

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

RECIFE

2012

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

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

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Co-orientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S237a Soares, Ana Karine de Araújo.
Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo in vitro com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* / Ana Karine de Araújo Soares. - Recife: [s.n.], 2012.
75 p. ; ilus. tab. graf.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
Orientador: Yara de Miranda Gomes.
1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Monócitos. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Marcadores imunológicos. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Título.

CDU 616.937

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Eduardo Caetano Brandão Ferreira da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

Dra. Vláudia Maria Assis Costa
Universidade Federal de Pernambuco (Dpto. Parasitologia/UFPE)

Dedico este trabalho a DEUS, pois sem ele nada seria.

A minha pequena grande família

Helena e Gilmário, amo vocês.

A memória de meu avô José Antônio que foi
para mim um exemplo de caráter, sabedoria e amor.

AGRADECIMENTOS

A JESUS CRISTO, o autor da minha fé, razão da minha esperança. Só tenho a agradecer por tudo que tenho e por tudo que sou. Maravilhoso és Tu em minha vida.

Ao meu avô José Antônio (*In MEMORIAM*), que me apresentou o mundo como um universo de conhecimentos, deixando como herança a sede de buscar sempre mais.

A minha filha Maria Helena, produto do amor, mágica da ciência e obra do Criador. Razão da minha vida. Te amo incondicionalmente.

A meu marido Gilmário, pelo incentivo e apoio, além das críticas construtivas que sempre me impulsionaram a buscar o melhor de mim. Te amo, meu branco, agradeço a DEUS por tê-lo em minha vida.

A minha mãe Fátima, minha grande incentivadora, o meu agradecimento por sempre acreditar que eu podia mais e, principalmente, por nunca ter desistido de mim, te amo mãe.

A todos os meus familiares, em especial a minha irmã Vitória, pessoas que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins, me dando apoio e compreensão, amo todos vocês.

À Carlinha que não sendo somente “a prima” é a amiga. Depois de ultrapassadas as “guerras” de infância aqui estamos.

A minha orientadora, Dra. Yara Gomes, pela oportunidade e pelo exemplo profissional.

A minha co-orientadora, Dra. Virginia Lorena, pela dedicação, profissionalismo, apoio, compreensão e principalmente, pela co-orientação que foi imprescindível para conclusão deste trabalho. Valeu!

As minhas grandes amigas Camila, Fabiana, Laís, Águida, Kátia, Zita, Janete, Narjara, Sandra, Priscila que sempre estiveram comigo, torcendo por mim na realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

As famílias Bulhões e Roccamora, imprescindíveis nessa jornada. Amizades abençoadas que me trouxeram alegria e descontração ao longo do caminho.

Aos companheiros Mineo, Adriene, Suellen e Amanda, e às grandes amizades que fiz no CPqAM/FIOCRUZ que tanto colaboraram e torceram para a conclusão desta etapa profissional.

A amiga Patrícia, a “pequena”, um agradecimento especial por ter estado comigo pacientemente todos os dias com compreensão, preocupação, dedicação e envolvimento. Obrigada menina, te desejo todo sucesso do mundo.

A Joelma Souza, que com muito profissionalismo e carinho me auxiliou na finalização desse trabalho.

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

A Mácia, bibliotecária do CPqAM/Fiocruz, que com toda dedicação e profissionalismo me auxiliou na minha revisão literária.

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

A equipe da Casa do Portador da doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico De Pernambuco (PROCAPE), pela colaboração na seleção dos pacientes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Facepe) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento e construção deste trabalho, obrigada por tudo!

“Confie no SENHOR de todo o seu coração e não se apóie na sua própria inteligência. Lembre de DEUS em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo.”

(Provérbios 3.5-6)

SOARES, Ana Karine de Araújo. **Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

As interações moleculares entre os monócitos e os linfócitos são de extrema importância para a produção de uma resposta imune eficiente. Nesse contexto nos propomos avaliar a expressão da molécula de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺, e das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ e a produção das citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-12 por monócitos CD14⁺ HLA-DR⁺ de portadores de formas clínicas crônicas da doença de Chagas. O grupo de indivíduos acometidos cronicamente pela infecção chagásica foi composto por 10 portadores da forma cardíaca (FC) sem dilatação cardíaca (FC1), 14 portadores da forma cardíaca com dilatação cardíaca (FC2) e 7 portadores da forma indeterminada (FI). O sangue total destes indivíduos foi submetido à cultura na presença dos antígenos CRA ou FRA, específicos ao *Trypanosoma cruzi*. Observamos que o aumento na expressão da molécula co-estimulatória CD80⁺ associado à diminuição da expressão de CD86⁺ no grupo de indivíduos FC, quando comparamos os contextos *ex vivo* e após estímulo com CRA ou FRA, aponta um possível envolvimento desses antígenos nos mecanismos de fuga do sistema imune do hospedeiro pelo *T. cruzi*. Correlações positivas entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias foram observadas entre os portadores da FI e FC1, indicando um controle do parasitismo, concomitantemente a uma modulação da resposta inflamatória. No grupo de pacientes FC2 observamos uma predominância de uma correlação positiva entre as citocinas inflamatórias, bem como de correlação positiva entre citocinas Th1 e Th2, indicando que há predomínio de um perfil do tipo Th1, mas com indícios de mecanismo de regulação da resposta inflamatória exacerbada. Nossos resultados sugerem que os antígenos CRA e FRA, por estarem presentes no parasito, poderiam atuar no processo de apresentação e ativação celular durante a cronicidade da doença, sobretudo nos indivíduos portadores da FC.

Palavras chave: Doença de Chagas – imunologia, monócitos, proteínas recombinantes, marcadores imunológicos.

SOARES, Ana Karine de Araújo. **Assessing of monocytes between the clinical forms of chronic Chagas' disease before and after in vitro stimulation with CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi***. 2012. Dissertation (Academic Master in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

The molecular interactions between monocytes and lymphocytes are extremely important for the production of an efficient immune response. In this context we propose to evaluate the expression of cell surface molecule HLA-DR⁺ monocytes CD14⁺, and co-stimulatory molecules CD80⁺ and CD86⁺ and cytokines IL-10, IFN- γ , TNF- α and IL-12 production by monocytes CD14+HLA-DR⁺ in patients with clinical forms of chronic Chagas disease (DC). The group of individuals affected by chronic Chagas disease comprised 10 patients with the cardiac form (FC) without cardiac dilation (FC1), 14 patient's presents with dilated heart rate (FC2) and 7 patients with the indeterminate form (FI). Whole bloods of these individuals were submitted to culture in the presence of CRA or FRA antigens, specific to *Trypanosoma cruzi*. We observed that the increased expression of the molecule co-stimulatory CD80⁺ associated with decreased expression of CD86⁺ in the group of individuals FC, when comparing the context ex vivo and after stimulation with CRA or FRA, indicates a possible involvement of these antigens in the mechanism of escape from host immune system by *T. cruzi*. Positive correlations between inflammatory cytokines and anti-inflammatory properties were observed among patients with the FI and FC1, indicating a control of parasitism, a concomitant modulation of the inflammatory response. In patients FC2 observed a predominance of a positive correlation between inflammatory cytokines, as well as positive correlation between Th1 and Th2 cytokines, indicating that there is predominance of Th1-type profile, but with evidence of regulation mechanism of an exaggerated inflammatory response. Our results suggest that the antigens CRA and FRA, being present in the parasite, could act in the process of presentation and cellular activation during chronic disease, especially in individuals with FC.

Keywords: Chagas disease - immunology, monocytes, recombinant proteins, immunological markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Casos confirmados da DC aguda de acordo com o ano de notificação (2000 a 2010) e forma de transmissão.....	21
Figura 2	Mapa do território brasileiro apresentando os casos de DCA por município, no período de 2000 a 2010, Brasil.....	22
Figura 3	Papel da co-estimulação na ativação das células T.....	28
Quadro 1	Características dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo.....	38
Figura 4	Exemplo de gráfico dot plot da aquisição de monócitos no citômetro de fluxo.....	41
Figura 5	Expressão <i>ex vivo</i> da molécula HLA-DR ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ (A) e das moléculas co-estimulatórias CD80 ⁺ (B) e CD86 ⁺ (C) na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI.....	42
Figura 6	Expressão da molécula HLA-DR ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e de indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>) e FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	43
Figura 7	Expressão da molécula co-estimulatória CD80 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>) e FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	44
Figura 8	Expressão da molécula co-estimulatória CD86 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>) e FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	44
Figura 9	Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com o antígeno	

	CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>).....	45
Figura 10	Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	46
Figura 11	Comparação da expressão da molécula de superfície CD80 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>).....	47
Figura 12	Comparação da expressão da molécula de superfície CD80 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI após estímulo com o antígeno FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	48
Figura 13	Comparação da expressão da molécula de superfície CD86 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>).....	49
Figura 14	Comparação da expressão da molécula de superfície CD86 ⁺ na superfície de monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>).....	50
Figura 15	Detecção das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α por monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico dos diferentes grupos estudados após estímulo com o antígeno recombinante CRA (<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>) de <i>T. cruzi</i>	51
Figura 16	Detecção das citocinas IL-10 (A), IFN- γ (B), IL-12 (C) e TNF- α (D) por monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de sangue periférico dos diferentes grupos estudados após estímulo com o antígeno recombinante FRA (<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>) de <i>T. cruzi</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da forma clínica crônica FI.....	53
Tabela 2	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da forma clínica crônica FC1.....	53
Tabela 3	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da forma clínica crônica FC2.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-Recs	Antígenos recombinantes
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupos de diferenciação)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRA	<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i> (Antígeno Repetitivo Citoplasmático)
CRM	Conselho Regional de Medicina
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno de linfócito T citotóxico)
DCA	Doença de Chagas aguda
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FC	Forma cardíaca
FC1	Forma cardíaca leve
FC2	Forma cardíaca grave
FD	Forma digestiva
FI	Forma indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FL	Fluorescência
FRA	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i> (Antígeno Repetitivo Flagelar)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Dispersão frontal)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
Ig	Imunoglobulina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
NI	Grupo de indivíduos não infectado

NK	Células <i>Natural Killer</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>
PHA	Fitohemaglutinina
Procaped	Pronto-socorro cardiológico de Pernambuco
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	<i>Side Scatter</i> (Dispersão lateral)
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UPE	Universidade de Pernambuco
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas	20
1.2	Aspectos clínicos e laboratoriais da doença de Chagas	23
1.3	Aspectos imunológicos da doença de Chagas	24
1.3.1	Os monócitos na doença de Chagas	26
1.4	Antígenos recombinantes do <i>T. cruzi</i> : CRA e FRA	30
2	JUSTIFICATIVA	32
3	HIPÓTESE	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivos específicos	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	Proteínas recombinantes	35
5.2	Tipo do estudo	35
5.3	População do estudo	35
5.3.1	Aspectos éticos	36
5.4	Coleta de sangue	37
5.5	Sorologia para infecção pelo <i>T. cruzi</i>	37
5.6	Padronização das quantidades de anticorpos para o ensaio de citometria	37
5.7	Cultura celular	38
5.8	Caracterização dos marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas	39
5.9	Aquisição e análise na citometria de fluxo	40
5.9.1	Aquisição e análise dos monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	40
5.10	Análise estatística	41
6	RESULTADOS	42

6.1	Expressão <i>ex vivo</i> das moléculas de superfície HLA-DR ⁺ em monócitos CD14 ⁺ , e das moléculas co-estimulatórias CD80 ⁺ e CD86 ⁺ em monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	42
6.2	Expressão da molécula HLA-DR ⁺ em monócitos CD14 ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e indivíduos NI após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	43
6.3	Expressão das moléculas CD80 ⁺ em monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	43
6.4	Expressão da molécula CD86 ⁺ em monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	44
6.5	Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR ⁺ em monócitos CD14 ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI antes e após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	45
6.6	Comparação da expressão da molécula de superfície CD80 ⁺ em monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI antes e após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	46
6.7	Comparação da expressão da molécula de superfície CD86 ⁺ em monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ de portadores das diferentes formas clínicas antes e após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA.....	48
6.8	Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ dos diferentes grupos estudados após estimulação <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i>	51
6.8.1	Produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ dos diferentes grupos estudados após estímulo com CRA.....	51
6.8.2	Produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14 ⁺ HLA-	

DR ⁺ após estímulo com FRA.....	52
6.9 Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas.....	53
6.9.1 Correlações observadas em pacientes portadores da FI.....	53
6.9.2 Correlações observadas em pacientes portadores da FC1.....	53
6.9.3 Correlações observadas em pacientes portadores da FC2.....	54
7 DISCUSSÃO.....	55
8 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente.....	71
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle.....	73
Anexo A.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

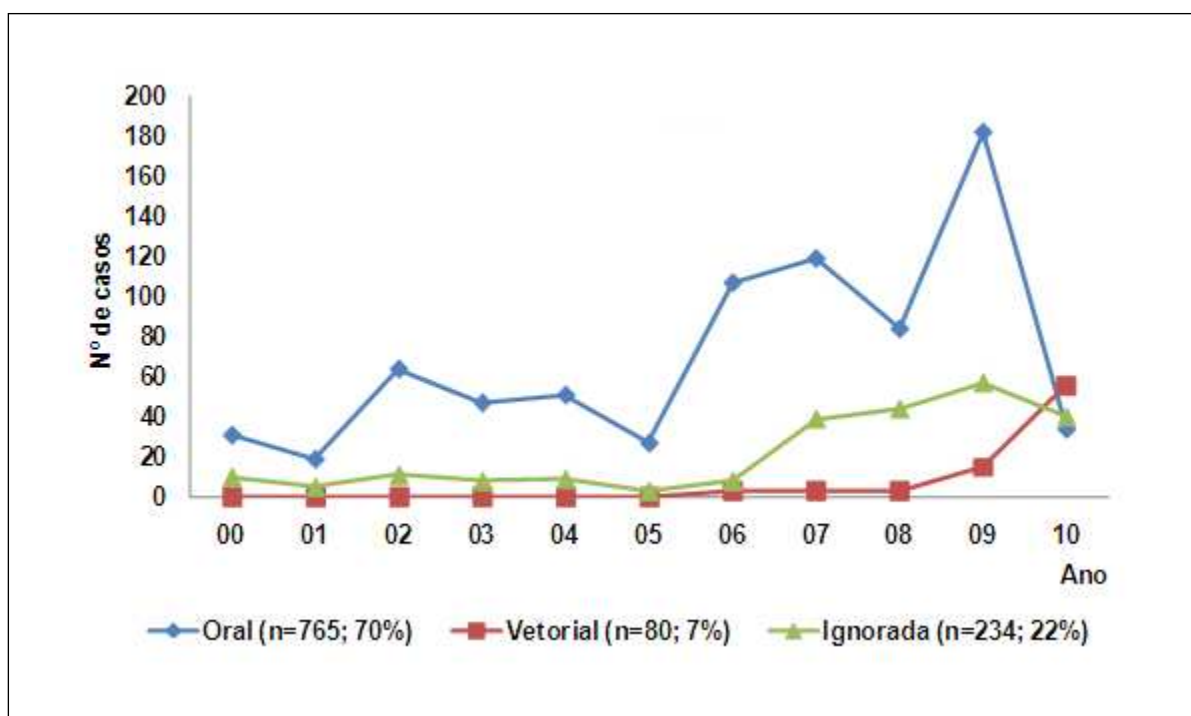
A doença de Chagas (DC) é uma infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, tendo como vetores naturais um grupo de insetos da ordem *Hemiptera*, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, o vetor mais importante da doença. A biologia do *T. cruzi*, assim como seus vetores, seus reservatórios, a clínica da doença, bem como sua epidemiologia e patologia, foram descobertos pelo pesquisador Carlos Chagas (1879-1934) em 1909 no estado de Minas Gerais, Brasil. Sua descoberta foi considerada única na história da medicina, constituindo um marco importante na história da ciência e da saúde brasileiras (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Apesar dos 100 anos de sua descoberta, a DC continua sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, acarretando, assim, um importante problema de saúde pública, com uma estimativa de indivíduos infectados no mundo em torno de 8 milhões de pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; SCHOFIELD et al., 2006; RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos de DC decorrentes de infecções adquiridas no passado, sendo a maioria infectada pela via vetorial, forma de transmissão intimamente relacionada às baixas condições sócio-econômicas da população (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). A estimativa de infectados no país é de aproximadamente três milhões de pessoas (PETHERICK et al., 2010). A média de internações nacional pela doença ficou em 0,99 no período de 1995 a 2008 (BRAZ et al., 2011). No estado de Pernambuco, a média para o mesmo período foi de 0,39, sendo maiores as taxas no interior do estado. Com relação ao número de óbitos, Pernambuco obteve média de 1,56 entre 1980 e 2007, apresentando média inferior à brasileira que foi de 3,66 (BRAZ et al., 2011).

Apesar do predomínio de casos crônicos, nos últimos anos, a ocorrência da DC aguda (Figura 1) tem sido observada nos estados da Amazônia Legal, com

ocorrência de casos isolados em outros estados (BA, CE, PI, SC, SP) (Figura 2), com um número de casos confirmados de aproximadamente 765 casos no período de 2000 a 2010 (Figura 1) (BRASIL, 2010).

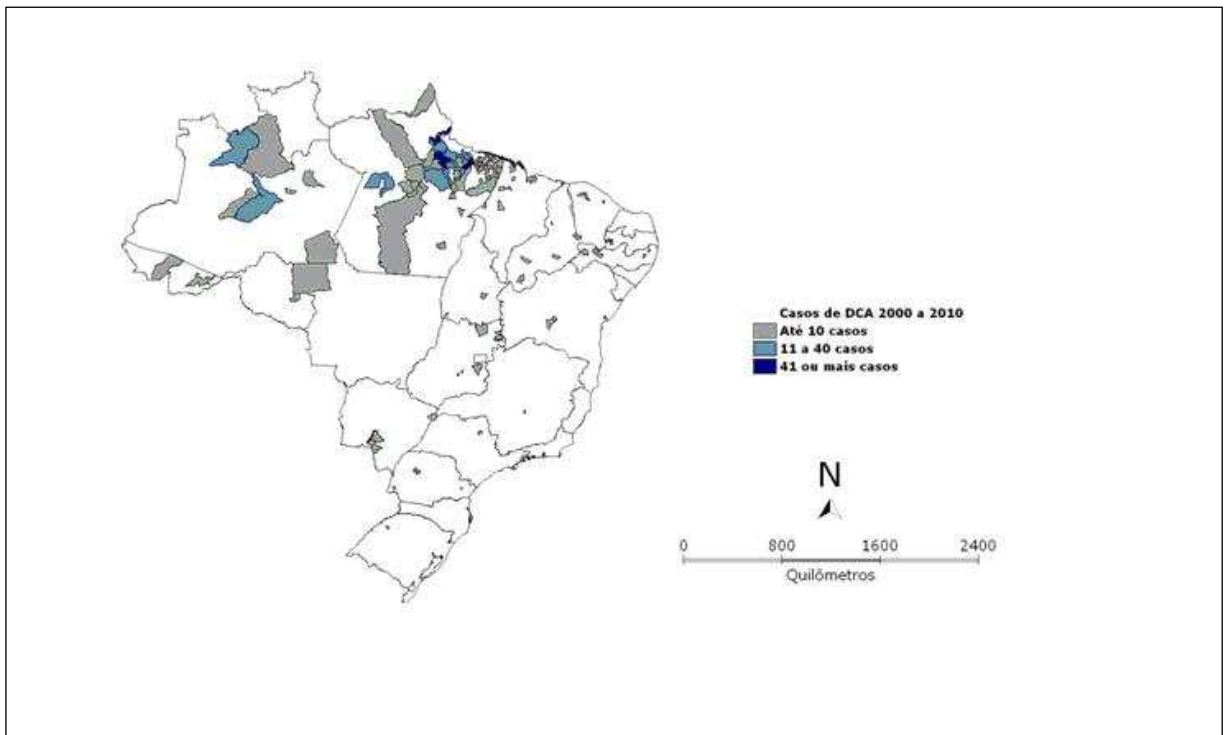
Figura 1 - Casos confirmados da DC aguda de acordo com o ano de notificação (2000 a 2010) e forma de transmissão.



Fonte: Ministério da Saúde. (BRASIL, 2010).

A partir de 1975, ações organizadas de controle por inseticidas foram instituídas com o intuito de conter a transmissão vetorial da doença. Esse controle vetorial demonstrou uma expressiva diminuição da transmissão do *T. cruzi* ao homem. Em 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional de interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans*, concedida pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e OMS (BRASIL, 2010). Entretanto, apesar do expressivo controle vetorial, casos e surtos da doença na Amazônia legal e outros estados por transmissão vetorial e oral (por ingestão de alimentos contaminados) estão ocorrendo (BRASIL, 2010).

Figura 2: Mapa do território brasileiro apresentando os casos de doença de Chagas aguda (DCA) por município, no período de 2000 a 2010, Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde. (BRASIL, 2010).

Legenda: ■ Municípios com até 10 casos de DCA; ■ municípios com número de casos de DCA de 11 a 40; ■ municípios com número de casos de DCA de 41 ou mais casos.

A via oral de transmissão pode vir a se tornar um grande problema de saúde pública, quando os casos não são devidamente notificados para que as precauções necessárias sejam tomadas (LAISON et al., 1979). Os casos de DC aguda são de notificação compulsória e imediata, devendo ocorrer em no máximo 24 horas a partir da suspeita inicial (BRASIL, 2010). No Brasil, surtos recentes têm ocorrido através dessa via de transmissão, sendo quase sempre observada a presença de vetores e/ou reservatórios infectados próximos aos locais de ocorrência (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2008; VALENTE et al., 1999). No período de 2000 a meados de 2010, foram registrados 1093 casos de DC aguda, sendo, 71% (776/1093) por transmissão oral e 6% por transmissão vetorial (70/1093) (BRASIL, 2010).

Além das vias já citadas, outras vias de transmissão da DC também podem ser encontradas, tais como a via transfusional, considerada de grande importância, já que 60% dos indivíduos infectados residem em centros urbanos e, aproximadamente, 50% destes encontra-se na fase clínica crônica indeterminada, constituindo um grupo de potenciais doadores de sangue, aumentando, assim, o

risco da doença transfusional (MORAES-SOUZA, 2006); a via congênita, por aleitamento materno, acidentes laboratoriais e transplantes de órgãos (REICHIE et al., 1996; DIAS, 2000).

1.2 Aspectos clínicos e laboratoriais da doença de Chagas

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais dos portadores desta enfermidade permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dois a quatro meses de infecção, além de alta parasitemia (DIAS, 1989; MAZZA; FREIRE, 1940). Manifestações sistêmicas, como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, podem ser também observadas (REZENDE; RASSI, 1994). Devido à alta mortalidade em crianças e jovens (DIAS, 1987), o tratamento etiológico nessa fase é indicado, qualquer que tenha sido o mecanismo da infecção (BRASIL, 2005). Com relação ao tratamento etiológico da DC, a partir de 1930, testes foram realizados para desenvolver um medicamento adequado para o tratamento da infecção. Entretanto, apenas o nifurtimox e benzonidazol apresentaram resultados relevantes nos países endêmicos (NEGRETTE et al., 2008). Apesar disso, ainda observam-se grandes dificuldades quanto às suas aplicações por não apresentarem total eficácia (CANÇADO, 1985) sendo seus potenciais de cura parasitológica dependente do tipo de cepa presente no hospedeiro (ANDRADE et al., 1985). Em estudos realizados no Brasil e em outros países do continente Sul-Americano (CANÇADO et al., 1969, 1975, 1976, 1985; CERISOLA et al., 1972) sobre a tolerância e a eficácia desses dois antiparasitários em pacientes nas fases aguda e crônica da doença, importantes efeitos colaterais foram observados, sendo o índice de cura parasitológica em torno de 60% nos pacientes que apresentam a fase aguda, mas, pouco expressivo na fase crônica (COURA et al., 1997).

A fase crônica é caracterizada por parasitemia muito baixa, não detectável através de métodos parasitológicos diretos (LUQUETTI, 1987). Esta fase é de grande importância médica, e apresenta-se sob três formas clínicas principais: indeterminada (FI), cardíaca (FC) e digestiva (FD), que comprometem órgãos vitais do organismo. Cerca de 50-60% dos pacientes apresentam a FI da doença, 20-30% desenvolvem a FC e 8-10% apresentam a FD (DIAS, 1989). A FI foi reconhecida, já

em 1916, por Carlos Chagas, e por ele conceituada para designar a infecção na “ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes”. Esta forma clínica caracteriza-se por apresentar eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais (BRASIL, 2005).

A FC é considerada a principal responsável pela elevada morbidade e mortalidade da doença, ocorrendo na maioria dos pacientes sintomáticos da fase crônica (DIAS, 1989). Sua expressão clínica é caracterizada pela presença de sintomas, sinais físicos e alterações de exames laboratoriais simples, eletrocardiograma e a radiografia torácica (DIAS, 1989). Além das formas FC e FI, os indivíduos portadores da infecção chagásica podem ainda apresentar a FD, que pode apresentar como principais manifestações clínicas, dilatações do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) que têm como características, infiltração linfocítica focal e degeneração neuronal com desnervação (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Os sintomas podem variar desde disfagia, dor epigástrica ou retroesternal, além de soluços, intensa salivação; podendo também ocorrer lesões intestinais, e emagrecimento (REZENDE; MOREIRA, 2000). As manifestações clínicas, dilatação do esôfago e/ou do cólon podem ocorrer em separado ou mesmo simultaneamente. A confirmação da FD ocorre através de alterações reveladas na radiografia de esôfago e/ou do colón, na endoscopia, no enema opaco ou na colonoscopia (BRASIL, 2005; RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Acredita-se que as manifestações patológicas nas duas fases da doença sejam conseqüentes de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao homem. Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram que a variabilidade das cepas do *T. cruzi*, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo são aspectos relevantes (ANDRADE et al., 2002). Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o estado nutricional e, especialmente, as características imunológicas (DIAS, 2000).

1.3 Aspectos imunológicos da doença de Chagas

Diversos trabalhos têm relatado a importância da resposta imune do indivíduo frente ao parasito, sugerindo sua contribuição para a evolução da doença (BARROS-MAZON et al., 2004; GOMES et al., 2003), já que sua ativação é

responsável pelo controle do parasita, como também, é responsável pela reação inflamatória localizada em alguns órgãos específicos (TEIXEIRA et al., 2002).

Muitos são os mecanismos envolvidos que levam às formas graves da doença e sua morbidade. Já a ausência de sintomatologia pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune anti-*T. cruzi*. Entretanto, devido à complexidade da resposta imunológica na DC, esse processo pode também contribuir para os danos inflamatórios causados pela doença (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Apesar da ação eficiente do sistema imune, aparentemente, o parasita persiste no organismo do paciente em baixos níveis na fase crônica da doença. Esse fato pode ser comprovado nos casos de pacientes imunodeprimidos ou em estados de imunossupressão, quando se observa um aumento da carga parasitária, caracterizando assim, uma reativação do parasitismo. O parasita persiste no hospedeiro na forma intracelular, já que estudos mostraram que células intensamente parasitadas por *T. cruzi* não são danificadas pelo infiltrado inflamatório durante a infecção (HIGUCHI et al., 1997; VIANNA, 1911).

Devido à complexidade dos mecanismos imunopatológicos da DC e, conseqüentemente, os poucos conhecimentos para prever a evolução para as formas clínicas da doença, as células e os fatores solúveis secretados, como as citocinas, poderiam ser a ligação para o estabelecimento de marcadores biológicos que auxiliassem no prognóstico das formas graves da doença.

Neste contexto, o possível papel dos mecanismos imunes para o desenvolvimento das formas clínicas severas da DC tem sido avaliado. Assim, vários grupos de pesquisa têm buscado um padrão de resposta imune entre os pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas.

Ensaio de proliferação celular, utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram realizados entre os pacientes portadores da DC após estímulo 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 demonstradas, sugerindo que este padrão de reatividade imune poderia estar relacionado a patogenia das lesões tissulares na DC (BARROS-MAZON et al., 2004; DE TITTO et al., 1985). Entretanto, outros estudos não encontraram diferenças nas respostas proliferativas entre os pacientes

portadores da FI e aqueles portadores das formas sintomáticas (GAZZINELLI et al., 1990; LORENA et al., 2008; MICHAILOWSKY et al., 2003; MORATO et al., 1986).

Estudos sobre a investigação de padrões de secreção de citocinas em PBMC de pacientes chagásicos têm sido realizados 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 portadores das formas cardíacas têm maiores níveis de IFN- γ (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

Souza et al. (2004) quando estimularam células aderentes obtidas de PBMC com tripomastigotas vivos, observaram que monócitos de pacientes com a FI estão relacionados com a produção de IL-10, enquanto monócitos de pacientes com a FC expressam TNF- α . 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 sugeriram 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.

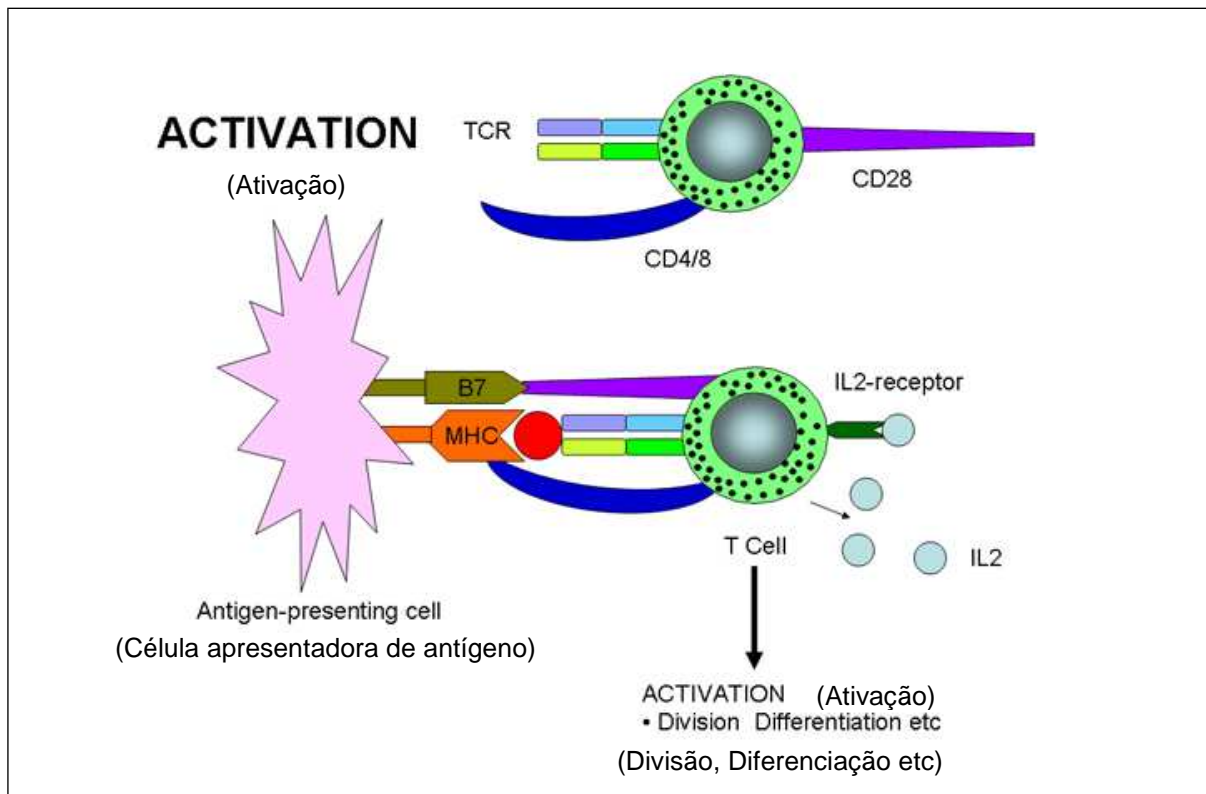
1.3.1 Os monócitos na doença de Chagas

Os monócitos são leucócitos que se desenvolvem na medula óssea, passando a circular na corrente sanguínea por poucos dias e finalmente deslocam-se para os tecidos onde, passam a ser denominados macrófagos. Essas células apresentam como funções o processamento e apresentação de antígenos, sendo por isso chamadas de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs). Quando antígenos proteicos presentes no meio extracelular são fagocitados pelas APCs e confinados em vesículas citoplasmáticas, são transformados em peptídeos que passam a serem exibidos pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II (ABBAS; LICHTAMAN 2005; TURLEY et al., 2000).

O receptor de células T (TCR) consiste em uma cadeia α e outra β , que participam do reconhecimento dos antígenos. Esse receptor, específico para antígeno peptídico, reconhece o peptídeo exibido e ao mesmo tempo, reconhece os resíduos da molécula do MHC localizados ao redor da fenda de ligação do peptídeo. Cada célula restrita ao MHC que atingiu a fase madura expressa a molécula CD4 ou a CD8, que são denominadas co-receptores porque se ligam ao MHC junto com o TCR (ABBAS; LICHTMAN 2005).

As relações entre os monócitos e os linfócitos através das moléculas co-estimulatórias e das citocinas, são de extrema importância para a produção de uma resposta imune eficiente (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SOUZA et al., 2007). As moléculas de superfície HLA-DR, são antígenos glicoprotéicos MHC classe II, constitutivas das APCs. Essas moléculas estimulam as respostas imunes adaptativas através da apresentação de peptídeos a linfócitos TCD4⁺ (LA FLAMME et al., 1997). Já as moléculas co-estimulatórias (CD80⁺, CD86⁺) são importantes para promover a ativação e a diferenciação dos linfócitos T (FREEMAN, et al., 1993a, FREEMAN, et al., 1993b). Essas moléculas co-estimulatórias, também conhecidas como B7-1 e B7-2, CD80⁺ e CD86⁺, respectivamente, são reconhecidas por um receptor chamado de CD28⁺, que é expresso em praticamente todas as células T (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os sinais resultantes da ligação do CD28⁺ presente na superfície dos linfócitos T com as co-estimulatórias localizadas na superfície das APCs atuam em conjunto com os sinais gerados pela ligação do TCR e do co-receptor aos complexos peptídeo-MHC encontrados na superfície das mesmas APCs. A sinalização mediada pelo CD28 é essencial sendo uma das mais importantes formas de co-estimulação (WANG; CHENG, 2004). Esta interação promove a proliferação de linfócitos além de também promover a produção de citocinas (Figura 3) (LINSLEY; LEDBETTER, 1993).

Figura 3: Papel da co-estimulação na ativação das células T.



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

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

Molica (2007), estudou o fenótipo de células mononucleares totais e células não aderentes, demonstrando que células CD14⁺ expressam moléculas HLA-DR⁺, CD80⁺ e CD86⁺ com intensidade semelhante nas culturas estimuladas ou não com *T. cruzi*. Entretanto, apesar de não haver diferença estatística foi possível observar no grupo dos pacientes portadores da FI uma expressão menor de moléculas HLA-DR⁺ e CD80⁺ sugerindo que a ativação dos linfócitos T por essas células poderia estar mais controlada.

Para a correta estimulação das células T, é necessária uma interação entre o receptor de células T com a molécula de MHC, além da adequada co-estimulação realizada pelas moléculas co-estimulatórias por parte das APCs (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SOUZA et al., 2004). Como mecanismo de fuga de alguns microorganismos, observa-se a diminuição da resposta modulatória das APCs e também da expressão de moléculas de co-estimulação (SOUZA et al., 2004). Alguns parasitas podem estimular a produção de citocinas que induzem a uma

diminuição da expressão de moléculas importantes, como as moléculas de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias (RUSSO et al., 1993).

Souza et al. (2007) demonstraram a capacidade imunomoduladora do *T. cruzi* através da sua capacidade de induzir a expressão diferencial de moléculas co-estimulatórias e citocinas por monócitos e células T entre os grupos de portadores de diferentes formas clínicas crônicas da DC. Os resultados mostraram que a frequência da expressão de CD80⁺ por monócitos CD14⁺ foi significativamente aumentada após a infecção pelo *T. cruzi* em todos os grupos estudados (FC e FI). Observou-se também uma maior frequência da expressão de CD80⁺ por monócitos CD14⁺ dos grupos de indivíduos portadores da FI e FC quando relacionados ao grupo de indivíduos não infectados (NI). Com relação à molécula CD86⁺, observou-se uma diminuição da mesma, apenas no grupo de indivíduos portadores da FC. Segundo Souza et al. (2007), esses dados demonstram que o *T. cruzi* apresenta a capacidade de alterar a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas, sugerindo mecanismos moleculares para a evolução clínica diferencial da DC humana.

No estudo de Souza et al. (2004), foi descrito que monócitos de pacientes portadores da FI apresentaram baixos níveis de HLA-DR⁺ em comparação aos indivíduos NI, tanto *ex vivo* e quanto após infecção *in vitro* com *T. cruzi*. Além disso, a expressão de CD11b, molécula presente na superfície de monócitos envolvida na ativação dos linfócitos T, *ex vivo* foi semelhante entre os grupos estudados. Porém, na infecção *in vitro* ocorreu uma diminuição da expressão dessa molécula por monócitos de pacientes com a DC, o que não foi observado com o grupo de indivíduos NI. Os resultados deste estudo sugerem que os monócitos CD14⁺ de indivíduos do grupo de portadores da FI da doença apresentam características modulatórias relacionadas com uma baixa expressão da molécula HLA-DR⁺ e alta expressão da citocina IL-10. Já os monócitos CD14⁺ de indivíduos portadores da FC apresentam características voltadas para uma indução da resposta inflamatória relacionada com altos níveis de expressão de TNF- α .

A interação entre o *T. cruzi* e os monócitos é certamente um evento importante na imunorregulação da doença de Chagas humana (GOMES, et al., 2003; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Portanto, a busca por um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunorregulação da DC através da caracterização do perfil fenotípico dos monócitos bem como a avaliação

da produção de citocinas do tipo Th1 e Th2, após estímulo antígeno específico, é de grande importância para auxiliar na compreensão da resposta imunológica na DC.

1.4 Antígenos recombinantes do *T. cruzi*: CRA e FRA

A maioria dos trabalhos sobre a investigação da resposta imunológica de pacientes portadores da DC tem utilizado preparações antigênicas solúveis do parasito. Com isso, não permitem a detecção de uma resposta imune específica, já que apresentam uma mistura complexa de antígenos. Portanto, a utilização de materiais definidos do parasita, torna-se um requisito não apenas para o desenvolvimento de testes sorológicos e triagem 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 DC (LORCA et al., 1992).

Os antígenos 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* (KRIEGER et al., 1992; LAFAILLE et al., 1989), vem sendo empregados por nosso grupo de estudos de desenvolvimento de marcadores imunológicos visando o prognóstico das formas clínicas crônicas da DC.

Verçosa et al. (2007), demonstraram níveis elevados de IgG2 anti-FRA no soro de pacientes portadores da FC, quando comparado aos pacientes portadores da FI e FD. Vasconcelos et al. (2010), demonstraram aumento dos níveis séricos de IgA anti-CRA e anti-FRA em indivíduos portadores da FD quando comparado aos níveis observados nos indivíduos portadores das FC e FI. Lorena et al. (2008), realizaram detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC estimuladas com CRA e FRA, observando que o CRA foi capaz de induzir a secreção de TNF- α e IFN- γ por indivíduos portadores da DC quando comparados aos indivíduos não portadores, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre as formas clínicas da DC. No entanto, em estudo recente, níveis elevados de linfócitos T CD8+ específicos ao CRA produtoras de IFN- γ e TNF- α foram verificados em portadores da FC que apresentavam megacárdio, quando comparado aos portadores da FC sem dilatação da área cardíaca e aos portadores da FI. Esses resultados indicam a participação de uma resposta citotóxica exacerbada no grupo de pacientes da FC

grave (FC2) indicando que a lesão das fibras cardíacas possa estar relacionada a essa forte resposta inflamatória (LORENA et al., 2010). Melo (2011), avaliou através da detecção do RNA mensageiro, por PCR em tempo real, a expressão gênica para as citocinas IFN- γ e IL-10, pelas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com os Ag-Recs CRA e FRA. Nesse estudo, não foram observadas diferenças significativas na produção destas citocinas entre as formas clínicas estudadas. No estudo de Braz (2011), os dados encontrados sugerem que os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ específicos ao CRA e FRA podem estar envolvidos na prevenção da evolução clínica dos portadores crônicos desta doença, já que estavam presentes em maiores níveis no sangue dos indivíduos portadores da FI após o cultivo na presença dos antígenos.

Com isso, resultados relacionados ao papel do sistema imunológico na DC utilizando Ag-Recs, demonstram ser de grande importância para o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença por permitirem determinar a relação entre padrões celulares e as diferentes formas clínicas apresentadas pelos pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

Embora os mecanismos imunopatológicos da DC não estejam bem claros e, conseqüentemente, pouco foi estabelecido sobre a evolução dos indivíduos portadores das formas cardíacas (FC1 e FC2) da doença, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a resposta imune celular, visando à identificação de marcadores biológicos que pudessem auxiliar no prognóstico da DC.

Sendo assim, considerando a importância da resposta imune evidenciada pela produção de anticorpos específicos contra CRA ou FRA, por indivíduos portadores da DC e o potencial valor prognóstico dos Ags-Recs demonstrado por nosso grupo de pesquisa (VERÇOSA et al., 2007; LORENA et al., 2008, 2010), além de também consideramos a importância dos achados de Lorena et al., (2010), que avaliaram a produção de citocinas pelos monócitos CD14⁺ obtidos de cultura de sangue periférico estimulada *in vitro* com CRA e FRA e que demonstraram que essas células são as principais produtoras das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em todos os grupos de pacientes chagásicos, nos propomos avaliar a produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 por células CD14⁺, entretanto, células CD14⁺HLA-DR⁺. Além disso, avaliamos também, a presença das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ na superfície dessas células em indivíduos portadores da DC frente à CRA e FRA, relacionando assim, com a gravidade das formas clínicas cardíacas crônicas da doença.

Um estudo longitudinal com seguimento dos grupos de indivíduos das formas cardíacas se faria necessário se estes perfis diferenciados fossem devidamente confirmados. Desta forma, mecanismos capazes de bloquear ou amenizar o desenvolvimento das formas graves da doença, como por exemplo, estratégias de tratamento durante a fase crônica, poderiam melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Estratégias terapêuticas visando a regulação da resposta imune celular e da modulação de componentes inflamatórios, associado à droga antiparasitária, possuem favoráveis expectativas para terapia dos indivíduos portadores da doença.

3 HIPÓTESE

Existe uma diferenciação no perfil de expressão das moléculas co-estimulatórias de superfície CD80⁺ e CD86⁺ e na produção de citocinas pelos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de indivíduos portadores de formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os monócitos CD14⁺ de indivíduos portadores de formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão de moléculas CD80⁺ e CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ no sangue periférico de indivíduos portadores de formas clínicas crônicas da DC, antes e após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA;
- b) Avaliar a produção das citocinas IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ pelos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA entre os indivíduos portadores de formas clínicas crônicas da DC;
- c) Correlacionar o perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias ente as formas clínicas crônicas estudadas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Proteínas recombinantes

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 onde foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (LAEMMILI, 1970) e corados pelo corante Comassie Blue. Além disso, contaminação por proteínas e carboidratos bacterianos também foram analisadas através da coloração pela prata (MORRISSEY, 1981) e pelo ácido periódico de Schiff (JANN et al., 1975), respectivamente. Todos os lotes utilizados dos Ags-Recs CRA e FRA foram analisados, apresentando-se bem conservados e não contaminados por proteínas e carboidratos derivados da *Escherichia coli*, vetor onde os Ags-Recs foram produzidos.

5.2 Tipo do estudo

O estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não-randomizado. A população de estudo foi escolhida através de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

5.3 População do estudo

A população de estudo foi composta por 31 pacientes portadores de formas clínicas crônicas da DC selecionados na Casa do Portador da doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico De Pernambuco (PROCAPE), Recife-PE. Os indivíduos portadores da DC foram selecionados para inclusão no estudo através de 5 critérios:

- 1) Sorologia positiva para a infecção chagásica (dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes);
- 2) Exames clínicos para a devida caracterização das formas clínicas;
- 3) Não ter sido submetido ao tratamento etiológico;

- 4) Não apresentar queixas digestivas tais como disfagia e constipação;
- 5) Não ter apresentado alteração leucocitária no hemograma.

Todos os pacientes foram atendidos e examinados por médicos que fazem parte do ambulatório, Dra. Glória Cavalcanti Melo (CRM 7942), Dra. Mariza Melo (CRM 7760) e Dra. Cristina Tavares (CRM 6061), médicas colaboradoras deste estudo. Para a adequada caracterização das formas clínicas foram realizadas análises clínicas e laboratoriais: exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi*, eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago e enema opaco (quando necessários).

Dos indivíduos selecionados, 7 são portadores da FI, 10 da FC1 e 14 indivíduos portadores da FC2. Os pacientes portadores da FC foram selecionados por apresentarem alterações eletrocardiográficas, ecocardiográficas e/ou alterações no raio-X de tórax. Esses indivíduos apresentavam sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*, mas, não apresentavam dilatação do esôfago e do cólon (megas), bem como não apresentavam queixas digestivas. Para caracterizarmos como FC1, o paciente não apresentava dilatação da área cardíaca, além de apresentar fração de ejeção >55% no ecocardiograma. Na avaliação clínica da FC2, o paciente apresentava dilatação da área cardíaca, com fração de ejeção no ecocardiograma <30% e/ou aumento da área ventricular esquerda.

Caracterizamos os pacientes da FI quando não apresentaram quaisquer alterações cardíacas e digestivas, mas com sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*.

Como grupo controle, 7 indivíduos voluntários, não infectados (NI) pelo *T. cruzi*, foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- 1) Não ter habitado em área endêmica para a DC;
- 2) Nunca ter recebido transfusão de sangue;
- 3) Ter apresentado teste sorológico não reagente para a DC;
- 4) Não apresentar alteração leucocitária no hemograma.

5.3.1 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

(Apêndice A e B). Além disso, um formulário de pesquisa foi aplicado para os indivíduos portadores da DC e para os indivíduos NI.

5.4 Coleta de sangue

Dez mililitros de sangue foram coletados por punção venosa em tubos contendo heparina sódica para utilização nos ensaios de cultura celular. Para confirmação da sorologia para a infecção pelo *T. cruzi*, foram coletados 5 mL de sangue em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro e posterior análise. As alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20°C. Além disso, foram coletados 5 mL de sangue em tubos contendo EDTA para a realização do hemograma no Laboratório do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/UPE (HUOC/UPE), com o objetivo de avaliar a contagem de leucócitos.

5.5 Sorologia para infecção pelo *T. cruzi*

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes para a confirmação da infecção chagásica: o primeiro é constituído de uma mistura de extratos totais do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III) proveniente de Bioschile Ingenieria Genetica S.ATM e o segundo utiliza Ag-Recs adsorvidos à placa (Imuno-ELISA Chagas) proveniente de Wama DiagnósticaTM. Foram considerados reagentes os resultados reativos nos dois testes utilizados e não-reagentes os resultados que apresentaram não-reatividade nos dois testes. Todos os pacientes provenientes do HUOC/UPE apresentaram sorologias reagentes, sendo confirmada também, a sorologia não-reagente dos indivíduos NI.

5.6 Padronização das quantidades de anticorpos para o ensaio de citometria

Foram coletados 10mL de sangue por punção venosa, em tubos contendo heparina de dois indivíduos controles para posterior realização da cultura. O sangue foi adicionado em tubos de cultura e estimulando apenas com Fitohemaglutinina (PHA) (10µg/mL) durante 24h. A quantidade dos anticorpos anti-CD14, anti-HLA-DR, anti-CD80 (B7/BB1) e anti-CD86(B7-2/B70) foi escolhida a partir de duas

quantidades utilizadas (2,5 e 5 μ L) seguindo a orientação do fabricante. Para a titulação de anticorpos anti-citocinas foram realizadas duas diluições (1:30 e 1:50). Com relação a IL-12 utilizamos três quantidades (5, 10 e 20 μ L) baseadas nas orientações do fabricante. A escolha das concentrações de anticorpos foi determinada levando em consideração o desempenho da marcação e a diminuição dos custos. As características dos anticorpos utilizados neste estudo estão demonstradas no Quadro 1.

Quadro 1: Características dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD14	TüK4	Mouse IgG2a	FITC
HLA-DR	Tü36	Mouse IgG2b	PerCP
CD80	MEM-233	Mouse IgG1	PE
CD86	BU63	Mouse IgG1	APC
IL-10	JES3-19F1	Rat IgG2a	PE
IL-12	C11.5	Mouse IgG1	PE
IFN- γ	B27	Mouse IgG1	APC
TNF- α	Mab11	Mouse IgG1	APC

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: CD: *Cluster of differentiation*; HLA-DR: Antígeno leucocitário humano; APC: Alococianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Peridinin chlorophyll protein complex.

5.7 Cultura celular

Para cada amostra de sangue periférico foram realizadas culturas celulares em tubos de polipropileno de 14mL (BD Systems™) contendo o meio de cultura RPMI 1640 com glutamina (2mM) suplementado (Com solução de Penicilina/ Estreptomicina a 1% (Sigma™) e soro bovino fetal a 10% (Sigma™), tendo volume final de 2mL (1mL de meio + 1mL de sangue). As amostras foram estimuladas separadamente com Fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO™/ Invitrogen Corporation) (5 μ g/mL) como controle positivo, CRA e FRA (2 μ g/mL), além de uma cultura sem estímulo (SE). Os tubos foram incubados em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C por 24h.

5.8 Caracterização dos marcadores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas

Quatro horas antes do término do cultivo foram adicionadas em cada cultura 20µL de Brefeldina A (Sigma™) (10µg/mL). Sua utilização promove a retenção da citocina no interior celular, uma vez que interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do Complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991). Ao final do período de incubação *in vitro*, foram adicionados 220µL de EDTA 20mM (Sigma™) às culturas por 10 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, adicionamos cerca de 8 ml de PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% -Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™) para então, centrifugá-los a 400 x g por um tempo de 10 minutos à TA. Com o auxílio de uma bomba a vácuo, o sobrenadante foi retirado e descartado, até o volume final de 1ml. Foram então retirados 100µl da suspensão celular e depositados em tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados, contendo os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD14 (5µl), anti-HLA-DR (2,5µl), anti-CD80 (2,5µl) e anti-CD86 (2,5µl) previamente titulados, por 30" a TA. Após a incubação, os eritrócitos foram lisados através da adição da solução de lise (2ml) (2,85% de citrato de sódio – VETEC Química fina, 30% de dietilenoglicol – VETEC Química fina, 54% de formaldeído 37% - VETEC Química fina, 0,04% de heparina 100.000 USP - Hepamax-S®, Blausiegel®) diluída 1:10 em água destilada, no vórtex e incubados por 5 minutos ao abrigo da luz. Para bloqueio da reação, adicionamos 1mL de PBS-Wash seguida de centrifugação (300 x g por 5 minutos à TA). Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados através da adição de 2mL de PBS-Wash. A permeabilização foi realizada através da adição de 2mL da solução de PBS-P (PBS-Wash contendo saponina a 0,2% - Sigma™) por um tempo de 5 minutos ao abrigo da luz e a TA. Após a incubação, uma centrifugação (300 x g por 5 minutos a TA) foi realizada e o sobrenadante descartado. Foram depositados aos tubos 20µL dos anticorpos anti-IL10, anti-IFN γ , anti-TNF α diluídos de 1:30 e anti-IL12, adicionada sem diluição, por um período de incubação de 30 minutos à TA ao abrigo da luz. Após a marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas por duas vezes com 1mL de PBS-P e 1mL de PBS-Wash, respectivamente, sendo fixadas com 200µL de BD Cytofix™ (BD

Biosciences®). Os tubos foram estocados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

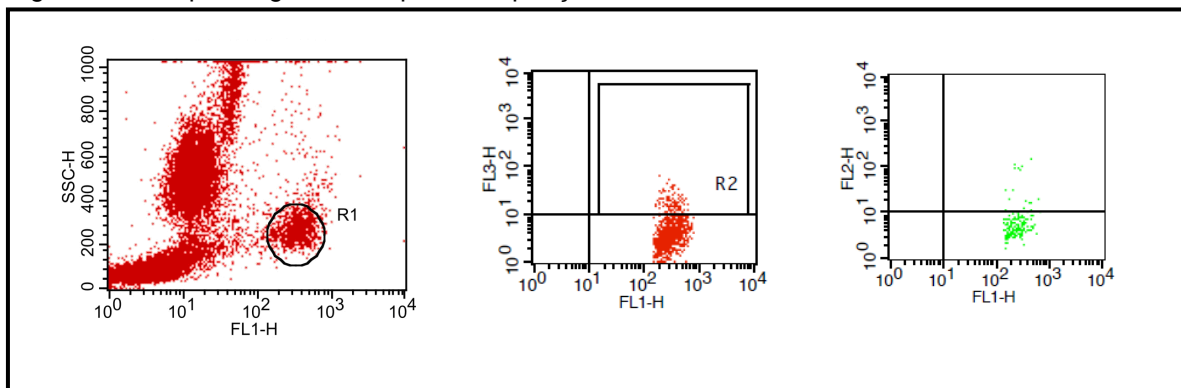
5.9 Aquisição e análise na citometria de fluxo

A aquisição e análise das amostras foram realizadas na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/CPqAM/Fiocruz. O NPT dispõe do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems™), onde podemos avaliar parâmetros como tamanho (FSC) e granulosidade das células (SSC), além de analisar também, as fluorescência emitidas. Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a sua emissão de fluorescência que ocorre através de sua conjugação aos diferentes fluorocromos que emitem diferentes comprimentos de onda. A análise dos dados adquiridos foi realizada através do *software* CellQuestPro®.

5.9.1 Aquisição e análise dos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺

A população de monócitos foi selecionada através de *dot plot* SSC versus FL1, sendo adquiridos 1.000 eventos dentro da janela R1. Após a seleção da janela de interesse (R1), os monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, bem como as outras marcações de superfície anti-CD86 e anti-CD80 e as citocinas foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para realizar a análise da expressão das citocinas e das moléculas de superfície pelos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ foi selecionada a janela de interesse (R2) no gráfico FL1 versus FL3, obtendo gráficos bidimensionais representativos das células triplamente marcadas (Figura 4).

Figura 4: Exemplo de gráfico dot plot da aquisição de monócitos no citômetro de fluxo.



Fonte: Becton Dickson Immunocytometry Systems TM, (2011).

Legenda: (A) SSC versus FL1, demonstrando a marcação para monócitos; (B) FL1 versus FL3, demonstrando a marcação de CD14⁺ versus HLA-DR⁺, sendo a partir desse gráfico, selecionadas as células duplo marcadas (R2), para posterior análise com as citocinas e moléculas co-estimulatórias; (C) FL1 versus FL2, exemplificando a tripla marcação entre CD14⁺ HLA-DR⁺ versus IL-10 (FL2).

5.10 Análise estatística

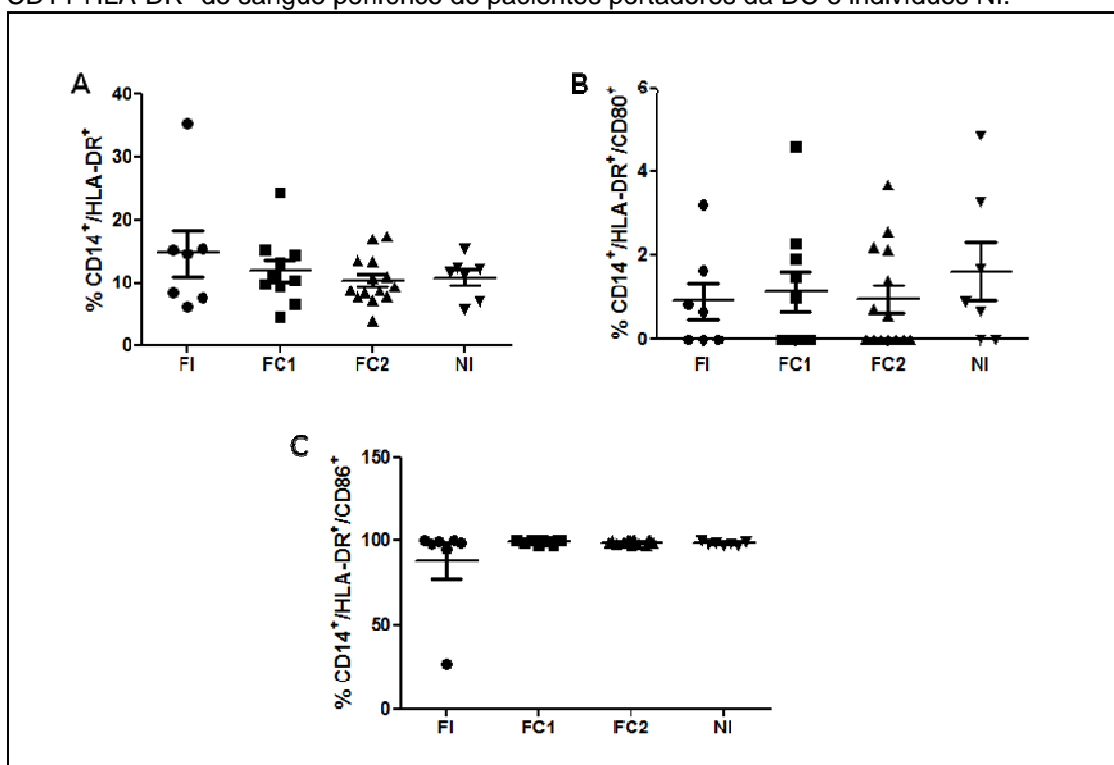
A análise estatística dos dados de perfil celular e de produção de citocinas foi realizada através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Para confirmação do pressuposto de homogeneidade utilizamos o teste de Bartlett. Desta forma, para amostras homogêneas com curva de distribuição normal, a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey foram realizados para comparação das médias de expressão de moléculas de superfície e de produção de citocinas entre os grupos. Quando diante da heterogeneidade das amostras, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns, foram realizados. Para comparar os valores de expressões das moléculas de superfície nos contextos *ex vivo* e *in vitro*, teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado. A avaliação das correlações entre as produções de citocinas foi realizada através do teste de correlação de Pearson. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão *ex vivo* das moléculas de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺, e das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺

Ao avaliarmos a expressão *ex vivo* da molécula de MHC de classe II, HLA-DR⁺, na superfície de monócitos CD14⁺, não detectamos diferenças estatisticamente significantes entre os portadores das diferentes formas clínicas estudadas e dos indivíduos NI. Com relação à expressão das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ na superfície de monócitos ativados, CD14⁺HLA-DR⁺, também não observamos diferenças estatísticas significantes (Figura 5).

Figura 5: Expressão *ex vivo* da molécula HLA-DR⁺ na superfície de monócitos CD14⁺ (A) e das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ (B) e CD86⁺ (C) na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI.

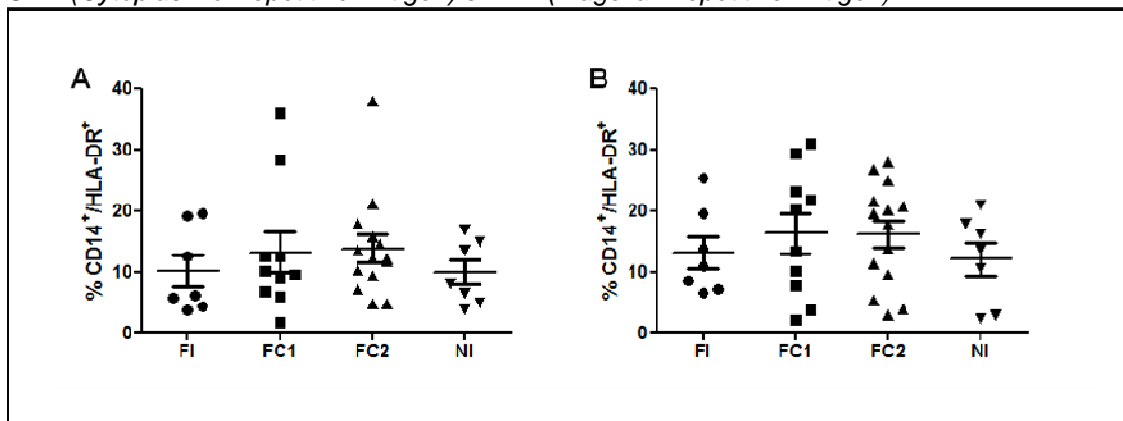


Legenda: Pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (FI) (N=7), forma cardíaca sem dilatação (FC1) (N=10), forma cardíaca com dilatação (FC2) (N=14) e indivíduos não infectados (NI) (N=7). As barras horizontais representam as médias aritméticas.

6.2 Expressão da molécula HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e indivíduos NI após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Com relação à expressão da molécula HLA-DR⁺, na superfície de monócitos CD14⁺, após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA, não detectamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (Figura 6).

Figura 6: Expressão da molécula HLA-DR⁺ na superfície de monócitos CD14⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e de indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).

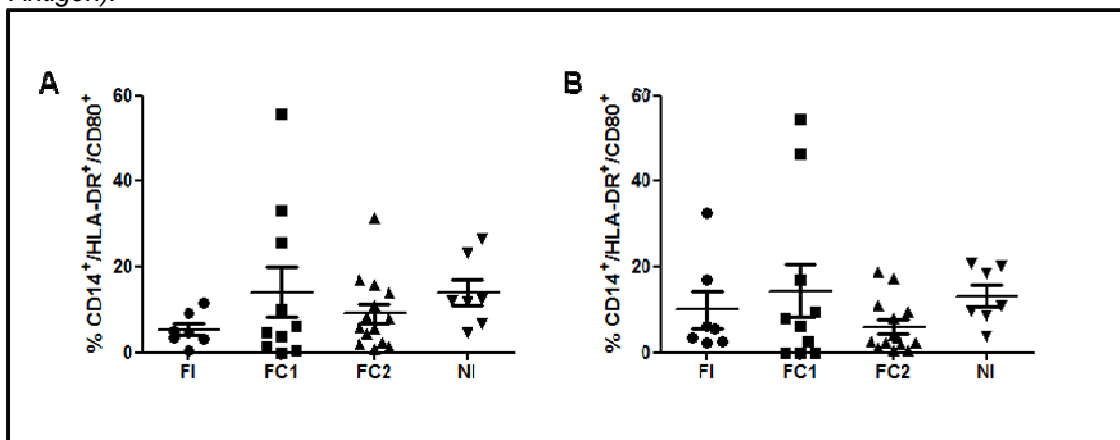


Legenda: Grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) CRA (A), grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) FRA (B). As barras horizontais representam as médias aritméticas.

6.3 Expressão das moléculas CD80⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Ao avaliarmos a expressão da molécula de superfície CD80⁺, após estímulo com ambos os Ags-Recs, não detectamos diferenças estatísticas significantes entre as populações estudadas (Figura 7).

Figura 7: Expressão da molécula co-estimulatória CD80⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).

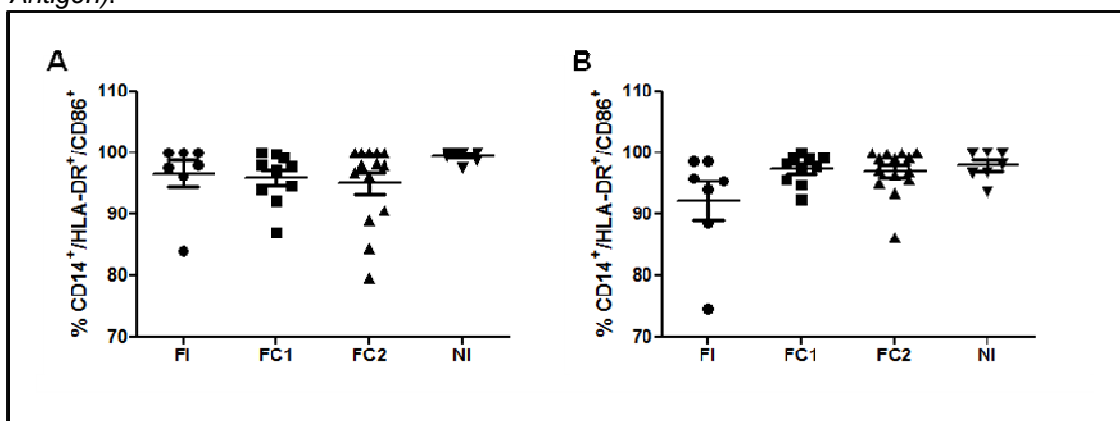


Legenda: Grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) CRA (A), grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) FRA (B). As barras horizontais representam as médias aritméticas.

6.4 Expressão da molécula CD86⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Ao avaliarmos a expressão da molécula CD86⁺, na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, quando estimulados com ambos os antígenos, não detectamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados (Figura 8).

Figura 8: Expressão da molécula co-estimulatória CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com os Ag-Recs CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).

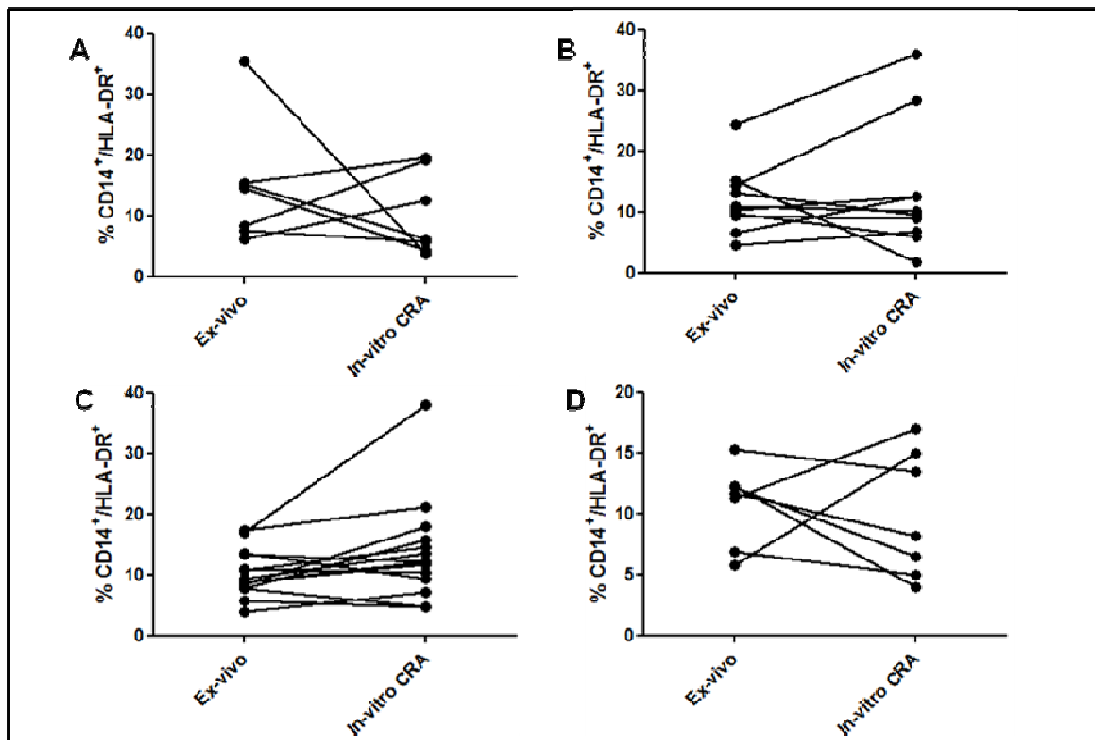


Legenda: Grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) CRA (A), grupos FI (N=7), FC1(N=10), FC2 (N=14) e NI (N=7) FRA (B). As barras horizontais representam as médias aritméticas.

6.5 Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI antes e após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Ao compararmos as expressões da molécula de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ no contexto *ex vivo* e após estímulo com o antígeno CRA não detectamos nenhuma diferença estatisticamente significante (Figura 9)

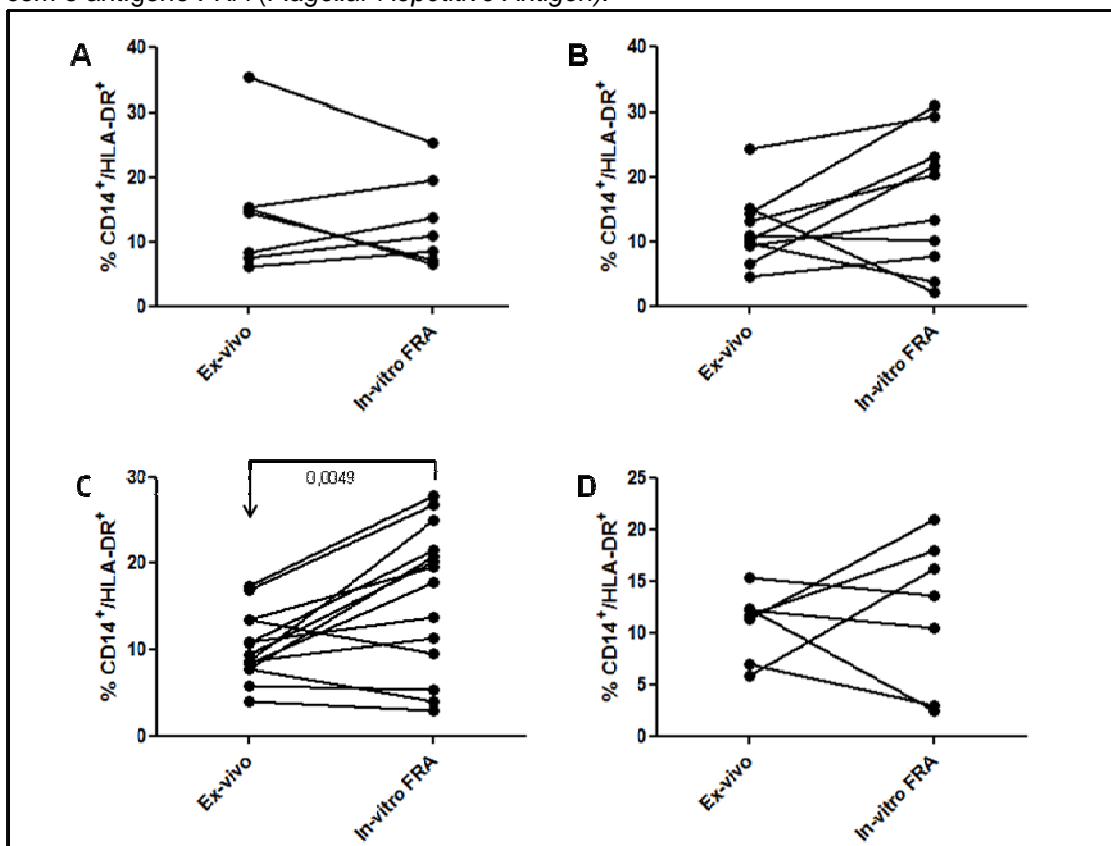
Figura 9: Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR⁺ na superfície de monócitos CD14⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e indivíduos NI, após estímulo com o antígeno CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*).



Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno CRA.

Ao compararmos as expressões da molécula de superfície HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ no contexto *ex vivo* com a expressão da mesma após estímulo *in vitro*, verificamos que indivíduos portadores da forma FC2 apresentaram aumento significativamente estatístico de HLA-DR após estímulo com o antígeno FRA (Figura 10).

Figura 10: Comparação da expressão da molécula de superfície HLA-DR⁺ na superfície de monócitos CD14⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).

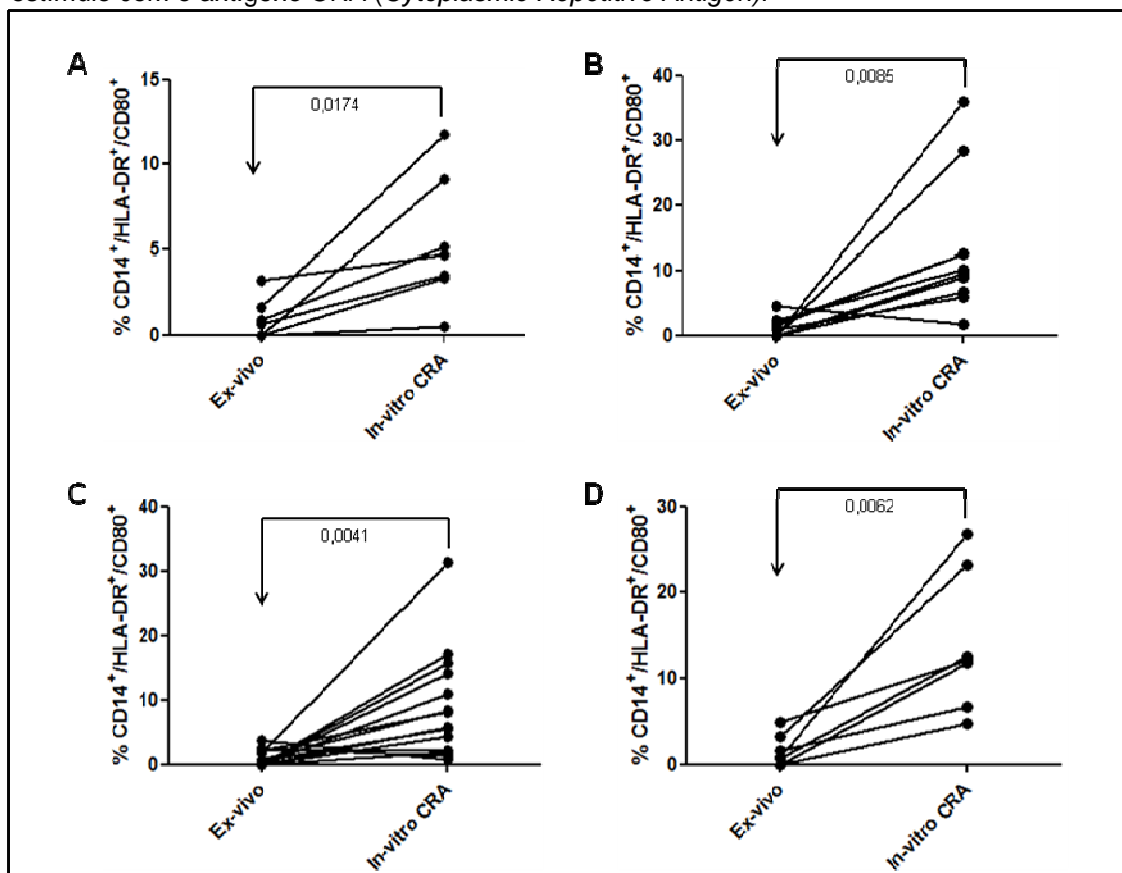


Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno FRA. O valor de $p \leq 0,05$ está indicado quando os resultados foram estatisticamente significativos.

6.6 Comparação da expressão da molécula de superfície CD80⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de portadores das diferentes formas clínicas e de indivíduos NI antes e após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Ao compararmos a expressão da molécula co-estimulatória CD80⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ antes e após estimulação antigênica detectamos que, após estímulo com CRA, o nível de expressão desta molécula aumentou significativamente em todos os grupos de indivíduos estudados, quando comparada à avaliação *ex vivo* (Figura 11).

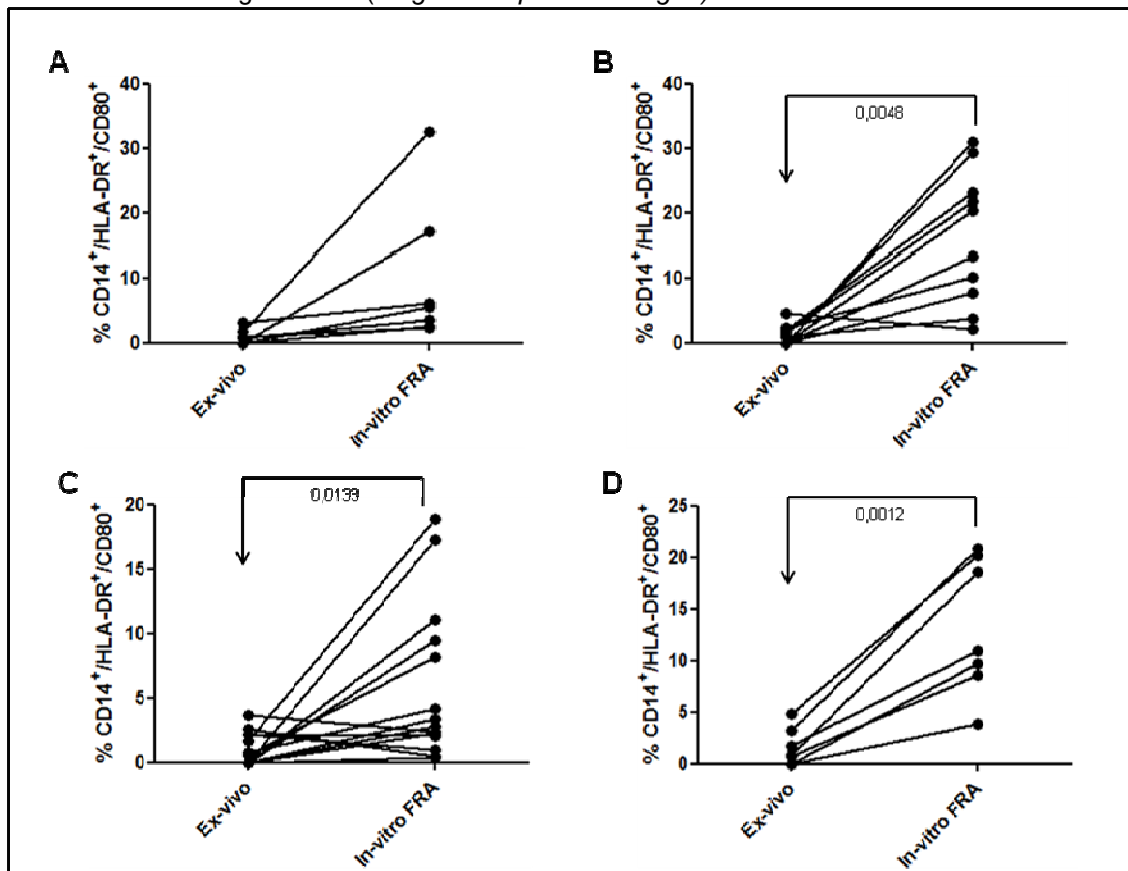
Figura 11: Comparação da expressão da molécula de superfície CD80⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*).



Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno CRA. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$.

Ao compararmos a expressão *ex vivo* e *in vitro*, após estímulo com o antígeno FRA, obtivemos resultados semelhantes ao encontrado quando o estímulo foi CRA, com exceção do grupo FI, onde nenhuma diferença estatística foi encontrada (Figura 12).

Figura 12: Comparação da expressão da molécula de superfície CD80⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI após estímulo com o antígeno FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).

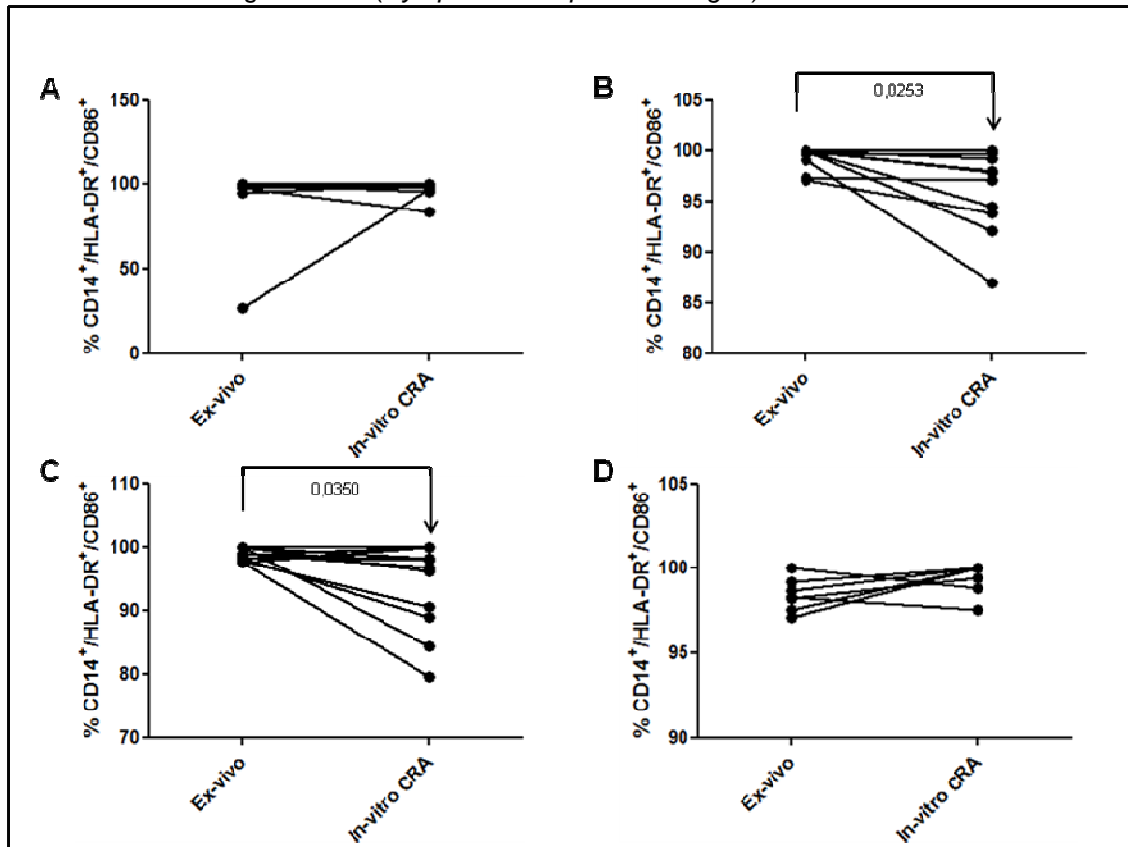


Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno FRA. Valores estatisticamente diferentes foram indicados com valor de $p \leq 0,05$.

6.7 Comparação da expressão da molécula de superfície CD86⁺ em monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de portadores das diferentes formas clínicas antes e após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA

Ao compararmos a expressão da molécula co-estimulatória CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ entre o contexto *ex vivo* e *in vitro*, verificamos que os indivíduos portadores da FC da doença de Chagas, ou seja, FC1 e FC2 apresentaram diminuição significativa na expressão da molécula CD86⁺ após estímulo com o antígeno CRA quando comparado à avaliação dessa molécula antes do estímulo. No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada no grupo dos indivíduos portadores da FI e NI (Figura 13).

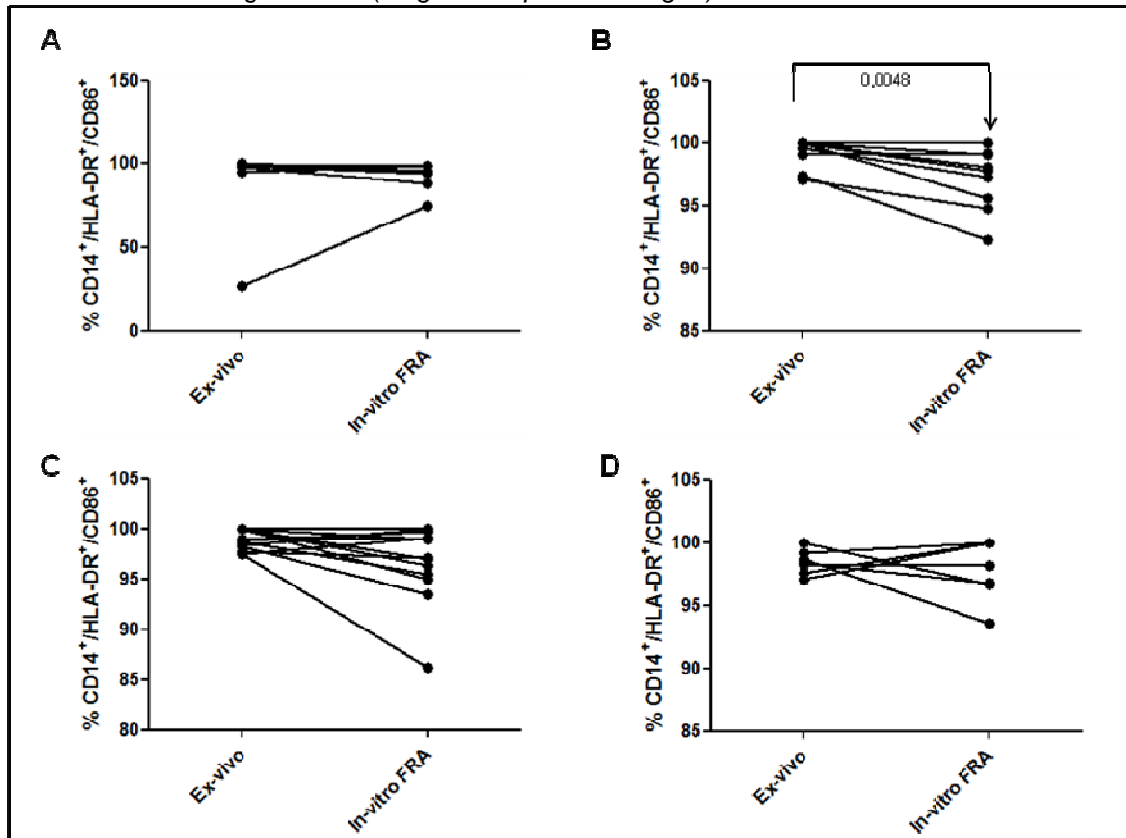
Figura 13: Comparação da expressão da molécula de superfície CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI após estímulo com o antígeno CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*).



Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno CRA. O valor de $p \leq 0,05$ está indicado quando os resultados foram estatisticamente significativos.

Quando o estímulo foi o FRA, verificamos que apenas o grupo de indivíduos FC1 apresentou diminuição estatisticamente significativa quando comparado ao contexto ex vivo (Figura 14).

Figura 14: Comparação da expressão da molécula de superfície CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da DC e NI, após estímulo com o antígeno FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*).



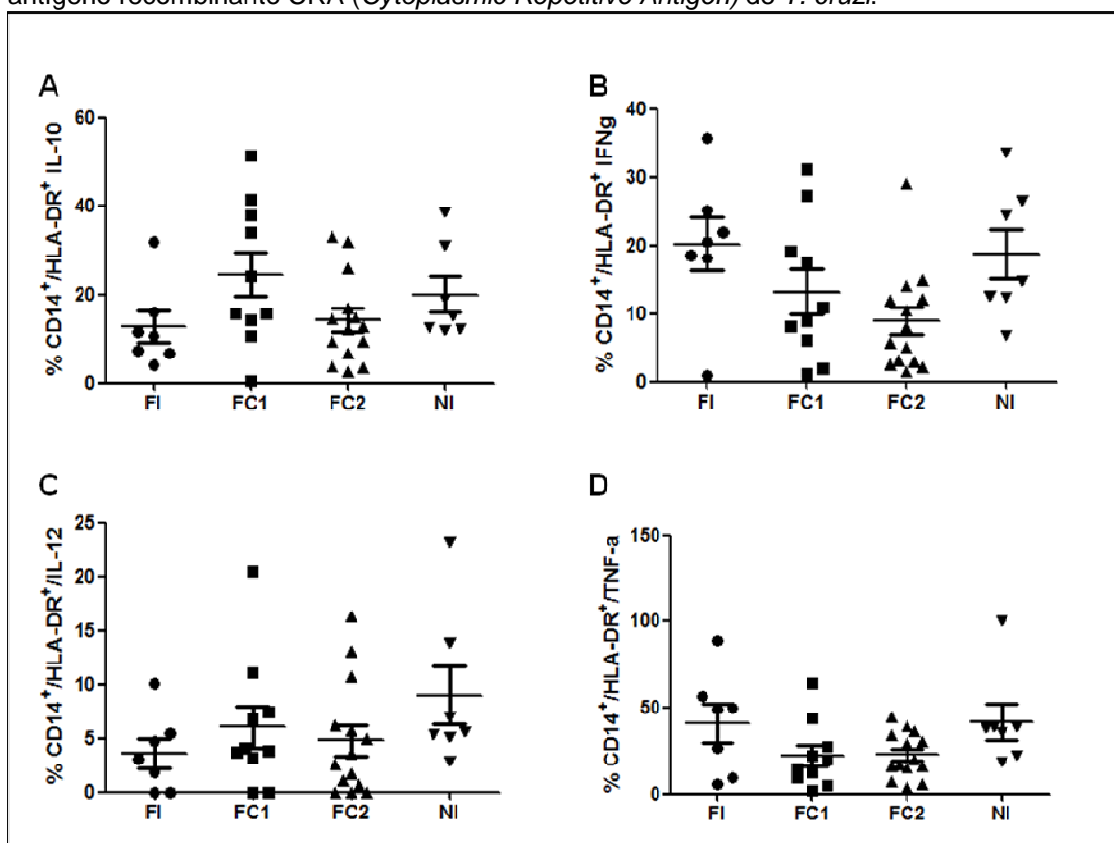
Legenda: Pacientes FI (N = 7) (A), FC1 (N = 10) (B), FC2 (N = 14) (C) e NI (N = 7) (D) estimulados com o antígeno FRA. O valor de $p \leq 0,05$ está indicado quando os resultados foram estatisticamente significativos.

6.8 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ dos diferentes grupos estudados após estimulação *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*

6.8.1 Produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ dos diferentes grupos estudados após estímulo com CRA

Ao analisarmos a produção das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, após estímulo com o antígeno CRA, não verificamos nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 15).

Figura 15: Detecção das citocinas IL-10 (A), IFN- γ (B), IL-12 (C) e TNF- α (D) por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico dos diferentes grupos estudados após estímulo com o antígeno recombinante CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*) de *T. cruzi*.

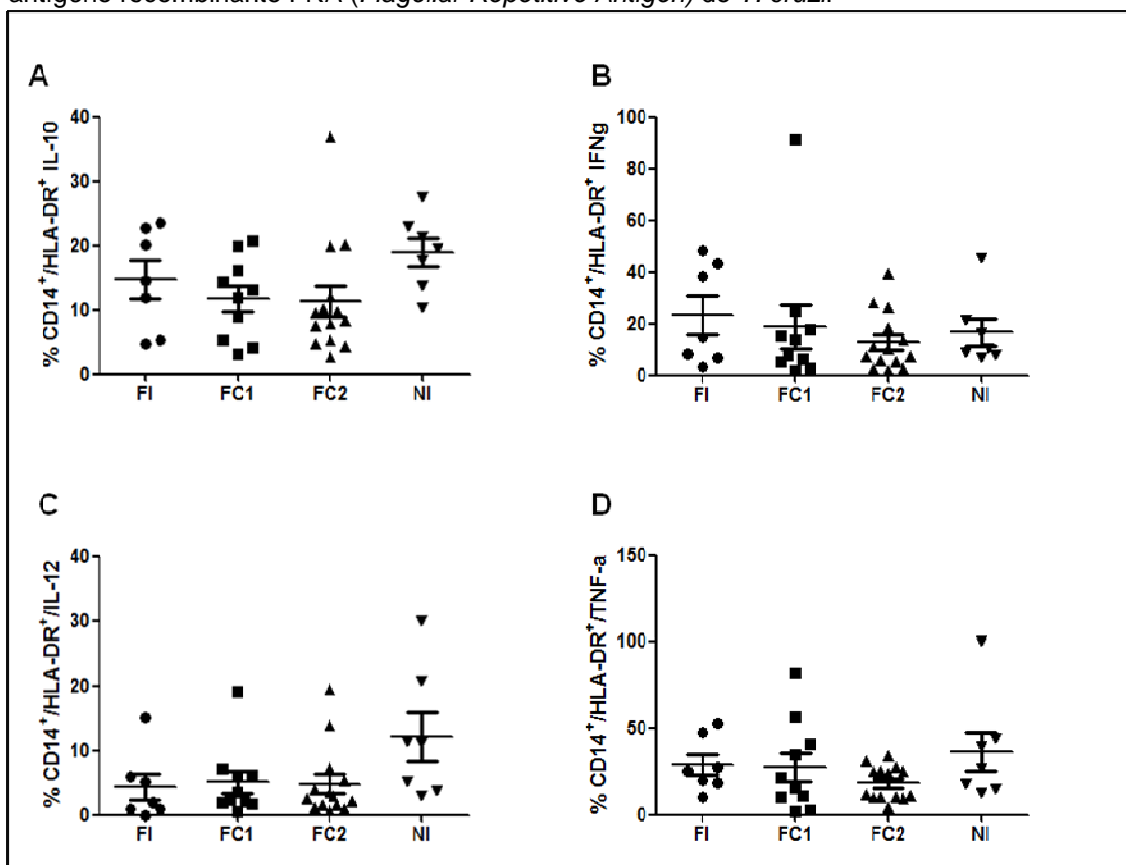


Legenda: Pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (FI) (N=7), forma cardíaca sem dilatação (FC1) (N=10), forma cardíaca com dilatação (FC2) (N=14) e indivíduos não infectados (NI) (N=7). As barras horizontais representam a média aritmética.

6.8.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ após estímulo com FRA

Ao analisarmos a produção das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, após estímulo com o antígeno FRA, não detectamos nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Figura 16).

Figura 16: Detecção das citocinas IL-10 (A), IFN- γ (B), IL-12 (C) e TNF- α (D) por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ de sangue periférico dos diferentes grupos estudados após estímulo com o antígeno recombinante FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *T. cruzi*.



Legenda: Pacientes portadores das formas clínicas indeterminada (FI) (N=7), forma cardíaca sem dilatação (FC1) (N=10), forma cardíaca com dilatação (FC2) (N=14) e indivíduos não infectados (NI) (N=7). As barras horizontais representam a média aritmética.

6.9 Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas

6.9.1 Correlações observadas em pacientes portadores da FI

A Tabela 1 expressa às correlações entre as citocinas produzidas por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ obtidas a partir do estímulo *in vitro* com CRA e FRA de *T. cruzi*. Observamos uma correlação positiva significativa de 0,84, entre as citocinas IL-10 e IFN- γ após estímulo com CRA.

Tabela 1: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14⁺HLA-DR⁺ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da forma clínica crônica FI.

CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	Coeficiente de correlação					
	IL10 x IFN γ	IFN γ x TNF α	IL10 x TNF α	IFN γ x IL12	IL10 x IL12	TNF α x IL12
CRA	0,84*	-0,16	-0,50	0,05	-0,03	0,05
FRA	-0,46	0,30	-0,26	0,23	0,58	0,13

Cytoplasmatic Repetitive Antigen (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen (FRA)*, forma clínica crônica indeterminada (FI). O * representa a diferença estatística com valor de $p \leq 0,05$.

6.9.2 Correlações observadas em pacientes portadores da FC1

Na análise de correlação para os portadores do FC1, observamos uma correlação positiva significativa de 0,71 entre as citocinas IL-10 e IFN- γ quando estimuladas com CRA (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14⁺HLA-DR⁺ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da forma clínica crônica FC1.

CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	Coeficiente de correlação					
	IL10 x IFN γ	IFN γ x TNF α	IL10 x TNF α	IFN γ x IL12	IL10 x IL12	TNF α x IL12
CRA	0,71*	0,56	0,57	0,28	0,06	-0,04
FRA	0,04	0,30	-0,22	0,23	-0,07	-0,35

Cytoplasmatic Repetitive Antigen (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen (FRA)*, forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1). O * representa a diferença estatística com valor de $p \leq 0,05$.

6.9.3 Correlações observadas em pacientes portadores da FC2

Observamos correlação positiva significativa de 0,55 entre as citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α quando estimuladas com CRA, sugerindo uma forte resposta do tipo Th1. Observamos também correlações positivas significativas de 0,58 entre as citocinas IL-10 e IL-12 e também entre as citocinas TNF- α e IL-12, quando estimuladas com FRA (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD14⁺HLA-DR⁺ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da forma clínica crônica FC2.

Coeficiente de correlação						
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	IL10 x IFN γ	IFN γ x TNF α	IL10 x TNF α	IFN γ x IL12	IL10 x IL12	TNF α x IL12
CRA	0,36	0,55*	0,04	0,27	0,48	0,50
FRA	0,24	0,36	0,44	0,41	0,58*	0,58*

Cytoplasmatic Repetitive Antigen (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen (FRA)*, forma clínica crônica cardíaca com dilatação (FC2). O * representa a diferença estatística com valor de $p \leq 0,05$.

7 DISCUSSÃO

A indução de uma resposta imune eficiente é diretamente dependente da ativação apropriada de APCs, uma vez que o estímulo de células T requer uma interação entre seus receptores e o complexo MHC peptídeo. Neste contexto, o estudo funcional de monócitos tem sido alvo de investigações tanto na resposta imune através da produção de citocinas como também da expressão de moléculas co-estimulatórias, envolvidas nos processos imunopatológicos da DC (CAMPOS et al., 2001; CAMPOS; GAZZINELLI, 2004; GOMES et al., 2003; KURODA; KITO; YAMASHITA, 2002; MUZIO et al., 2000; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2005).

No presente trabalho, a capacidade de apresentação de antígenos por monócitos CD14⁺ (obtidos de sangue periférico de pacientes infectados cronicamente com *T. cruzi*) através da expressão de moléculas HLA-DR⁺, CD80⁺ e CD86⁺, bem como a produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2, por essas células ativadas, foi investigada antes e após o estímulo *in vitro* com os antígenos CRA ou FRA.

Com relação à expressão da molécula HLA-DR⁺, na superfície dos monócitos CD14⁺, verificamos que apenas o grupo de portadores da FC2 apresentou aumento desta molécula após estímulo *in vitro* com o Ag-Rec FRA, quando comparado a avaliação antes do estímulo antigênico. Corroborando com o nosso estudo, Molica, (2007), também não observou diferenças estatísticas significantes, na expressão dessa molécula na superfície de macrófagos de portadores da forma FI, após estímulo antigênico. Entretanto, também, não observou diferenças nos grupos FC e NI. Nossos resultados indicam que os portadores da FC2 podem apresentar monócitos CD14⁺ com uma capacidade de estimulação linfocitária aumentada após o estímulo com o Ag-Rec FRA. Isso também nos leva a crer que pode está existindo um predomínio de uma resposta imune inflamatória neste grupo de indivíduos relacionada com a lesão cardíaca tecidual.

As interações que ocorrem entre os monócitos e os linfócitos T, através das moléculas co-estimulatórias e das citocinas, são cruciais para a elaboração de uma resposta imune eficiente (ABBAS e LICHTMAN, 2005; SOUZA et al., 2007). Durante o processamento e apresentação de antígenos as APCs necessitam de estímulos para a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80⁺ e CD86⁺,

importantes para promover ativação e diferenciação dos linfócitos T (FREEMAN, et al., 1993a, FREEMAN, et al., 1993b). A molécula CD86⁺ por ser constitutiva, apresenta uma expressão mais abundante na superfície dos monócitos, já a molécula CD80⁺ só é expressa na célula após estímulo (HATHCOCK et al., 1993; LENSCHOW et al., 1994; SOUZA et al., 2007).

Sendo assim, ao avaliarmos a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, verificamos que em todos os grupos de indivíduos estudados houve aumento da expressão da molécula CD80⁺ (com exceção do grupo de indivíduos FI quando o estímulo foi FRA), quando comparamos a avaliação realizada *ex vivo versus in vitro* após estímulo com ambos os Ag-Recs. Nossos resultados corroboram com o estudo de Souza et al., (2007), que também observaram um aumento na expressão da molécula CD80⁺ na superfície de monócitos após a infecção de células aderentes pelo *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que, após estímulo com ambos os Ag-Recs, observou-se um aumento expressivo na porcentagem de expressão da molécula CD80⁺ em monócitos ativados, no grupo de portadores da FC. Esse achado sugere que o aumento da expressão dessa molécula co-estimulatória, atrelado a outros fatores ligados a apresentação de antígeno, como é o caso da correta expressão da molécula HLA-DR⁺, favorece um aumento da estimulação das células T, levando a um possível direcionamento para um perfil do tipo Th1 (GREENFIELD et al., 1998; PLANELLES et al., 2003).

Quando avaliamos a expressão da molécula co-estimulatória CD86⁺, na superfície dos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, detectamos uma diminuição na expressão desta molécula no grupo de portadores das formas clínicas cardíacas (FC1 e FC2), após estímulo com o Ag-Rec CRA. Quando o estímulo foi o Ag-Rec FRA, verificamos que esta diminuição de expressão ocorreu apenas no grupo de portadores da forma clínica FC1, apesar de verificarmos que o grupo de portadores da FC2 também apresentou este comportamento. Esses achados corroboram com os resultados encontrados por Souza et al., (2004), e Molica, (2007), onde a diminuição na expressão da molécula CD86⁺ foi observada nos monócitos de pacientes portadores da forma cardíaca. O mesmo fenômeno foi observado por Planelles et al., (2003), que detectaram uma diminuição na expressão desta molécula também em macrófagos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Nossos dados, em conjunto com outros achados, sugerem que, a alteração da expressão

das moléculas co-estimulatórias, é um passo importante na evolução da resposta imune celular frente ao *T. cruzi*, que, provavelmente, pode está liberando fatores solúveis imunossupressores, desequilibrando o sistema imunitário e desenvolvendo assim, um mecanismo de fuga do sistema imunológico. Se assim for, esta inibição pode ser adicionada a uma lista de outros mecanismos de escape utilizados por alguns microorganismos para reduzir a eficácia da resposta imune do hospedeiro podendo explicar também a persistência dos parasitas e lesão tecidual (GOTO; LINDOSO 2004; KAYE et al., 1994; LA FLAMME et al., 1997; PLANELLES et al., 2003; REINER, 1994; RUSSO et al., 1993; SAHA et al., 1995; VAN OVERTVELT et al., 1999). Desta forma, a avaliação de moléculas co-estimulatórias, bem como inibitórias da ativação dos linfócitos T deveria ser melhor estudada, para uma elucidação dos principais mecanismos de fuga desenvolvidos pelo *T. cruzi*.

Com o objetivo de esclarecer melhor o papel imunorregulatório dos monócitos na DC, avaliamos também os níveis de citocinas produzidas por essas células. Estudos em modelos experimentais e em humanos têm relatado o importante papel de citocinas na regulação da resposta imunológica na DC (ABRAHAMSOHN; COFFMAN 1996; LORENA et al., 2010; FERREIRA et al., 2003) Apesar dessa importância, os aspectos protetores e lesivos no paradigma Th1 x Th2 nunca chegaram a serem estabelecidos na DC humana (DUTRA; GOLLOB, 2008). Entretanto, não restam dúvidas de que as citocinas estejam desempenhando importante função na regulação da resposta imune além de estarem também envolvidas nos mecanismos relacionados com a imunopatologia da doença. O perfil de citocinas foi relatado como de grande importância para definição dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na miocardiopatia chagásica crônica (D'ÁVILA et al., 2009). Acredita-se que a resposta imunológica é crucial para a proteção contra DC, principalmente na fase inicial da doença, no entanto, o desequilíbrio da resposta imune pode ocasionar as lesões encontradas em portadores das formas clínicas crônicas sintomáticas (D'ÁVILA et al., 2009).

O processo de fagocitose mediado por macrófagos é capaz de ativar a produção de uma série de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- α , que contribuem para produção de IFN- γ (SILVA et al., 1992). Na DC experimental, a citocina IFN- γ tem sido identificada como um fator de resistência por apresentar uma importante função de contenção da parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* (MINOPRIO et al., 1986; REED, 1988; TORRICO et al., 1991). Na DC humana,

níveis elevados dessa citocina têm sido associados com a severidade da doença cardíaca em pacientes portadores da fase crônica (BARROS-MAZON et al., 2004; DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; LORENA et al., 2010), provavelmente por um aumento da resposta imune inflamatória, particularmente nas fibras cardíacas, promovendo a destruição dessas células. Além do IFN- γ , a IL-12, também está envolvida no controle da infecção pelo *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 1996). Essa citocina promove a estimulação e a síntese de outras citocinas pelas células *Natural killers* e linfócitos T auxiliares, além de induzir a ativação e expansão destas subpopulações de linfócitos (TRINCHIERI et al., 1995).

A IL-10 é identificada por sua capacidade de inibir a produção da citocina IFN- γ por células TCD4⁺ (MOORE et al., 1990; MOORE et al., 1993). Além disso, a IL-10 também apresenta a capacidade de inibir a expressão de moléculas de MHC de classe I e II, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias pelos monócitos (KUBIN et al., 1994), antagonizando os mecanismos efetores antimicrobianos dos macrófagos (GAZZINELLI et al., 1992).

Apesar de não detectarmos diferenças estatisticamente significantes ao avaliarmos a produção dessas citocinas entre os grupos estudados, verificamos correlações existentes entre as produções de citocinas por monócitos CD14⁺HLA-DR⁺. Nossos resultados demonstraram a existência de uma forte correlação positiva entre as citocinas IL-10 e IFN- γ , em pacientes da FI, após estímulo *in vitro* com o Ag-Rec CRA. Alguns trabalhos têm demonstrado um perfil misto de produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 por pacientes portadores da FI (D'ÁVILA et al., 2009; LAUCELLA et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008) sugerindo que esses pacientes poderiam estar apresentando um controle do parasitismo, demonstrado pela produção da citocina IFN- γ , concomitantemente a uma modulação da resposta imunológica com a produção da IL-10, evitando assim, o dano tecidual. Entretanto, o fato dos pacientes portadores da FI também produzirem IFN- γ , após estimulação antigênica específica, poderia estar relacionado com a ausência de precisão quanto ao período de infecção do paciente, ou seja, torna-se difícil determinar o tempo de desenvolvimento da doença (CORRÊA-OLIVEIRA 1999; GOMES et al., 2003). É sugerido que IFN- γ é um fator solúvel importante no desenvolvimento da miocardiopatia grave, sendo então razoável acreditar que os pacientes da FI, que apresentam elevada produção de IFN- γ , podem vir a desenvolver a cardiomiopatia

chagásica durante sua evolução clínica (CORRÊA-OLIVEIRA 1999; DUTRA e GOLLOB, 2008; GOMES et al., 2003).

Com relação a FC1, também observamos uma correlação positiva entre citocinas IL-10 e IFN- γ , quando as células sanguíneas foram estimuladas com o Ag-Rec CRA. Nossos resultados corroboram com os de Lorena et al., (2010), que também verificaram correlações positivas entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nos grupos de pacientes portadores da cardiomiopatia chagásica. Acreditamos que apesar desses pacientes portadores da FC1, apresentarem uma resposta inflamatória mais acentuada, ainda tenham a capacidade de manter alguns mecanismos de regulação.

Nos portadores da FC2, observamos uma correlação positiva entre as citocinas IFN- γ e TNF- α , após estímulo *in vitro* com CRA, e das citocinas TNF- α e IL-12, após estímulo *in vitro* com FRA. Esses dados sugerem uma forte resposta do tipo Th1 nos pacientes com a cardiomiopatia chagásica grave, corroborando com os achados de Gomes et al, (2003) que também demonstraram a presença de uma forte resposta do tipo Th1 em pacientes cardiomiopatas. Entretanto, também encontramos uma correlação positiva entre as citocinas IL-10 e IL-12, sugerindo, mais uma vez, a persistência de uma resposta modulatória nesses pacientes, como também foi observado por Lorena et al., (2010) e contrariamente a Gomes et al., (2003), que sugerem que pacientes com as formas graves da doença, tenham perdido a capacidade imunomodulatória pela secreção de citocinas anti-inflamatórias.

Em síntese, o presente estudo demonstrou que no curso da DC crônica, uma importante diferenciação no perfil de expressão das moléculas de superfície, relacionadas à capacidade de apresentação de antígenos, além de uma influência no padrão de produção de citocinas pelos monócitos ativados, após estimulação antigênica específica, está ocorrendo. Os Ag-Recs CRA e FRA poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro pelo *T. cruzi*. A alteração observada na expressão das moléculas co-estimulatórias, apontam possíveis mecanismos de inibição desenvolvidos pelo *T. cruzi*, que diminuam a expressão de moléculas essenciais para a estimulação/ativação de linfócitos T (RUSSO et al., 1993). Sendo assim, estudos prospectivos que associem a expressão de moléculas estimulatórias e inibitórias expressas nas células T, tais como, CD28⁺ e CTLA-4, respectivamente,

com a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺, são importantes para avaliar a evolução da imunopatologia da DC. A continuação dos estudos clínicos associados à investigação imunológica da reatividade celular dos pacientes traria maior entendimento dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento das manifestações clínicas na fase crônica da DC.

8 CONCLUSÕES

- a) Não verificamos diferenças estatisticamente significativas com relação à expressão das moléculas co-estimulatórias na superfície de células CD14+, entre os grupos estudados. No entanto, o aumento na expressão da molécula co-estimulatória CD80⁺ associado à diminuição da expressão da molécula CD86⁺ no grupo de portadores FC, quando comparados os contextos *ex vivo* e após estímulo com os Ag-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*, pode apontar um possível envolvimento desses antígenos com os mecanismos de fuga da resposta imune do hospedeiro, utilizados pelo *T. cruzi*.
- b) Correlações positivas entre IL-10 e IFN- γ foram verificadas entre os grupos de portadores da FI e FC1, indicando um controle do parasitismo, concomitantemente a uma modulação da resposta imunológica evitando assim, o dano tecidual. A predominância de uma correlação positiva entre as citocinas inflamatórias no grupo FC2 indica um predomínio de um perfil do tipo Th1, relacionado com a severidade do dano cardíaco. Apesar disso, esses indivíduos, também apresentaram correlações positivas entre as citocinas IL-12 e IL-10, indicando que possuem mecanismos de regulação, como a secreção de IL-10, na tentativa de evitar danos teciduais causados principalmente por IFN- γ .

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunologia celular e molecular. 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-12 regulate innate response and acquired immunity to infection. Experimental Parasitology, New York, v. 84, p. 231-244, 1996.

ALIBERT, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. Infection and Immunity, Bethesda, v. 64, n. 5, p. 1961-1967, 1996.

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

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benzonidazole 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.

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.

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.

BORGES, M. M. et al. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- α production during *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology Letters, Amsterdam, v. 63, p. 1-8, 1998.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 38, supl. 3, n. 29, 2005. Número especial.

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

BRAZ, S. C. M. Avaliação das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas formas clínicas da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

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

CAMPOS, A. M. S.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators of Inflammation, Basel, v.13, p. 139-143, 2004.

CAMPOS, M. A. S et al. Activation of Toll-Like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan Parasite. The Journal of Immunology, Oslo, v. 16, p. 416-423, 2001.

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

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

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CANÇADO, J. R., SCHUSTER, M. (Ed.). Cardiopatia chagásica. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1985, p. 327-355.

CANÇADO, J. R. et al. Ensaio terapêutico clínico na doença de Chagas crônica com o nifurtimox em três esquemas de duração prolongada. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo v. 17, p. 111-125, 1975.

CERISOLA, J. A., LUGONE, S. H., RABINOVICH, L. B. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Talleres Gráficos Elías Porter SRL Argentina, 1972, p. 75.

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.

COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, cap. 27, 469-486.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery, A systemic review. Acta Tropica, Netherlands, v. 113, p. 5-13, 2010.

D'ÁVILA, D. et al. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 100-105, 2009.

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.

DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. Parasitology today, Cambridge, v. 3, p. 336-41, 1987.

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

DIAS J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z. ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Ed.) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2nd ed., Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000, p. 48-74.

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

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

FREEMAN, G. J. et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. Science, Londres, v. 262, p. 909-911, 1993a.

FREEMAN, G. J. et al. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. Journal of Experimental Medicine, Taipei, v. 178, p. 2185-2192, 1993b.

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.

GAZZINELLI, R. T. et al., The microbicidal activity of interferon-g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-b. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 22, p. 2501–2506, 1992.

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.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Brazilian Journal Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 37, p. 615–623, 2004.

GREENFIELD, E. A.; NGUYEN, K. A.; KUCHROO, V. K. CD28/B7 co-stimulation: a review. Critical Reviews in Immunology, Boca Raton, v. 18, p. 389–418, 1998.

HATHCOCK, K. S., et al. Identification of an alternative CTLA-4 ligand co-stimulatory for T cell activation. Science, Londres, p. 262-265, 1993.

HIGUCHI, M. L., 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, p. 485-589, 1997.

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

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.

KAYE, P. M., et al. Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 24, p. 2850–2854, 1994.

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.

KUBIN, M., KAMOUN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production by human T cells. Journal of Experimental Medicine, Israel, v. 180, p. 211, 1994.

KURODA, E.; KITO, T.; YAMASHITA, U. Reduced Expression of STAT4 and IFN- γ in Macrophages from BALB/c Mice. The Journal of Immunology, Oslo, v. 168, p. 5477 – 5482, 2002.

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

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

LA FLAMME, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi* infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 27, p. 3085–3094, 1997.

LAINSON R., et al. Chagas's disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in sylvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, North Brazil. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 73, p. 193-204, 1979.

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.

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

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

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

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

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

LUQUETTI, A. Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Revista Goiana de Medicina, Goiana, v. 33, p. 1-16, 1987

MAZZA, S.; FREIRE, R. S. Manifestaciones cutâneas de inoculación, metastáticas y hematógenas en enfermedad de Chagas. Chagoma de inoculación, chagomas metastáticos y chagoma hematógenos. Middle East Public Relations Association, Istanbul, n. 46, p. 3-38, 1940.

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

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.

MINOPRIO, P. et al. Policlonal Lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantification of both T and B cells responses. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo v. 24, p. 661, 1986.

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

MOORE, K. W., et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. Science, London, p. 248:1230, 1990.

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

MORAES-SOUZA, H. et al. Serological profile concerning Chagas' disease of blood donors at Uberaba blood center. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo, v. 28, sup. II, p. 110-114, 2006.

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.

MUZIO, M. et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. The Journal of Immunology, Oslo, v. 1, n. 164, p. 5998-6004, 2000.

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

PLANELLES, L., M. C. et al. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APC from resistant or susceptible mice. Clinical e Experimental Immunology, London, v. 131, p. 41-47, 2003.

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

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

REED, S.G. In vivo administration of recombinant IFN γ induces macrophage activation and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *T. cruzi* infection. The Journal of Immunology, Oslo, v. 140, p. 4342-4347, 1988.

REICHIE, E.M.V., et al. Congenital Chagas' disease: epidemiology, laboratorial diagnosis, prognosis and treatment. Journal of Pediatrics, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 125-132, 1996.

REINER, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. Immunology Today, Amsterdam, v. 15, p. 374-381, 1994.

REZENDE, J. M.; RASSI A. Doença de Chagas. In: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. Protozooses Humanas. São Paulo: Fundo editorial Byk, 1994.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z. et al., *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. Elementos de epidemiologia epidemiológica. In: _____. Epidemiologia & Saúde. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003, p.149-177.

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

SAHA B. et al. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 25, p. 2492-2498, 1995.

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

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

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.

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

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

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v.6, n.1, p. 25-32, 2008.

TAKAHASHI, H. k. et al. Differential effect of prostaglandins E1 and E2 on lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression on human monocytes. European Journal of Pharmacology, Amsterdam, v. 512, p. 223-230, 2005.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T., SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitology, Oxford, v. 18, p. 262–265, 2002.

TORRICO F. et al. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. The Journal of Immunology, Oslo, v. 146, p. 3626-3632, 1991.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 13, p. 251-276, 1995.

TURLEY, S. J. et al. Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. Science, London, v. 288, p. 522-526, 2000.

UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA. The Board of Trustees. Papel das co-estimulatórias na ativação das células T. Carolina do Sul, 2009. Disponível em : <pathmicro.med.sc.edu >. Acesso em 15 de Jan de 2012.

VALENTE, S. A. S., et al. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas' disease in the Brazilian Amazon. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 395-398, 1999.

VAN OVERTVELT et al., *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and co-stimulatory molecules. Infection and Immunity, Bethesda, v. 67, p. 4033–40, 1999.

VASCONCELOS, R. H. T. et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. Human Immunology, New York, v. 71, p. 964-967, 2010.

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

VIANNA, G. O. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas” (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 3, p. 276-294, 1911.

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

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

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

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PORTADOR DE *Trypanosoma cruzi*

Título de projeto: Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, _____,

RG _____, residente na rua _____

_____, n. _____

bairro _____, município _____,

Estado ____, usuário do (s) telefone (s) () _____,

aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar células do sangue diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas (antígenos). Fui informado que como portador da doença de Chagas terei até seis colheres de chá de meu sangue (30 ml) coletadas através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20C. Também fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se tais antígenos funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença serão de grande auxílio para geração de conhecimento e futuramente para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Também fui informado que os resultados dos meus exames clínicos como raio-X, eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através de meu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores e meu médico. Além disso, também responderei a um formulário de pesquisa. Fui informado que os



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa e que autorizo que sejam armazenadas amostras biológicas para utilização posterior. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento de participar da pesquisa sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Além disso, fui informado que participando ou não dessa pesquisa meu atendimento no ambulatório, bem como meu tratamento continuará acontecendo normalmente.

Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador e outra comigo.

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

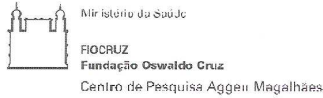
Data: ____ / ____ / ____

_____	_____
Paciente	Assinatura
_____	_____
Testemunha	Assinatura
_____	_____
Responsável pelo projeto	Assinatura

Responsáveis principais pelo projeto:

Yara M. Gomes (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2559/ 2101-2674
 Virginia M. Barros de Lorena (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9965-1663
 Adriene S. Melo (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9734-4694
 Ana Karine Soares (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 8692-1419
 Suellen C. M. Braz (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9127-1868
 Maria da Glória de Melo (HUOC/UPE) Telefone: 2101-1441/ 9976-5398

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O VOLUNTÁRIO CONTROLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O NÃO PORTADOR DE *Trypanosoma cruzi*

Título de projeto: Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, _____,
RG _____, residente na rua _____,
_____, n. _____,
bairro _____, município _____,
Estado _____, usuário do (s) telefone (s) () _____,

aceito participar desse estudo, como voluntário não portador de *Trypanosoma cruzi*, cujo objetivo é analisar células do sangue diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas (antígenos). Fui informado que terei até seis colheres de chá de meu sangue (30 ml) coletadas através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20C. Também fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se tais antígenos funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença serão de grande auxílio para geração de conhecimento e futuramente para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que responderei a um formulário de pesquisa e que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa e que autorizo que sejam armazenadas amostras biológicas para utilização posterior. Também fui informado



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo.

Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador e outra comigo.

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

Data: ___ / ___ / ___

Voluntário Controle

Assinatura

Testemunha

Assinatura

Responsável pelo projeto

Assinatura

Responsáveis principais pelo projeto:

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

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

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

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

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

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

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



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de Chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*."

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/05/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 33/10

Registro no CAAE: 0032.0.095.000-10

PARECER Nº 34/2010

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de julho de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de julho de 2010.




Giselle Camposana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIA/PE 0463375
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 07/07/2011.

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


Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde