ Z. M. P., PEREIRA M. E. S., COFFMAN R. L., DIAS J. C. P., CANÇADO J. R., GAZZINELLI G., CORRÊA-OLIVEIRA R. 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. G.; GOMES J. A. S.; CANÇADO J. R.; FERRARI T. C.; LEMOS E. M.; LUZ Z. M. P.; MOREIRA M. C.; GAZZINELLI G.; CORREA-OLIVEIRA R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **The Journal of Infections Diseases**, Chicago, v. 182, n. 2, p.634-638, 2000.

BAROJA M. L.; CEUPPENS J. L. More exact quantification of interleuk-2 production by addition of anti-Tac monoclonal antibody to cultures of stimulated lymphocytes. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.98, n.2, p.267-270, 1987.

BARROS-MAZON S.; GUARIENTO M. E.; SILVA C. A.; COFFMAN R. L.; ABRAHAMSOHN I. A. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 111, n. 1, p. 137-145, 2004.

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

CETRON M. S., BASILIO F. P., MORAES A. P., SOUZA A. Q., PAES J. N., KAHN S. J., WENER M. H., VAN VOORHIS W. C. Humoral and cellular immune response of adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 3, p. 370-382, 1993.

CORRÊA-OLIVEIRA R.; GOMES J. A. S.; LEMOS E. M.; CARDOSO G. M.; REIS D. A.; ADAD S.; CREMA E.; MARTINS-FILHO O. A.; COSTA M. O. R.; GAZZINELLI G.; BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 253-255, 1999.

CUNHA-NETO E.; RIZZO L. V.; ALBUQUERQUE F.; ABEL L.; GUILHERME L.; BOCCHI E.; BACAL F.; CARRARA D.; IANNI B.; MADY C.; KALIL J. 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.

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

DE TITTO E. H., BRAUN M., LAZZARI J. O., SEGURA E. L. Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 9, p. 249-254, 1985.

DE WALL MALEFYT R.; YSSEL H.; VRIES J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cells clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 11, p.4754-4765, 1993.

DUTRA W. O.; MARTINS-FILHO O. A.; CANCADO J. R.; PINTO-DIAS J. C.; BRENER Z.; FREEMAN JUNIOR G. L.; COLLEY D. G.; GAZZINELLI G.; PARRA J. C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **International immunology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 499-506, 1994.

DUTRA W. O.; GOLLOB K. J.; PINTO- DIAS J. C.; GAZZINELLI G.; CORREA-OLIVEIRA R.; COFFMAN R. L. & CARVALHO-PARRA J. F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 45, n.1 , p. 74-80, 1997.

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

GADELHA A.A.M.; VERÇOSA A.F.A.; LORENA V.M.B.; NAKAZAWA M.; CARVALHO A.B.; SOUZA W.V.; FERREIRA A.G.P.; SILVA E.D.; KRIEGER M.A.; GOLDENBERG S.; GOMES Y.M. Chagas' s Disease Diagnosticis: Comparative Analysis of Recombinant ELISA with Convencional ELISA and Hemagglutination Test. **Vox Sanguinis**, Oxford, v.85, p. 165-170, 2003.

GAZZINELLI R. T., LEME V. M. C., CANÇADO R., GAZZINELLI G., SCHARFSTEIN J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens

recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 1437-1444, 1990.

GOLDENBERG S.; KRIEGER M. A.; LAFAILLE J. J.; ALMEIDA E.; OELEMANN W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Butantan**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 71-76, 1991.

GOMES Y. M.; PEREIRA V. R. A.; NAKAZAWA M.; ROSA D. S.; BARROS M. N. D. S.; FERREIRA A. G. P.; SILVA E. D.; OGATTA S. F.; KRIEGER M. A.; GOLDENBERG S. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, 2001.

GOMES J. A. S., BAHIA-OLIVEIRA L. M. G., ROCHA M. O. C., MARTINS-FILHO O. A, GAZZINELLI G., CORRÊA-OLIVEIRA R. 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.

HIGUCHI W.O.; REIS M.M.; AIELLO V.D.; BENVENUTI L.A.; GUTIERREZ P.S.; BELLOTTI G.; PILEGGI F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 56, n.5, p. 485-489, 1997.

KRIGGER M. A.; ALMEIDA E.; OELEMANN W.; LAFAILLE J. J.; PEREIRA J. B.; KRIEGER M. A.; CARVALHO M. R.; GOLDENBERG S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 4, p. 427-434, 1992.

LAFAILLE J. J.; LINSS J.; KRIEGER M. A.; SOUTO-PADRON T.; DE SOUZA W.; GOLDENBERG S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, 1989.

LAUCELLA S. A.; POSTAN M.; MARTIN D.; FRALISH B. H.; ALBAREDA M. C.; ALVAREZ M. G.; LOCOCO B.; BARBIERI G.; VIOTTI R. J.; TARLETON R. L. Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n.5, p.909-918, 2004.

LORCA M.; GONZALEZ A.; VELOSO C.; REYES V.; VERGARA U. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease

patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, 1992.

MALOY K. J.; POWRIE F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n.9, 816-822, 2001.

MENEZES C. A. S.; ROCHA M. O.; SOUZA P. E. A.; CHAVES A. C. L.; GOLLOB K. J.; DUTRA W. O. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 137, n. 1, p. 129-138, 2004.

MICHAJLOWSKY V., LUHRS K., ROCHA M. O. C., FOUTS D., GAZZINELLI R. T., MANNING J. E. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived Paraflagellar Rod Proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 3165-3171, 2003.

MORATO M. J.; BRENER Z.; CANCADO J. R.; NUNES R. M.; CHIARI E.; GAZZINELLI G. Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 35, n. 3, p. 505-511, 1986.

MOSCA W.; PLAJA J.; HUBSCH R.; CELILLOS R. Longitudinal study of immune response in human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.22, n.3, p.438-441, 1985.

PEREIRA V. R. A. Identificação de antígenos insolúveis de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* pelo soro de indivíduos chagásicos. **Tese**, Recife, 1997.

PEREIRA V. R. A.; ESTANISLAU J. A.; GALVÃO DA SILVA A. P.; SILVA E. D.; FERREIRA A. G. P.; KRIEGER M. A.; GOLDENBERG S.; ROCHA M. O. C.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; GOMES Y. M. Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores de evolução de formas clínicas. In: XVIII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e VI Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2002, Uberaba. **Resumos...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002, p. 27.

PEREIRA V. R. A.; LORENA V. M. B.; NAKAZAWA M.; GALVÃO DA SILVA A. P.; MONTARROYOS U.; CORREA-OLIVEIRA R.; GOMES Y. M. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003a.

PEREIRA V. R. A.; LORENA V. M. B.; VERÇOSA A. F. A.; SILVA E. D.; FERREIRA A. G. P.; MONTARROYOS U.; GALVÃO D. A.; SILVA A. P.; GOMES Y. M. Antibody isotype responses in BALB/c mice immunized with the Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 823-825, 2003b.

PEREIRA V.R.A.; LORENA V.M.B.; GALVÃO DA SILVA A.P.; COUTINHO E.M.; MIRANDA P.; SILVA E.D.; FERREIRA A.G.P.; KRIEGER M.A.; GOLDENBERG S.; CORREA-OLIVEIRA R.; GOMES Y.M. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, London, v. 129, n. 5, p. 563-570, 2004.

PEREIRA V.R.A.; LORENA V.M.B.; NAKAZAWA M.; LUNA C.F.; SILVA E.D.; FERREIRA A.G.; KRIEGER M.A.; GOLDENBERG S.; SOARES M.B.P.; COUTINHO E.M.; GOMES Y.M. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Estados Unidos, v. 96, n. 3, p. 154-161, 2005.

PÉREZ-FUENTES R.; GUÉGAN J.; BARNABÉ C.; LÓPEZ-COLOMBO A.; SALGADOROSAS H.; TORRES-RASGADO E.; BRIONES B.; ROMERO-DÍAZ M.; RAMOS-JIMÉNEZ J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN M. C. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/ antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 33, p. 293-299, 2003.

PINGE-FILHO P.; TADOKORO C. E.; ABRAHAMSOHN I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, New York, v. 193, n. 1, p. 90-98, 1999.

PRUSSIN C. & METCALFE D. D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.188, n.1, p.117-128, 1995.

REIS D. D.; JONES E. M.; TOSTES S.; LOPES E. R.; GAZZINELLI G.; COLLEY D. G.; McCURLEY T. L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n.5, p. 637-642, 1993.

REIS M. M. HIGUCHI M. L.; BANVENUTI L. A.; AIELLO V. D.; GUTIERREZ P. S; BELLOTTI G.; PILEGGI F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of

cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical immunology and immunopathology**, New York, v. 83, n. 2, p. 165-172, 1997.

RIBEIRÃO M.; PEREIRA-CHIOCCOLA V. L.; NIA L.; AUGUSTO FRAGATA F. A.; SCHENKMAN S.; RODRIGUES M. M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunology**, Oxford, v.22, n.1, p. 49-55, 2000.

RINCON M.; TUGORES A.; LOPEZ-RIVAS A.; SILVA A.; ALONSO M.; DE LANDAZURI M. O.; LOPEZ-BOTET M. Prostaglandin E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. **European journal of immunology**, Weinheim, v.18, n.11, p. 1791-1796, 1988.

SAMUDIO M.; MONTENEGRO-JAMES S.; CABRAL M.; MARTINEZ J.; ARIAS A. R.; WORONIECKY O.; JAMES M. A. Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. **Acta Tropica**, Basel, v. 69, p. 89-97, 1998.

SCHLEIFER K. W. & MANSFIELD J. M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 10, p. 5492-5503, 1993.

SILVA E.D.; PEREIRA V.R.A.; GOMES J.A.S; LORENA V.M.B.; CANÇADO J.R.; FERREIRA A.G.P.; KRIEGER M.A.; GOLDENBERG S.; CORREA-OLIVEIRA R.; GOMES Y.M. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 132-136, 2002.

SILVA J. S.; MORRISSEY P. J.; GRABSTEIN K. H.; MOHLER K. M.; ANDERSON D.; REED S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 175, n.1, 169-174, 1992.

TIBAYRENE M.; WARD P.; MOYA A.; AYALA F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, n.1 , p. 115-119, 1986.

TRZONSKOWSKI P. SZMIT E.; MYSLIWSKA J.; DOBYSZUK A.; MYSLIWSKA A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK

lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 112, n. 3, p. 258-267, 2004.

VITELLI-AVELAR D. M.; SATHLER-AVELAR R.; DIAS J. C.; PASCOAL V. P.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; LAGE P. S.; ELOI-SANTOS S. M.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; MARTINS-FILHO O. A. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

WHO-World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series, v. 905, p. 109, 2002.

Figuras

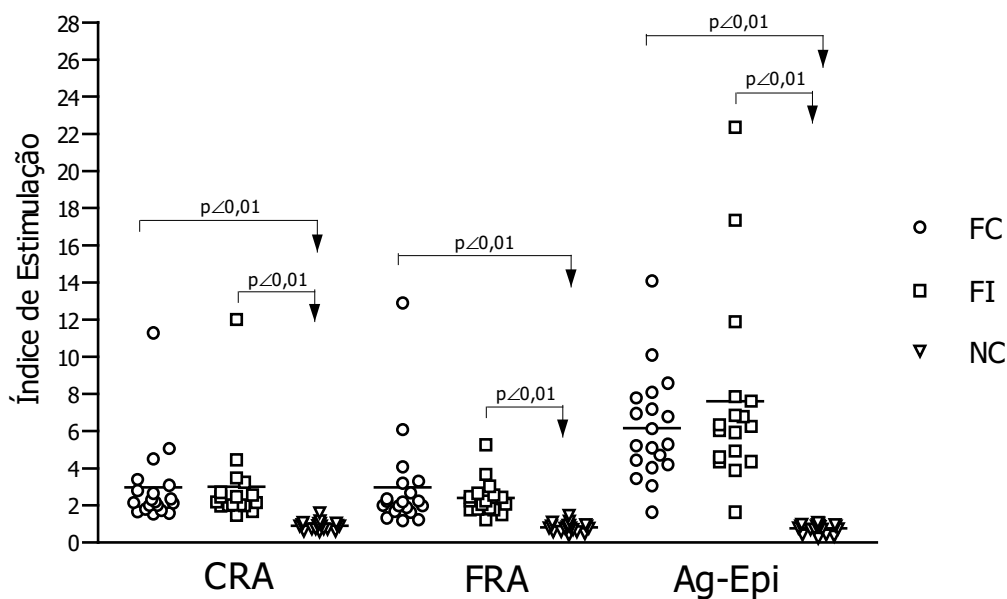


Figura 1: Resposta proliferativa de PBMC de indivíduos chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Indivíduos portadores da forma cardíaca (FC) (n=19) e da forma indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os pontos (○, □, ▽) representam a média das triplicatas em CPM dos estímulos dividida pela média das triplicatas em CPM da cultura sem estímulo de cada indivíduo. As barras horizontais representam a média aritmética. As diferenças estatísticas estão mostradas na figura com o valor de $p \leq 0,05$.

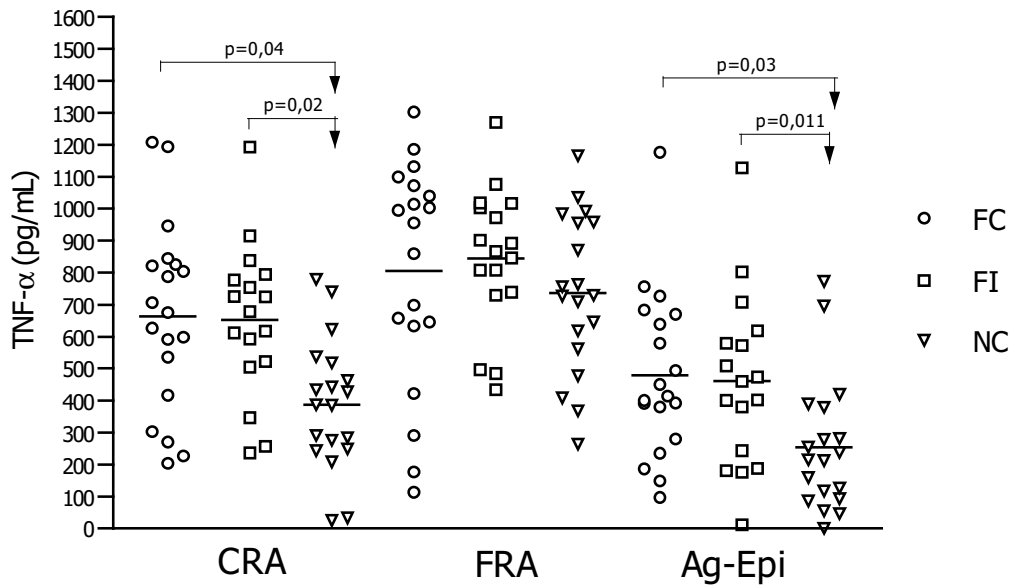


Figura 2: Detecção de TNF- α em sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Indivíduos portadores da forma cardíaca (FC) (n=19) e da forma indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os pontos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de p.

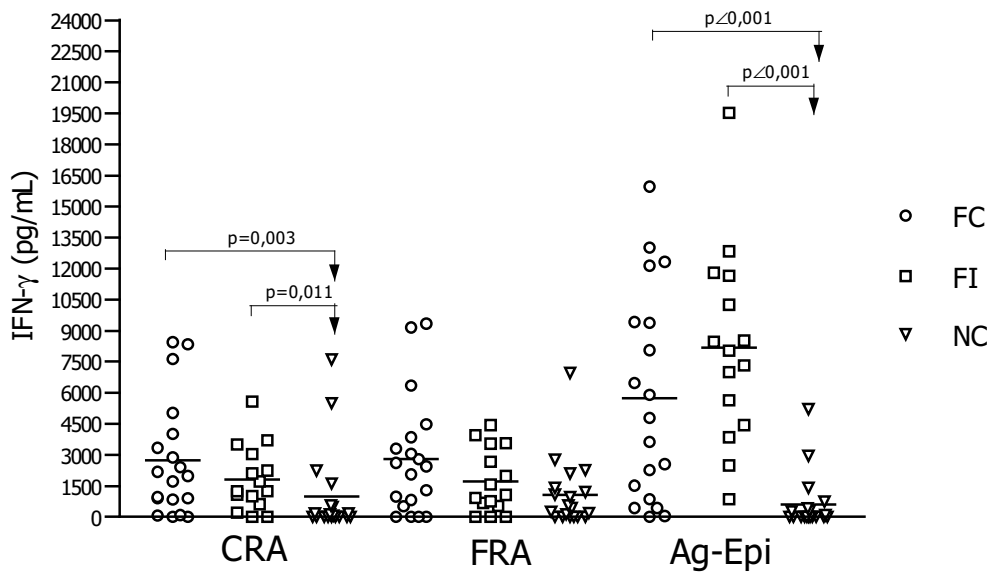


Figura 3: Detecção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Indivíduos portadores da forma cardíaca (FC) (n=19) e da forma indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os pontos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de p.

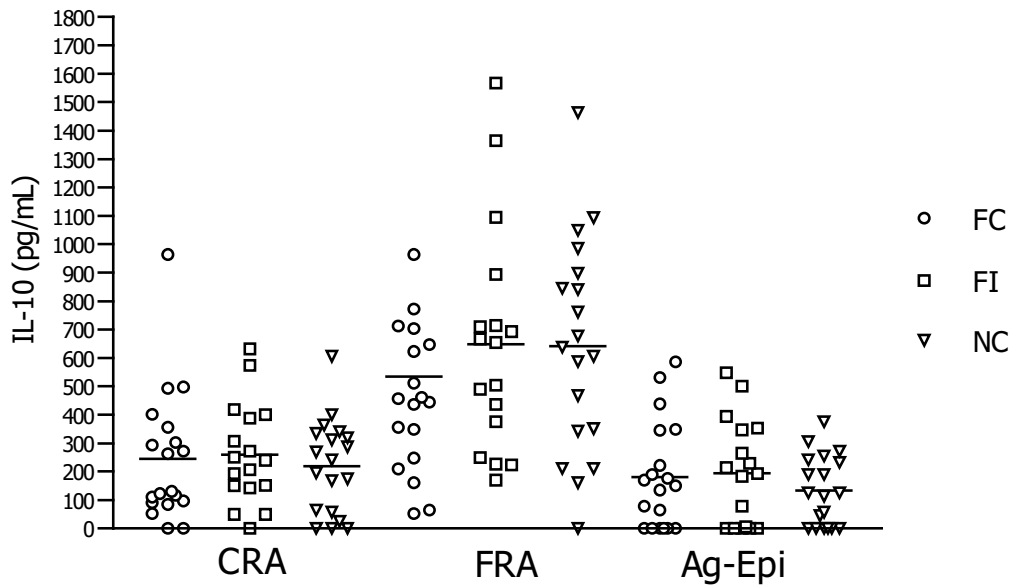


Figura 4: Detecção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos chagásicos e indivíduos não chagásicos após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) e antígeno solúvel de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Ag-Epi). Indivíduos portadores da forma cardíaca (FC) (n=19) e da forma indeterminada (FI) (n=17) e indivíduos não-chagásicos (NC) (n=19). Os pontos (○, □, ▽) representam a média da duplicata. As barras horizontais representam a média aritmética. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de p.