



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



**Virginia Maria Barros de Lorena**

---

**Investigação de marcadores imunológicos na  
doença de Chagas utilizando os antígenos  
recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

---

RECIFE

2009

**Virginia Maria Barros de Lorena**

**Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os  
antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de  
Doutorado em saúde Pública do Centro  
de Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz para a  
obtenção do grau de Doutora em  
Ciências.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes

Co-orientador: Rodrigo Correa-Oliveira

Recife

2009

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

---

L868a Lorena, Virginia Maria Barros de.  
Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*/ Virginia Maria Barros de Lorena. — Recife: V. M. B. de Lorena, 2009.  
109 p. : il., tabs.

Tese (doutorado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 23 set. 2009.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes

Co-orientador: Rodrigo Correa-Oliveira.

1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Citocinas - produção. 3. Marcadores Imunológicos. 4. Antígenos recombinantes. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Correa-Oliveira, R.. III. Título.

---

CDU 616.937

**Virginia Maria Barros de Lorena**

**Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 23 de setembro de 2009.

**Banca examinadora**

---

Dra Yara de Miranda Gomes  
Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

---

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

---

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Departamento de Imunologia do CPqAM/ Fiocruz

---

Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza  
Departamento de Patologia da UPE

---

Dra. Vlúdia Maria de Assis Costa  
Departamento de Parasitologia da UFPE

Aos portadores da doença de Chagas que com toda boa vontade permitiram a coleta de seu sangue contribuindo com este estudo, na esperança de ajudar, um dia, outras pessoas acometidas pela doença.

Aos meus pais Simplício e Lenira  
Aos meus irmãos Alexandre, Henrique e Izaura  
Aos meus sobrinhos Gustavo, Mathaeus, Milena e Bruno  
Aos meus sogros Sérgio e Nina  
Ao meu esposo Paulo  
Amo todos vocês! Obrigada por tudo!

## **AGRADECIMENTOS**

A todos

do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães;

da Coordenação do Curso de Doutorado em Saúde Pública;

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

de Bio-Manguinhos;

do Centro de Pesquisas René Rachou;

do Conselho Nacional de Pesquisas.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

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

Obrigada a todos vocês!!!!

Agradeço ao Grupo Chagas, que em todos os momentos foi a força e o alicerce dos trabalhos. Agradeço ao profissionalismo, dedicação, envolvimento, preocupação e, claro, a amizade verdadeira construída com cada um, nessa longa jornada. Sem vocês tudo seria mais difícil. Muito obrigada!!! Desejo muito sucesso a todos!



“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida”

Carlos Chagas

LORENA, Virginia Maria Barros de. **Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2009. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

## RESUMO

As manifestações clínicas da doença de Chagas humana estão associadas com as distintas e complexas relações parasito-hospedeiro que envolvem diretamente o sistema imune. Nesse contexto, nos propomos analisar a relação entre a produção de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) ou FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *Trypanosoma cruzi* e as formas clínicas crônicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas. O grupo de pacientes chagásicos consistiu de 39 indivíduos portadores: forma cardíaca sem dilatação cardíaca (FC1) (n=15); forma cardíaca com dilatação cardíaca (FC2) (n=15) e forma indeterminada (FI), selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. O sangue total destes indivíduos foram submetidos à cultura na presença de CRA ou FRA por 1 dia e citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos e monócitos foram analisadas através da citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas por linfócitos T CD8+ após estímulo *in vitro* com o CRA foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores da FC2 dos pacientes portadores da FC1 e da FI, podendo ser consideradas marcadores imunológicos da forma clínica cardíaca da doença de Chagas. Após estudo prospectivo de indivíduos portadores da FI e FC1, essa ferramenta poderia ser utilizada no seguimento das intervenções terapêuticas, melhorando a qualidade de vida do paciente.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Citocinas, Marcadores Imunológicos, Antígenos Recombinantes

LORENA, Virginia Maria Barros de. **Investigation of immunological markers in Chagas' disease using the CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi***. 2009. Thesis (Health Public PhD) – Center of reaches Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, 2009.

### **ABSTRACT**

The manifestations in human Chagas' disease are associated with distinct and complex host-parasite relationships, which are directly involved with the immune system. In this context, we proposed to analyze the relationship between the production of intracytoplasmic cytokines after *in vitro* stimulation with recombinant antigens CRA (Cytoplasmic Repetitive Antigen) or FRA (Flagellar Repetitive Antigen) from *Trypanosoma cruzi* and the clinical forms of chronic cardiac and indeterminate Chagas' disease. The group of chagasic patients was consist of 39 individuals: cardiac form without cardiac dilatation (FC1) (n=15), cardiac form with cardiac dilatation (FC2) (n=15) and indeterminate form (FI) (n=9) selected in the Chagas' disease Ambulatory of Oswaldo Cruz University Hospital of Universidade de Pernambuco. The whole blood's samples of the patients were submitted to culture in the presence of CRA or FRA during one day. The intracytoplasmic cytokines produced by lymphocytes and monocytes were analyzed by flow cytometry. Our results showed that IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , which were produced by CD8+ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with CRA, was able to differentiate between chagasic patients carrying the CF2 of CF1 and IF. This cytokines could be immunological markers of clinical cardiac form of Chagas' disease. After a prospective study of patients from the IF and CF1, this tool could be used in monitoring the therapeutic interventions, improving quality of life.

**Keywords:** Chagas' disease, Cytokines, Immunological Markers, Recombinant Antigens

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas .....	26
<b>Figura 2</b>	SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de <i>Trypanosoma cruzi</i> purificados através de cromatografia de metal quelado, corado pela prata .....	30
<b>Figura 3</b>	Esquema das principais etapas do ensaio de marcação de superfície e das citocinas intracitoplasmáticas .....	44
<b>Figura 4</b>	Aquisição e análise dos linfócitos .....	46
<b>Figura 5</b>	Aquisição e análise dos monócitos .....	47
<b>Figura 6</b>	Cinética da detecção de IFN- $\gamma$ em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	50
<b>Figura 7</b>	Cinética da detecção de IFN- $\gamma$ em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	50
<b>Figura 8</b>	Cinética da detecção de IL-10 em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	51
<b>Figura 9</b>	Cinética da detecção de IL-10 em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	51
<b>Figura 10</b>	Cinética da detecção de TNF- $\alpha$ em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	52
<b>Figura 11</b>	Cinética da detecção de TNF- $\alpha$ em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	52
<b>Figura 12</b>	Cinética da detecção de IL-4 em células CD4+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	53

<b>Figura 13</b>	Cinética da detecção de IL-4 em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	53
<b>Figura 14</b>	Cinética da detecção de TNF- $\alpha$ em células CD14+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	54
<b>Figura 15</b>	Cinética da detecção de IFN- $\gamma$ em células CD14+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	54
<b>Figura 16</b>	Cinética da detecção de IL-10 em células CD14+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo <i>in vitro</i> na presença dos estímulos CRA ou FRA .....	55
<b>Figura 17</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por células T CD4+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de <i>T. cruzi</i> . .....	57
<b>Figura 18</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por células T CD4+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de <i>T. cruzi</i> .....	58
<b>Figura 19</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por células T CD8+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de <i>T. cruzi</i> . .....	60
<b>Figura 20</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por células T CD4+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de <i>T. cruzi</i> . .....	61
<b>Figura 21</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-10 (B) e TNF- $\alpha$ (C) por monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de <i>T. cruzi</i> .....	62

<b>Figura 22</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-10 (B) e TNF- $\alpha$ (C) por monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de <i>T. cruzi</i> . .....	63
<b>Figura 23</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de <i>T. cruzi</i> . .....	67
<b>Figura 24</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de <i>T. cruzi</i> .....	68
<b>Figura 25</b>	Detecção das citocinas IFN- $\gamma$ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$ (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica indeterminada (FI) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de <i>T. cruzi</i> . .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Estudos realizados sobre a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$ por pacientes chagásicos em resposta a antígenos de <i>T. cruzi</i> .....	29
<b>Tabela 2</b>	Características dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo .....	41
<b>Tabela 3</b>	Freqüência dos indivíduos altos produtores de citocinas baseada na média global após estímulo com CRA .....	65
<b>Tabela 4</b>	Freqüência dos indivíduos altos produtores de citocinas baseada na média global após estímulo com FRA .....	66
<b>Tabela 5</b>	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da FC1 .....	70
<b>Tabela 6</b>	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da FC2 .....	71
<b>Tabela 7</b>	Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos <i>in vitro</i> com os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> por pacientes portadores da FI .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

Ags-Recs	Antígenos recombinantes
APC	Alofococianina ( <i>Allophycocyanin</i> )
CD	Grupos de diferenciação ( <i>Cluster of differentiation</i> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRA	Antígeno Repetitivo Citoplasmático ( <i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i> )
CRM	Conselho Regional de Medicina
CTLA-4	Proteína 4 associada ao Linfócito T citotóxico ( <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> )
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIE-Rec	Ensaio Imunoenzimático-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos
EPI	Antígeno solúvel de epimastigota
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Forma cardíaca
FC1	Forma cardíaca sem dilatação
FC2	Forma cardíaca com dilatação
FD	Forma digestiva
FI	Forma indeterminada
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
FL	Fluorescência
FRA	Antígeno Repetitivo Flagelar ( <i>Flagellar Repetitive Antigen</i> )
FSC	Dispersão frontal ( <i>Forward Scatter</i> )
HLA	Antígeno Leucocitário Humano ( <i>Human Leukocyte Antigens</i> )
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
IL	Interleucina
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro



M	Molar
mM	Milimolar
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
mL	Mililitro
n	Número de amostra
NI	Grupo de indivíduos não infectado
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde
PE	Ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> )
PFR	<i>Paraflagellar Rod Proteins</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SSC	Dispersão lateral ( <i>Side Scatter</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- $\beta$	Fator de crescimento beta e transformação
Th1	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIPO	Antígeno solúvel de tripomastigota
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
WHO	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1.1</b>	<b>Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas</b> .....	21
<b>1.2</b>	<b>Aspectos clínicos da doença de Chagas</b> .....	22
<b>1.3</b>	<b>Marcadores imunológicos na doença de Chagas</b> .....	24
<b>1.4</b>	<b>Os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i></b> .....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	34
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	35
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	35
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>5.1</b>	<b>Materiais</b> .....	36
5.1.1	Equipamentos .....	36
5.1.2	Reagentes e produtos .....	36
<b>5.2</b>	<b>Métodos</b> .....	38
5.2.1	Antígenos recombinantes de <i>T. cruzi</i> .....	38
5.2.2	População do estudo .....	38
5.2.2.1	<i>Aspectos éticos</i> .....	40
5.2.3	Coleta de sangue .....	40
5.2.4	Sorologia para infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	40
5.2.5	Padronização dos títulos de anticorpos para o ensaio de citometria ...	41
5.2.6	Padronização da cinética tempo <i>versus</i> resposta .....	41
5.2.7	Marcação de superfície e citocinas intracitoplasmáticas.....	42
5.2.8	Aquisição e análise no citômetro de fluxo .....	45
5.2.8.1	<i>Aquisição e análise dos linfócitos T</i> .....	45
5.2.8.2	<i>Aquisição e análise dos monócitos</i> .....	46
5.2.9	Avaliação do perfil de citocinas em linfócitos CD4+ e CD8+ e monócitos CD14+ circulantes .....	47
5.2.10	Análises estatísticas .....	48

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>6.1</b>	<b>Avaliação do perfil protéico dos antígenos recombinantes</b> .....	49
<b>6.2</b>	<b>Avaliação da sorologia da população do estudo</b> .....	49
<b>6.3</b>	<b>Avaliação do hemograma da população do estudo</b> .....	49
<b>6.4</b>	<b>Padronização da cinética de tempo de cultivo <i>versus</i> resposta ...</b>	50
6.4.1	Padronização da cinética de tempo de cultivo <i>versus</i> resposta por linfócitos T CD4+ e CD8+ .....	50
6.4.2	Padronização da cinética de tempo de cultivo <i>versus</i> resposta por células CD14+ .....	53
<b>6.5</b>	<b>Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i></b> .....	55
6.5.1	Linfócitos T CD4+ após estímulo com CRA .....	56
6.5.2	Linfócitos T CD4+ após estímulo com FRA .....	57
6.5.3	Linfócitos T CD8+ após estímulo com CRA .....	59
6.5.4	Linfócitos T CD8+ após estímulo com FRA .....	61
<b>6.6</b>	<b>Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14+ após estimulação <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i></b> .....	62
6.6.1	Monócitos CD14+ após estímulo com CRA .....	62
6.6.2	Monócitos CD14+ após estímulo com FRA .....	63
<b>6.7</b>	<b>Avaliação da freqüência dos altos produtores de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i></b> .....	64
<b>6.8</b>	<b>Avaliação das células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas</b> .....	66
<b>6.9</b>	<b>Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas</b> .....	69
6.9.1	Correlações observadas em pacientes portadores da FC1.....	69
6.9.2	Correlações observadas em pacientes portadores da FC2 .....	70
6.9.3.	Correlações observadas em pacientes portadores da FI .....	71
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	73

7.1	<b>Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas após estimulação <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>74</b>
7.2	<b>Avaliação da frequência dos altos produtores de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo <i>in vitro</i> com os Ags-Recs CRA e FRA de <i>T. cruzi</i> .....</b>	<b>77</b>
7.3	<b>Avaliação das células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas .....</b>	<b>78</b>
7.4	<b>Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas .....</b>	<b>80</b>
8	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
9	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
	Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz .....	96
	Apêndice A - Características dos indivíduos portadores da doença de Chagas .....	97
	Apêndice B - Características dos indivíduos não-chagásicos .....	98
	Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente .....	99
	Apêndice D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Voluntário Controle .....	100
	Apêndice E - Formulário de Pesquisa .....	101
	Apêndice F - Artigo publicado .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

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

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

No entanto, apesar dos avanços alcançados no controle da transmissão natural da doença, a prevalência nos países da América Latina é de 12 milhões de casos e cerca de 28 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a doença (DIAS et al., 2008).

Com o controle mais freqüente da transmissão por hemotransfusão e transmissão vetorial, a transmissão transplacentária materno-fetal tem assumido posição mais relevante (DUARTE, 2003; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007). Na América Latina, a referida transmissão apresenta incidência variando de 0 a 11% (DUARTE, 2003), justificando a pesquisa da infecção pelo *T. cruzi* em gestantes nos exames pré-natais e em recém-nascidos filhos de mães chagásicas. Além disso, em nosso

país, várias ocorrências recentes de surtos por transmissão oral têm sido documentadas quase sempre se registrando a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; VALENTE et al., 1999; STEINDEL et al., 2008), levantando a preocupação sobre o ressurgimento da doença no Brasil nos próximos anos.

Ainda não existe uma quimioterapia segura para o tratamento da doença. Os tradicionais antiparasitários, nifurtimox e benzonidazol, são parcialmente eficazes apenas na fase aguda da infecção (CANÇADO, 1985), e o potencial de cura parasitológica é dependente do tipo de cepa albergada pelo hospedeiro (ANDRADE et al., 1985), podendo ainda provocar diversos efeitos colaterais, tais como eritema mobiliforme (farmacodermia), polineuropatias, queixas digestivas do tipo náuseas e vômitos, astenia, mal-estar geral, entre outros.

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

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

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

manifestações relacionadas ao envolvimento de órgãos como o coração, esôfago, cólon e/ou sistema nervoso, caracterizando as formas clínicas sintomáticas da doença de Chagas (PRATA, 2001).

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

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

A FI desperta grande interesse entre médicos e pesquisadores, pois é nesta fase que parece se determinar a evolução do paciente chagásico. Este aspecto da evolução da FI para as formas clínicas sintomáticas ainda é muito obscuro. Em razão dos questionamentos sobre a evolução do doente portador da FI, a comunidade médica ainda não possui uma conduta terapêutica universal.

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

Métodos propedêuticos não-invasivos e invasivos têm detectado alterações no coração e/ou no tubo digestivo de alguns dos pacientes chagásicos portadores da FI (OLIVEIRA JR., 1996). Porém ainda é questionável a avaliação da

evolução para as fases severas da doença, pois essas técnicas apenas mostram o estado de saúde atual do paciente, não tendo o poder de prever quando e para qual forma clínica crônica o indivíduo evoluirá.

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

### **1.3 Marcadores imunológicos na doença de Chagas**

Vários fatores como, por exemplo, a cepa do parasito e seu tropismo celular, bem como, *background* genético e a resposta imunológica formada pelo hospedeiro possuem papéis importantes na progressão da doença de Chagas (DUTRA; GOLLOB, 2008). Os aspectos imunológicos para entender o porquê da evolução dos pacientes para as distintas formas clínicas da doença são explicados por duas teorias principais: A primeira postula que a persistência do *T. cruzi* nos órgãos afetados é a maior causa da patologia, e conseqüentemente dano tissular (JONES et al., 1993; VAGO et al., 1996; FUENMAYOR et al., 2005) e; a segunda postula que processos autoimunes têm importância fundamental para a destruição dos tecidos (KIERSZENBAUM, 2005; CUNHA-NETO et al., 2006; HYLAND; ENGMAN, 2006).

Essas teorias podem estar associadas explicando a severidade das formas clínicas da doença. Desta forma, os estudos que busquem os fatores imunológicos que atuam na geração e manutenção da patologia em indivíduos que manifestam as formas severas são importantes para o entendimento da infecção chagásica. Diversos trabalhos têm demonstrado o envolvimento da imunidade celular em todas as formas clínicas da doença de Chagas. No entanto, a patogenia das lesões que levam às formas severas da doença ainda é desconhecida. Estudos sugerem que a resposta imune do indivíduo contra o parasito contribui para a

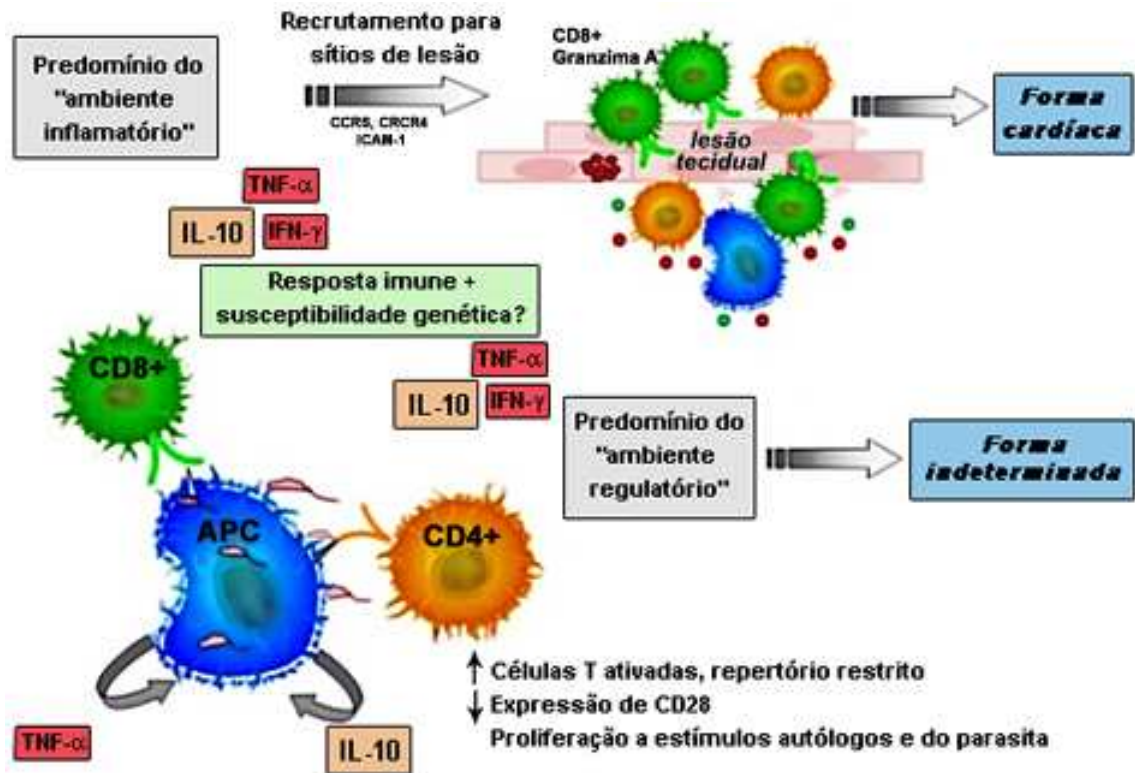


evolução da doença (DUTRA et al, 1994; GOMES et al, 2003; BARROS-MAZON et al, 2004).

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

Ensaio de proliferação celular, utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram realizados entre os pacientes chagásicos após estímulos com antígenos complexos de formas epimastigotas e tripomastigotas ou frações celulares do *T. cruzi*. Diferenças na intensidade da resposta proliferativa entre a FI e as formas sintomáticas foram reportadas, sugerindo que este padrão de reatividade imune poderia estar envolvido na patogenia das lesões tissulares na doença de Chagas (DE TITTO et al. 1985; CETRON et al. 1993; BARROS-MAZON et al. 2004). Porém, outros estudos não encontraram diferenças nas respostas proliferativas entre os pacientes chagásicos portadores da FI e aqueles portadores das formas sintomáticas (MORATO et al., 1986; GAZZINELLI et al., 1990; MICHAILOWSKY et al., 2003; LORENA et al., 2008).

Embora os trabalhos sobre a doença de Chagas humana sejam escassos, quando comparado àqueles que utilizam os modelos animais, vários estudos estão disponíveis na literatura sobre a resposta imune dos pacientes relacionando com as formas clínicas crônicas da doença. Com base nas observações encontradas acerca destes fatores imunológicos, a teoria que mais se aproxima da explicação sobre o desenvolvimento das formas clínicas crônicas cardíaca e indeterminada está representada na Figura 1. De forma geral, os indivíduos que permanecem assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitos na fase inicial da infecção e possuem mecanismos regulatórios que limitam o desenvolvimento da patologia. Por outro lado, indivíduos que desenvolvem a doença cardíaca, apesar de controlar a parasitemia, podem não serem capazes de elaborar uma resposta imunoregulatória eficiente, persistindo uma resposta inflamatória duradoura (DUTRA; GOLLOB, 2008; DUTRA et al., 2009).



**Figura 1:** Resposta imune nas formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.  
 Fonte: Menezes C. A. S.; Teixeira M. M.; DUTRA W. O., 2009.

Essa proposta de que o dano tissular poderia ser mais severo na ausência de mecanismos regulatórios que envolvessem as respostas imunológicas entusiasmou as pesquisas na área da imunologia básica. A ausência da molécula co-estimulatória CD28 em linfócitos T foi estudada por Menezes et al. (2004), mostrando que essas células, em indivíduos com a FI, têm papel de controlar a resposta inflamatória através da secreção de IL-10. Já em pacientes chagásicos portadores da FC a presença de linfócitos T CD28- pode estar relacionada com o dano cardíaco por secretarem altos níveis de TNF- $\alpha$ . Além disso, a molécula CTLA-4 também foi estudada entre os portadores chagásicos crônicos (SOUZA et al., 2007). A CTLA-4 reconhece o mesmo ligante que a molécula CD28, mas ao invés de levar à ativação celular, leva à modulação de respostas de células T. Souza et al. (2007), mostraram que pacientes portadores da FI apresentavam níveis de expresssão mais elevados desta molécula, principalmente em células T CD8, quando comparados aos portadores da FC.

Nessa mesma linha de investigação, foi demonstrado que pacientes chagásicos portadores da FI possuem células T regulatórias, que poderiam ser

capazes de controlar a atividade citotóxica deletéria por inibir a ativação de células T CD8+ HLA-DR+ (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Araújo et al. (2007), mostraram que portadores da FI apresentam altos níveis de células T regulatórias CD4+CD25<sup>high</sup> expressando FoxP3 e IL-10, comparado aos indivíduos da FC da doença. Além disso, Vitelli-Avelar et al. (2008), mostraram um padrão de citocinas regulatórias produzidas por células de sangue periférico de indivíduos portadores da FI, contrastando com um perfil de citocinas inflamatórias de pacientes portadores da FC.

Abordagens para a investigação de padrões de secreção de citocinas em PBMC de pacientes chagásicos têm sido realizadas utilizando antígenos complexos das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstraram que a IL-10 é a citocina secretada por pacientes portadores da FI. Já os pacientes chagásicos com doença cardíaca têm maiores níveis de IFN- $\gamma$  (BAHIA-OLIVEIRA et al, 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

Souza et al. (2004) quando expuseram células aderentes obtidas de PBMC a 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- $\alpha$ . Além disso, os elevados níveis de IFN- $\gamma$  estão correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução da FC. Por outro lado, a IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da FI contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, os autores sugerem que pacientes portadores da FI, que são capazes de manter baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-10, poderiam não desenvolver a doença cardíaca.

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

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

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

O uso de materiais definidos do parasito é claramente um requisito não apenas para o desenvolvimento de testes sorológicos e *screening* em bancos de sangue, mas também para a identificação de moléculas importantes na interação parasito-hospedeiro e nos estudos para o entendimento da imunopatologia da doença de Chagas (LORCA et al., 1992). Assim, antígenos específicos do *T. cruzi* poderiam ter bom desempenho na discriminação das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

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

A Tabela 1 resume os principais achados sobre a resposta imune celular com secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 estudada por vários grupos de pesquisas.

**Tabela 1.** Estudos realizados sobre a produção de IL-10 e IFN- $\gamma$  por pacientes chagásicos em resposta a antígenos de *T. cruzi*.

Referência	Antígenos	Método de detecção	Citocinas estudadas	
			IL-10	IFN- $\gamma$
Dutra et al., 1997	EPI e TRIPO	Quantificação por PCR	Maior produção em pacientes chagásicos (FC e FI) que em NI	Maior produção em pacientes chagásicos (FC e FI) que em NI
Corrêa-Oliveira et al., 1999	EPI e TRIPO	Citometria de fluxo	Produção maior em pacientes da FI que em pacientes da FC	Produção maior em pacientes da FC que em pacientes da FI
Cuna et al., 2000	Antígenos brutos e purificados de tripomastigotas	ELISA	Houve produção em pacientes chagásicos e em NI	Produção específica em pacientes chagásicos
Ribeirão et al., 2000	Trans-sialidase	ELISA	Não foi testada	Produção maior em pacientes da FC que em pacientes da FI
Abel et al., 2001	Proteína B13	ELISA	Não foi testada	Não houve diferença entre FC e FI. No entanto, pacientes FC tiveram maior frequência de produção que pacientes FI
Gomes et al., 2003	EPI e TRIPO	ELISA	Não houve diferença entre FC e FI	Não houve diferença entre FC e FI
Gomes et al., 2003	EPI e TRIPO	Citometria de fluxo	Alta secreção pelos pacientes FI	Alta Secreção pelos pacientes FC
Michailowsky et al., 2003	PFR	ELISA	Não foi detectada	Alta produção em pacientes FI e FC
Souza et al., 2004	Tripomastigotas vivos	Citometria de fluxo	Alta produção por pacientes da FI	Não foi testada
Laucella et al., 2004	Lisados e peptídeos de <i>T. cruzi</i>	ELISPOT	Não foi testada	Alta frequência de respostas elevadas em pacientes com a FC leve e baixa frequência em pacientes com a FC severa.
Crema et al., 2006	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	ELISA	Não houve diferença entre os grupos FC, FI e FD	Pacientes chagásicos (FD) tiveram maior produção que NI
Araújo et al., 2007	Tripomastigotas vivos	Citometria de fluxo	Alta secreção pelos pacientes FI	Não houve diferença entre FC e FI.
Vitelli-Avelar et al., 2008	TRIPO	Citometria de fluxo	Alta frequência de respostas elevadas em pacientes com a FI	Não houve diferença entre as frequências de produção entre FC e FI.

Nota: A classificação dos indivíduos portadores da formas clínicas crônicas cardíaca (FC), indeterminada (FI), digestiva (FD) e indivíduos não infectados (NI) não segue necessariamente os mesmos parâmetros. No entanto, foi adotada a mesma legenda deste trabalho para melhor compreensão dos resultados. Antígenos derivado da forma epimastigota (EPI), antígenos derivado da forma tripomastigota (TRIPO). *Polimerase Chain Reaction* (PCR), *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Paraflagellar Rod Proteins* (PRF)

#### 1.4 Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Em 1989, Lafaille et al. realizaram a clonagem e a caracterização de dois genes de *T. cruzi*. Estes genes codificam proteínas com estruturas onde há a repetição de um mesmo epítipo. Em função de suas estruturas e localização, esses antígenos foram denominados de CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen* ou antígeno citoplasmático repetitivo), presente nas formas epimastigotas e amastigotas, e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen* ou antígeno flagelar repetitivo), presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (LAFAILLE et al. 1989; KRIEGER et al., 1992). O perfil protéico dos antígenos realizado por Pereira et al. (2004) mostra que o CRA possui 50KDa e o FRA 30KDa (Figura 2).

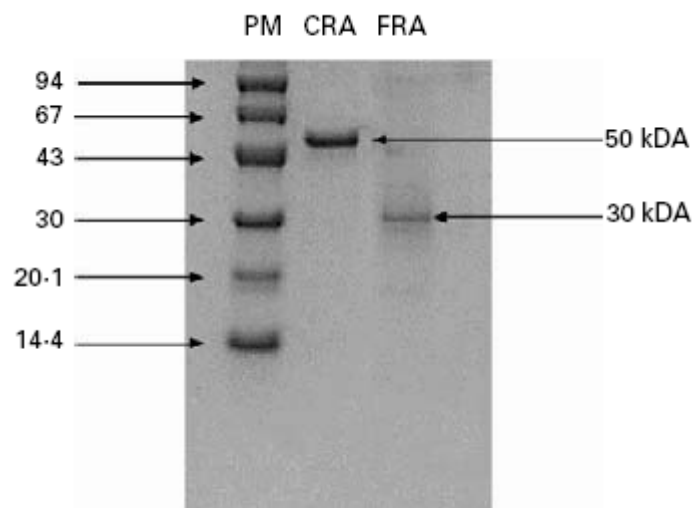


Figura 2: SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* purificados através de cromatografia de metal quelado, corado pela prata. PM = peso molecular em kilo Daltons (kDa) (fosforilase b -94, albumina sérica bovina - 67, ovalbumina - 43, anidrase carbônica - 30, inibidor trípico de soja - 20,1, e  $\alpha$ -lactalbumina - 14,4). Em cada poço foram depositados 5 $\mu$ g e 3 $\mu$ g de CRA e FRA, respectivamente. CRA= *Cytoplasmic Repetitive Antigen*; FRA= *Flagellar Repetitive Antigen* (PEREIRA et al., 2004).

Esses dois antígenos recombinantes (Ags-Recs) são produzidos na forma de *kit* para diagnóstico da infecção chagásica por Bio-Manguinhos/Fiocruz. O referido *kit* (Ensaio-Imunoenzimático-Recombinante-Chagas-Bio-Manguinhos, EIE-Rec) foi utilizado com sucesso no imunodiagnóstico da doença de Chagas apresentando alta especificidade e alta sensibilidade (GOLDENBERG, 1991;

KRIEGER et al., 1992; GOMES et al., 2001). O EIE-Rec também foi utilizado para avaliar a cura da doença de Chagas em pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte, que foram tratados na fase aguda da infecção (SILVA et al., 2002), onde os autores sugerem sua utilização para monitoramento do tratamento etiológico.

Além disso, um estudo comparativo do EIE-Rec e de um ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) convencional frente ao teste de hemaglutinação indireta, utilizado na ocasião em bancos de sangue, mostrou que o uso de dois ELISAs com preparações antigênicas diferentes é mais eficaz e poderia ser adotado para o *screening* de doadores de sangue (GADELHA et al., 2003). Ainda na área de diagnóstico, os Ags-Recs CRA e FRA foram avaliados para o desenvolvimento de um biosensor no departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife (DINIZ et al., 2003).

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

Além disso, em um estudo piloto (n=6) realizado por Pereira et al. (2002), CRA e FRA foram capazes de estimular PBMC de pacientes chagásicos a produzir determinado padrão de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas através de citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que CRA estimulou PBMC de pacientes com a FC a produzirem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e, FRA estimulou a produção de IL-10 por indivíduos portadores da FI da doença, sugerindo que os Ags-Recs poderiam identificar distintos perfis de citocinas entre os indivíduos chagásicos portadores das diferentes formas clínicas crônicas da doença. As respostas induzidas por esses antígenos mostram a importância dos mesmos em relação à discriminação das formas clínicas da doença. Além disso, o isotipo IgG2 anti-FRA foi capaz de diferenciar os pacientes portadores da FC dos pacientes da FI (VERÇOSA et al., 2007). Após um estudo prospectivo, esse isotipo poderia ser utilizado como marcador de evolução para a FC, possibilitando o redirecionamento da conduta terapêutica.

Desta forma, o potencial dos antígenos em avaliar marcadores de evolução da doença de Chagas foi estudado por Lorena et al. (2008), mostrando que apenas o CRA foi capaz de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por indivíduos chagásicos quando comparamos aos indivíduos não chagásicos. Porém, nenhuma diferença foi observada entre os indivíduos portadores da FC e da FI da doença (LORENA et al., 2008). As diferenças observadas entre nossos resultados e aqueles apresentados anteriormente podem ser devido à sensibilidade do ELISA de captura, e ao fato que, na avaliação das citocinas intracitoplasmáticas através de citometria de fluxo, realizado por Pereira et al. (2002), as citocinas são aprisionadas no interior do citoplasma. Os resultados encontrados por Lorena et al. (2008) poderiam estar relacionados aos baixos níveis das citocinas nas culturas e/ou ao consumo por receptores celulares, impedindo sua detecção através do ELISA (BAROJA; CEUPPENS, 1987). Deste modo, a detecção de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo é mais representativa (PRUSSIN; METCALFE, 1995).



## 2 JUSTIFICATIVA

Embora os mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas não estejam bem claros e, conseqüentemente, pouco foi estabelecido sobre a evolução dos indivíduos da FI para as formas clínicas severas da doença, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a resposta celular, sobretudo, as citocinas secretadas pelas células desses pacientes, visando à identificação de marcadores biológicos que pudessem auxiliar no prognóstico da doença de Chagas.

Um estudo longitudinal com seguimento do grupo de indivíduos da FI se faria necessário se este perfil diferenciado fosse devidamente confirmado. Desta forma, mecanismos capazes de bloquear ou amenizar o desenvolvimento das formas severas da doença, como por exemplo, estratégias de tratamento durante a fase crônica da doença, poderiam melhorar a qualidade vida dos indivíduos. Estratégias terapêuticas visando a regulação da resposta imune celular e da modulação de componentes inflamatórios, associado à droga anti-parasitária, possuem favoráveis expectativas para terapia dos indivíduos portadores da doença.

Apesar de não evidenciarmos uma relação entre a produção de citocinas detectadas no sobrenadante de cultura e as formas clínicas da doença de Chagas, através de ELISA de captura (LORENA et al., 2008), consideramos importante a resposta imune evidenciada pela produção de anticorpos específicos contra CRA ou FRA, por indivíduos chagásicos (GOLDENBERG et al., 1991; KRIEGER et al., 1992; GOMES et al., 2001; SILVA et al., 2002; GADELHA et al., 2003), e o potencial valor prognóstico dos Ags-Recs mostrado por Pereira et al. (2002) e Verçosa et al. (2007). Assim, nos propomos a avaliar a relação entre a produção de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

### 3 HIPÓTESE

Existe um perfil diferenciado de citocinas produzidas por células de pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com CRA ou FRA de *T. cruzi* entre as formas clínicas crônicas (FI e FC) da doença de Chagas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre a produção de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA ou FRA de *T. cruzi* e as formas clínicas crônicas (FI e FC) da doença de Chagas.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil das citocinas IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  produzidas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs nas formas clínicas crônicas (FI e FC) da doença de Chagas;
- b) Caracterizar fenotipicamente as populações celulares presentes no sangue periférico produtoras das citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs;
- c) Caracterizar a frequência dos indivíduos altos produtores de citocinas (acima da média global de produção obtida de todos os grupos) relacionando com a forma clínica crônica (FI e FC) da doença;
- d) Estabelecer a correlação existente entre as citocinas inflamatórias e as citocinas anti-inflamatórias com as formas clínicas crônicas estudadas (FI e FC).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

#### 5.1.1 Equipamentos

- Balanças analíticas: Hangping FA 1604; Ohaus Corporation modelo TS 400 D.
- Bomba à vácuo: modelo DOA-P104-BN, Gast Manufactur Ing; Index Corporation.
- Capela de fluxo laminar vertical: modelo MR 115, Núcleo equipamentos.
- Centrífuga refrigerada: modelo TJ-6R, Beckman Instruments, Inc.
- Citômetro de Fluxo: modelo FACSCalibur, Becton Dickson Immunocytometry Systems.
- Cuba para eletroforese: modelo SE250, Hoefer Scientific Struments.
- Estufa de CO<sub>2</sub>: Forma Scientific Inc.
- Fonte para eletroforese: modelo PS500X, Hoefer Scientific Instruments.
- Leitor de ELISA: modelo 3550, Biorad Laboratories.
- PHmetro: modelo Chemcadet pHmeter 5984-50, Cole Parmer Instruments.
- Slab gel Dryer: modelo SE 1160, Hoefer Scientific Instruments
- Vórtex: modelo M37615, tipo 37600 mixer, Thermolyne.

#### 5.1.2 Reagentes e produtos

- Ácido acético P. A. – VETEC Química fina
- Ácido cítrico P. A. – VETEC Química fina

- Ácido clorídrico – VETEC Química fina
- Acrilamida – SIGMA
- Albumina Bovina Sérica – SIGMA
- Anticorpos anti-CD4, CD8, CD14 e IL-10 – Caltag
- Anticorpos anti-IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  – BD Pharmingen
- Azida sódica – SIGMA
- Bis-acrilamida – SIGMA
- Brefeldina A – SIGMA
- Carbonato de sódio – ISO FAR
- Citrato de sódio P. A. – VETEC Química fina
- Cloreto de Sódio P.A. – ISO FAR
- Comassie Brilliant Blue R 250 – SIGMA
- Dietilenoglicol – VETEC Química fina
- Ditiotreitól – SIGMA
- EDTA – SIGMA
- Fito hemaglutinina – GIBCO <sup>TM</sup>/ Invitrogen Corporation
- Formaldeído 37% - VETEC Química fina
- Fosfato de sódio bibásico P.A. – Nuclear
- Fosfato de sódio monobásico P.A. - Reagentes analíticos Dinâmica
- Glicerol - VETEC Química fina
- Glutaraldeído – SIGMA
- Heparina 5.000 UI/mL – Hepamax-S®, Blausiegel®
- Meio RPMI 1640 – SIGMA
- Membranas filtrantes - Millipore Corporation
- Mercaptoetanol – SIGMA
- Metanol – Nuclear
- Nitrato de Prata - Reagen
- Penicilina/ Estreptomicina (100x) – SIGMA
- Persulfato de amônio - VETEC Química fina
- Kit sorológico: Imuno-ELISA Chagas - Wama Diagnóstica
- Kit sorológico: Chagas Test ELISA III - Bioschile Ingeniería Genética
- Dodecil Sulfato de Sódio - SIGMA

- Saponina – SIGMA
- Solução de Penicilina/ Estreptomicina – SIGMA
- Solução de fixação para células – BD Systems
- Soro bovino fetal – SIGMA
- Temed – SIGMA
- Tris – VETEC Química fina
- Tubos de cultura de polipropileno (17x100mm) 14mL – BD Systems
- Tubos de citometria de poliestireno (12x75mm) 5mL – BD Systems
- Tubos para coleta a vácuo 10mL- BD Systems ou VACUETTE

## 5.2 Métodos

### 5.2.1 Antígenos recombinantes de *T. cruzi*

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Departamento de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos/Fiocruz e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz. Todos os lotes de antígenos tiveram seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (LAEMLI, 1970) e coloração pela prata (MORRISSEY, 1981) para avaliar contaminação por proteínas bacterianas.

### 5.2.2 População do estudo

Trinta e nove indivíduos portadores das formas crônicas chagásicas foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC, na Universidade de Pernambuco – UPE. A inclusão dos indivíduos chagásicos foi baseada no preenchimento de 3 critérios: 1) sorologia

reagente para a infecção chagásica (dois testes com princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes); 2) realização de hemograma e dos exames clínicos para a caracterização das formas clínicas; e 3) não ter sido submetido ao tratamento etiológico.

Os pacientes foram atendidos e examinados por médicos que fazem parte do ambulatório após instruções detalhadas repassadas pela Dra. Glória Cavalcanti Melo (CRM 7942), Dra. Mariza Melo (CRM 7760), Dr. Abelardo Escarlão (CRM 11849) e Dra. Cristina Tavares (CRM 6061), médicos do HUOC/UPE e colaboradoras deste estudo, sobre a caracterização das formas clínicas. Para esta caracterização foram realizadas análises clínicas e laboratoriais: exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi* (ELISA e/ou hemaglutinação indireta e/ou imunofluorescência indireta), eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago (quando necessários).

Trinta e nove portadores da infecção chagásica foram selecionados (média de idade: 54,8 anos). Os pacientes portadores da FC (n=30) foram selecionados por apresentarem alteração no eletrocardiograma, ecocardiograma e/ou raio-X de tórax, ausência de dilatação do esôfago, ausência de queixas digestivas (engasgos e constipação) e sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*. Esses pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes portadores da FC sem dilatação cardíaca (FC1) (n= 15) e; pacientes portadores da FC apresentando dilatação cardíaca (FC2) (n= 15), quando no ecocardiograma o paciente apresentava fração de ejeção <55% e/ou aumento da área do ventrículo esquerdo.

Os pacientes portadores da FI (n=9) foram selecionados por não apresentarem quaisquer alterações cardíacas e digestivas, mas com sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*.

Um grupo de indivíduos voluntários não infectados (NI) (n=6) (média de idade: 52,5 anos) foi composto para comparação com indivíduos chagásicos através do preenchimento dos seguintes critérios: 1) ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; 2) nunca ter recebido transfusão de sangue; 3) ter apresentado teste sorológico não reagente para a doença de Chagas; e 4) ter realizado hemograma.

As características dos pacientes chagásicos e dos indivíduos não chagásicos que participaram desse estudo encontram-se presente nos Apêndices A e B, respectivamente.

#### 5.2.2.1 Aspectos éticos

As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz (Anexo A). Todos os indivíduos que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito: para pacientes chagásicos (Apêndice C) e para indivíduos voluntários NI (Apêndice D). Além disso, um formulário de pesquisa foi aplicado para os indivíduos portadores da doença de Chagas (Apêndice E).

#### 5.2.3 Coleta de sangue

De trinta a quarenta mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica para utilização nos ensaios de padronização cultura celular. Para o ensaio de cultura pós-padronização dez mililitros foram coletados. Cinco mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo EDTA para a realização do hemograma no Laboratório do HUOC/UPE. Além disso, cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo seco para obtenção de soro. Após retração do coágulo, os tubos foram centrifugados (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente) e alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20°C na Soroteca de Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz.

#### 5.2.4 Sorologia para infecção pelo *T. cruzi*



Foi utilizado um teste imunoenzimático 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.A e um teste imunoenzimático que utiliza antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Imuno-ELISA Chagas) proveniente de Wama Diagnóstica. Resultados reagentes foram considerados quando os dois testes apresentaram reatividade e não-reagentes, quando os dois testes não apresentaram reatividade (Ministério da Saúde, 2005).

### 5.2.5 Padronização dos títulos de anticorpos para o ensaio de citometria

Sangue de dois indivíduos saudáveis foi coletado e depositado em tubo de cultura e estimulado apenas com Fitohemaglutinina (PHA) (10µg/mL). A titulação dos anticorpos anti-CD4, CD8 e CD14 foi escolhida a partir de duas quantidades utilizadas (3 e 5µL) seguindo a orientação do fabricante. Para a titulação de anticorpos anti-citocinas foram realizadas duas diluições (1:30 e 1:50). Para a escolha das concentrações de anticorpos foi levado em consideração o desempenho da marcação e os mínimos custos. As características dos anticorpos utilizados neste estudo estão mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Características dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD4	53.5	Mouse IgG2a	FITC
CD8	3B5	Mouse IgG2a	FITC
CD14	Tük4	Mouse IgG2a	FITC
IL-4	MP4-25D2	Rat IgG1	PE
IL-10	JES3-19F1	Rat IgG2a	PE
IFN-γ	B27	Mouse IgG1	APC
TNF-α	Mab11	Mouse IgG1	APC

Nota: CD: *Cluster of differentiation*; IL: Interleucina; IFN-γ: Interferon gama; TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; APC: Alociocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina.

### 5.2.6 Padronização da cinética tempo *versus* resposta

Seis indivíduos portadores da FC e dois indivíduos não-infectados foram selecionados para estabelecer o tempo ótimo de cultivo para detecção das citocinas.

Um mililitro de sangue total foi depositado em tubo de cultura e estimulado com PHA (5µg/mL), com Ags-Recs CRA ou FRA (2µg/mL) ou sem nenhum estímulo (controle negativo). O volume final das culturas foi de 3mL. Os tubos foram incubados a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> por 1, 2, 3, 4 ou 5 dias para avaliação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+. Para a avaliação dos monócitos CD14+, o sangue foi incubado por 1, 2 e 3 dias. Nas 12 horas que antecederam o final do cultivo celular, a brefeldina (10µg/mL) foi adicionada aos tubos. A utilização da brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior celular, uma vez que esta substância interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do Complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991). A escolha do melhor tempo de cultivo foi baseada na obtenção das maiores médias de produção de citocinas intracitoplasmáticas pelas células estudadas (LORENA et al., 2009).

#### 5.2.7 Marcação de superfície e citocinas intracitoplasmáticas

Após período de incubação *in vitro*, as culturas foram tratadas com 220µL de EDTA (20mM) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, em todos os tubos, foram adicionados cerca de 8mL de PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% e azida sódica a 1%) e os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com auxílio de bomba à vácuo até o volume final de 1mL. Cem microlitros da suspensão celular foram depositados a tubos de poliestireno de 5mL devidamente identificados, contendo os anticorpos monoclonais anti-CD4 (3µL), anti-CD8 (3µL) e anti-CD14 (5µL), previamente titulados, por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os eritrócitos foram lisados através da adição de 2mL da solução de lise (2,85% de citrato de sódio, 30% de dietilenoglicol, 54% de formaldeído 37%, 0,04% de heparina 100.000 USP) diluída 1:10 em água destilada, no vórtex e incubados por 5 minutos ao abrigo da luz. Esta reação foi bloqueada pela adição de 1mL de PBS-Wash seguida de centrifugação (300 x g por 5 minutos à temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos foram lavados através da adição de 2mL de PBS-Wash. As células foram permeabilizadas através de 2mL da solução permeabilizadora (PBS-wash contendo saponina a 0,5%) por 5 minutos. Após

centrifugação (300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente), os sobrenadantes foram descartados e 20 $\mu$ L de anticorpos anti-citocinas conjugados a PE (IL-4 e IL-10) e a APC (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) diluídos (1:30) foram depositados aos tubos por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a marcação das citocinas intracitoplasmáticas, as células foram lavadas duas vezes (com 1mL de PBS-P e depois com 1mL de PBS-Wash) e fixadas através de 300 $\mu$ L de solução de fixação diluída 1:10 em água destilada. Os tubos foram estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo. O ensaio de marcação de superfície e das citocinas intracitoplasmáticas está representado na Figura 3.

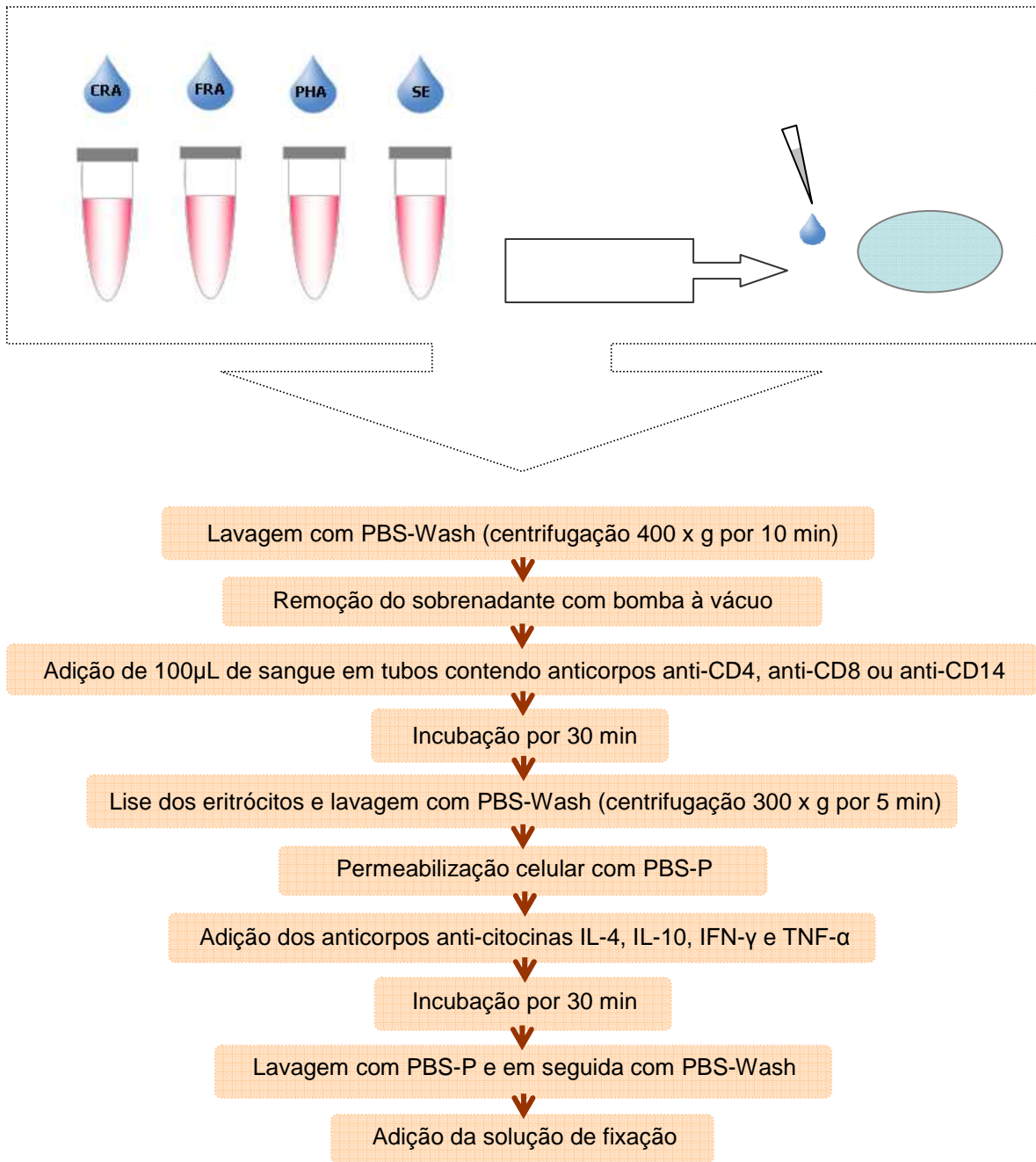


Figura 3: Esquema das principais etapas do ensaio de marcação de superfície e das citocinas intracitoplasmáticas. *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), Fitohemaglutinina (PHA) e sem estímulo (SE).

### 5.2.8 Aquisição e análise no citômetro de fluxo

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

As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo equipado com um sistema que detecta 4 cores (FACScalibur). O citômetro de fluxo permite a avaliação básica dos seguintes parâmetros: tamanho (*Forward Scatter-FSC*) e granulosidade das células (*Side Scatter-SSC*), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. Os dados adquiridos podem ser armazenados, e posteriormente, analisados utilizando o *software* CellQuestPro acoplado ao computador.

Diferentes estratégias para aquisição e análise da expressão das citocinas foram utilizadas de acordo com a população celular estudada.

#### 5.2.8.1 Aquisição e análise dos linfócitos T

A Figura 4 ilustra a sequência de etapas para análise dos linfócitos T. Os linfócitos foram adquiridos através da seleção desta população utilizando o dot plot FSC *versus* SSC (Figura 4A). Após a seleção da janela de interesse (R1), as subpopulações de linfócitos T e as citocinas intracitoplasmáticas foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência, onde foi possível estabelecer as modalidades FL1 (CD4 ou CD8-FITC) *versus* FL2 (IL-4-PE ou IL10-PE) e FL1 *versus* FL4 (TNF- $\alpha$ -APC ou IFN- $\gamma$ -APC) (Figura 4B). Foram coletados 20.000 eventos dentro da janela R1.

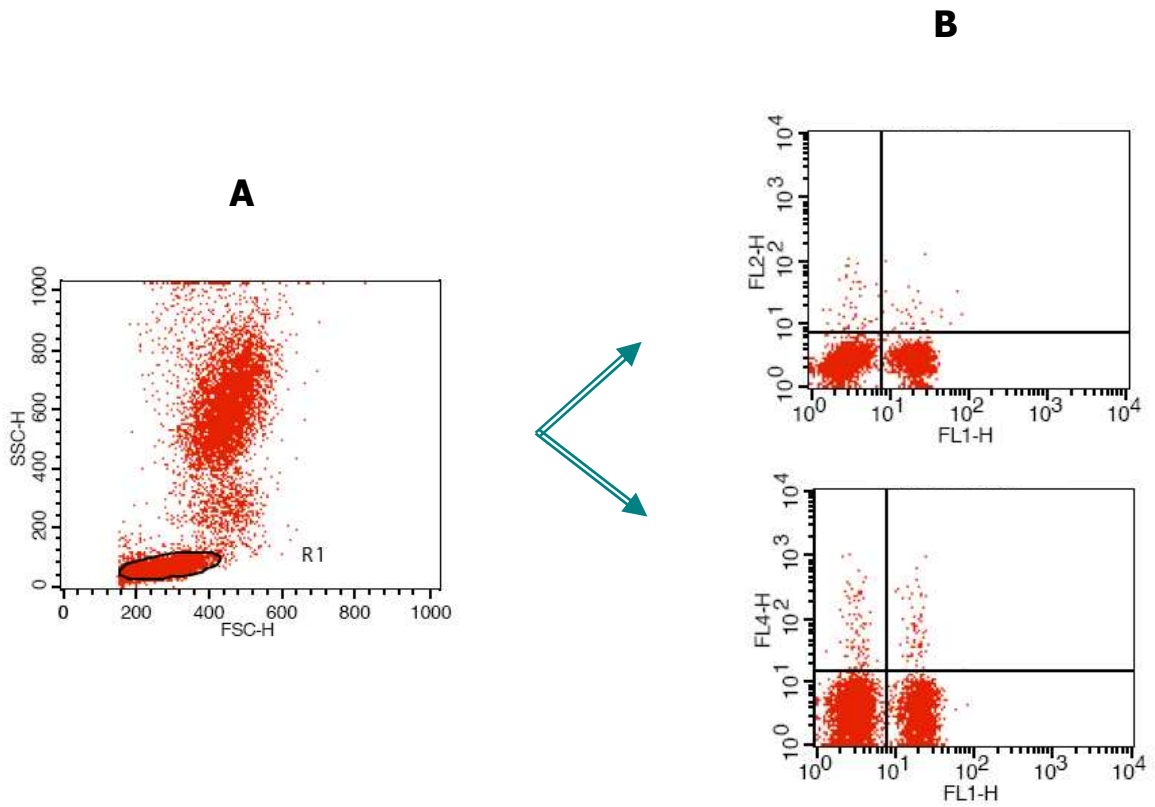


Figura 4: Aquisição e análise dos linfócitos.

### 5.2.8.2 Aquisição e análise dos monócitos

Os monócitos foram selecionados através da construção de gráfico FL1 (CD14-FITC) *versus* SSC. Após a seleção da janela de interesse (R2), foram construídos gráficos bidimensionais de distribuição puntual FL1 (CD14-FITC) *versus* FL2 (IL10-PE) e FL1 *versus* FL4 (TNF- $\alpha$ -APC ou IFN- $\gamma$ -APC). A sequência de etapas para aquisição e análise dos monócitos está representada na Figura 5. Foram coletados 500 eventos dentro da janela R2.

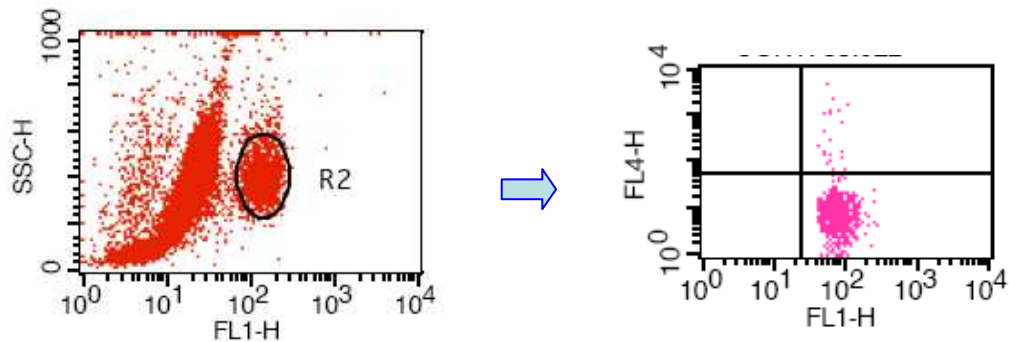


Figura 5: Aquisição e análise dos monócitos.

### 5.2.9 Avaliação do perfil de citocinas em linfócitos CD4+ e CD8+ e monócitos CD14+ circulantes

A percentagem de células positivas para as citocinas dentro de uma população foi obtida pelo quadrante estatístico fornecido pelo programa CellQuest e avaliada seguindo os seguintes passos:

1. A média da percentagem de células duplo-positivas (marcação de superfície e citocina intracitoplasmática) dos indivíduos foi comparada entre os grupos formados para verificar se existia diferença quanto à estimulação com CRA ou FRA;
2. A média global para cada subtipo celular *versus* citocina foi obtida pela média de produção pelos grupos FC1, FC2, FI e NI. Foi estabelecido o conceito de indivíduos “baixo” e “alto” produtores de citocinas segundo Vitelli-Avelar et al. (2008) utilizando a média global de produção de citocinas como um *cut-off* que segregou as duas categorias de indivíduos.
3. A média do percentual de produção de cada citocina foi avaliada intergrupos para verificar a principal célula produtora.
4. Foram realizadas correlações entre a produção das citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e das citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas.

### 5.2.10 Análises estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de medidas descritivas como: média e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk seguido do teste T-Student e quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar as médias de produção de citocinas entre os grupos e as células produtoras de citocinas intergrupos foi utilizado o teste para médias Anova seguido do teste de Tukey e quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, quando existiu diferença entre médias. Para avaliar os indivíduos “baixo” e “alto” produtores de citocinas realizamos o teste Qui-quadrado de proporções. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliação das correlações entre citocinas. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000, GraphPad Prism 5.0 e o Statistical R 2.9.0 (The R Project for Statistical Computing: [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).



## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Avaliação do perfil protéico dos antígenos recombinantes**

Para nos certificarmos da pureza dos Ags-Recs realizamos uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio seguida de coloração pela prata para investigarmos a presença de contaminações protéicas. Todos os lotes dos Ags-Recs CRA e FRA utilizados apresentaram-se bem conservados e não estavam contaminados por proteínas derivadas da *Escherichia coli*, bactéria onde os Ags-Recs são produzidos.

### **6.2 Avaliação da sorologia da população do estudo**

Para confirmarmos a sorologia acerca da infecção chagásica realizamos dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes em amostras de soro de todos os indivíduos envolvidos neste estudo. Todos os pacientes provenientes do HUOC/UPE apresentaram sorologias reagentes, confirmando os dados obtidos em seus prontuários. Além disso, a sorologia não-reagente também foi confirmada nos indivíduos NI.

### **6.3 Avaliação do hemograma da população do estudo**

Avaliamos o hemograma da população estudada para investigar diferenças discrepantes, sobretudo, na contagem de leucócitos (leucopenia/leucocitose), entre os indivíduos a fim de excluir aqueles com alterações graves na contagem diferencial das populações celulares. Assim, nenhum indivíduo foi excluído do estudo posteriormente.

## 6.4 Padronização da cinética de tempo de cultivo *versus* resposta

### 6.4.1 Padronização da cinética de tempo de cultivo *versus* resposta por linfócitos T CD4+ e CD8+

Para o estudo da cinética de produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos, os tempos de cultivo de 1 a 5 dias foram realizados. Já para o estudo das citocinas IL-4 e TNF- $\alpha$  foram realizados cultivos durante os períodos de 1 a 3 dias. As Figuras 6 e 7 mostram a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, respectivamente. Apesar de não evidenciarmos diferenças estatísticas significativas entre os tempos de cultivo avaliados, o 1º dia de cultura apresentou maiores médias, quando comparado aos demais períodos após estímulo com ambos os antígenos.

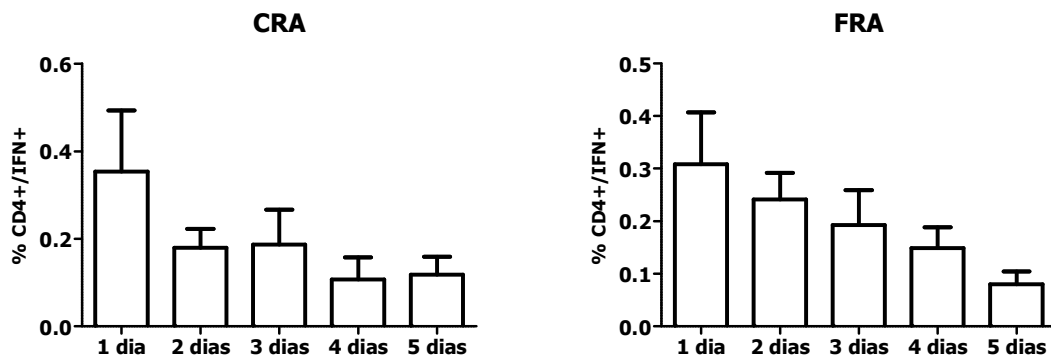


Figura 6: Cinética da detecção de IFN- $\gamma$  em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

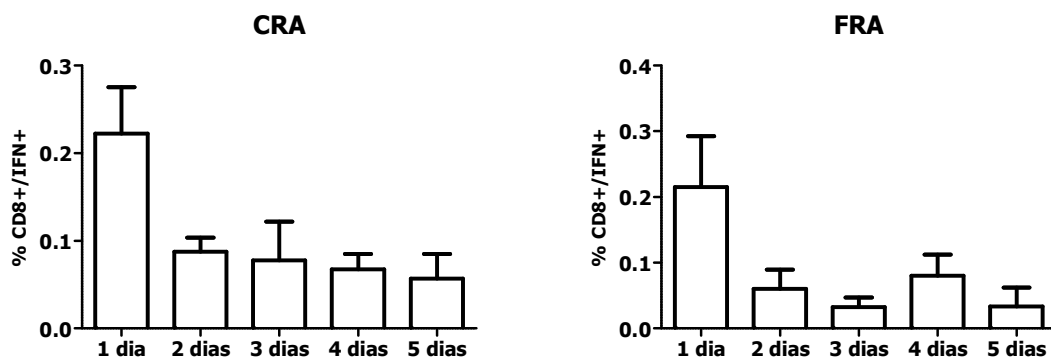


Figura 7: Cinética da detecção de IFN- $\gamma$  em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

O período de cultura de 1 dia também foi escolhido para a determinação da citocina IL-10 por células T CD4+ (Figura 8) e CD8+ (Figura 9), onde obtivemos maiores níveis da referida citocina, apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significativas entre os períodos avaliados.

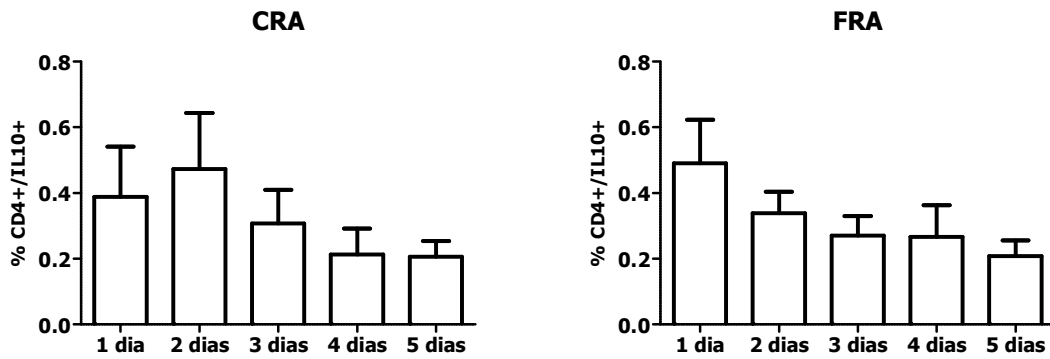


Figura 8: Cinética da detecção de IL-10 em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

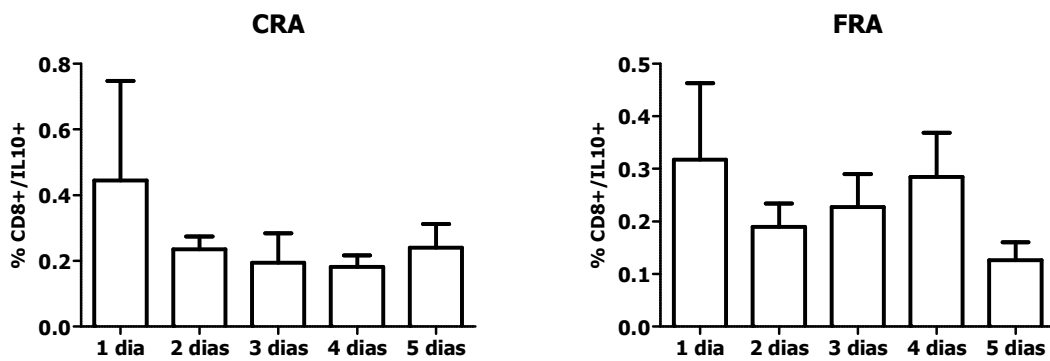


Figura 9: Cinética da detecção de IL-10 em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

Com relação à produção de TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD4+ (Figura 10) não observamos diferenças significativas entre os tempos estudados, tanto para o estímulo com CRA quanto com FRA.

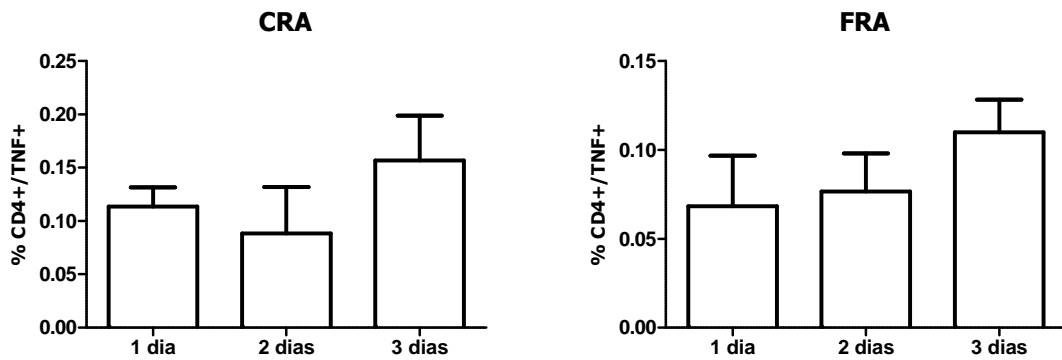


Figura 10: Cinética da detecção de TNF- $\alpha$  em células CD4+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

A produção desta citocina por linfócitos T CD8+ é mais elevada no 1º dia quando comparado aos demais tempos de cultivo pelos linfócitos T CD8+ após estímulo com FRA. Porém, nenhuma diferença foi observada após estímulo com CRA (Figura 11).

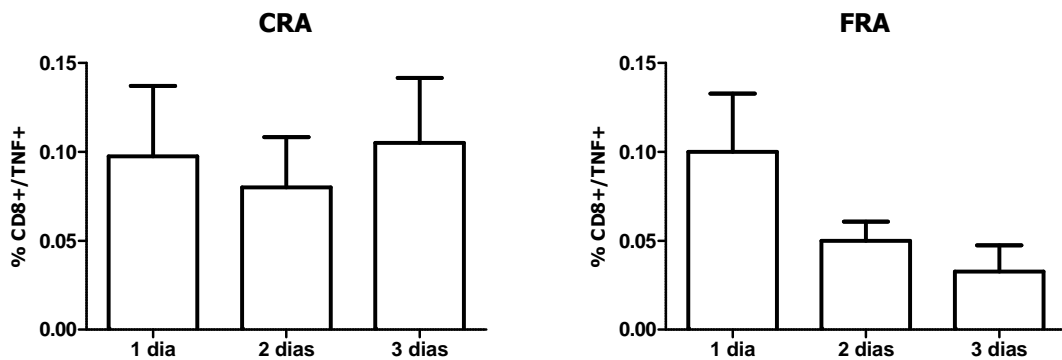


Figura 11: Cinética da detecção de TNF- $\alpha$  em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

Não observamos diferenças estatísticas significativas entre os diferentes períodos estudados para a detecção da IL-4 pelos linfócitos T CD4+ (Figura 12). No entanto, observamos a produção de IL-4, significativamente maior, por células T CD8+ após estímulo *in vitro* com CRA (Figura 13).

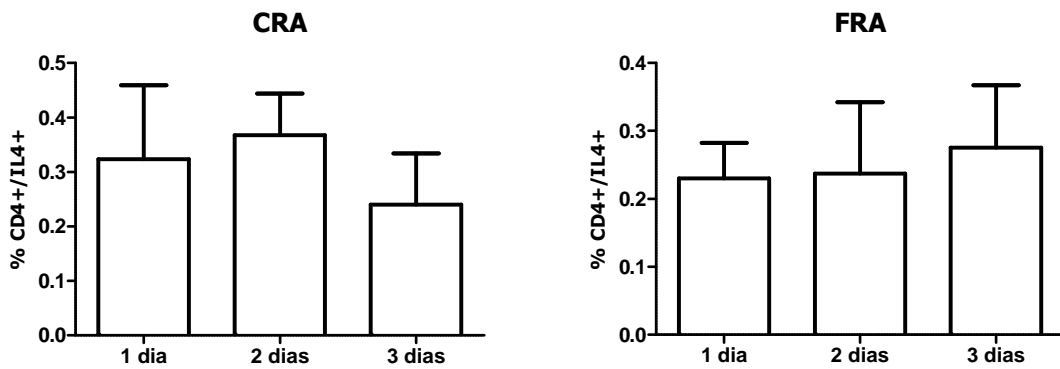


Figura 12: Cinética da detecção de IL-4 em células CD4+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

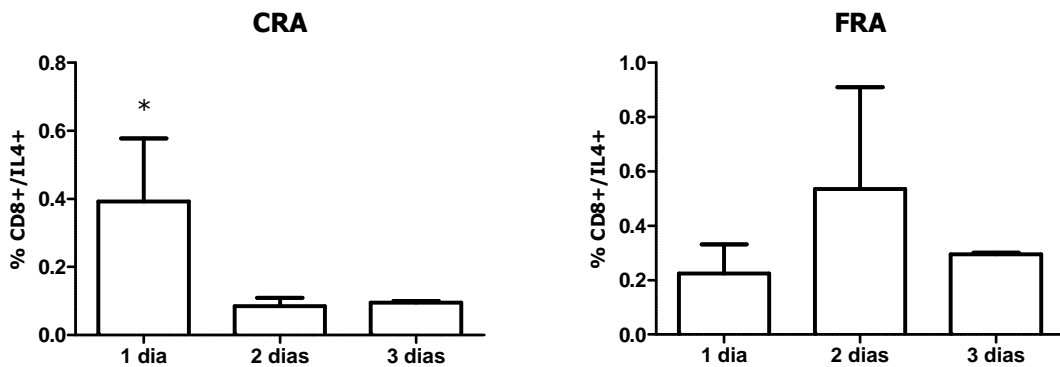


Figura 13: Cinética da detecção de IL-4 em células CD8+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA. As diferenças estatísticas estão representadas por \* com o valor de  $p \leq 0,05$ .

Para a escolha do tempo de cultivo foram levadas em consideração as maiores médias observadas para a produção das citocinas pelo sangue periférico de pacientes chagásicos, mesmo que não tenham sido encontradas diferenças estatísticas entre os tempos estudados. Nos casos onde as médias foram semelhantes entre os tempos estudados (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4), a escolha foi baseada na operacionalização dos experimentos. Diante disso, escolhemos o 1º dia de cultivo para a realização das culturas celulares.

#### 6.4.2 Padronização da cinética de tempo de cultivo *versus* resposta por células CD14+

Para o estudo das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  produzidas por células CD14+ realizamos o cultivo celular durante os períodos de 1 a 3 dias. A produção da citocina TNF- $\alpha$  é significativamente mais elevada no dia 1 de cultivo, após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs (Figura 14).

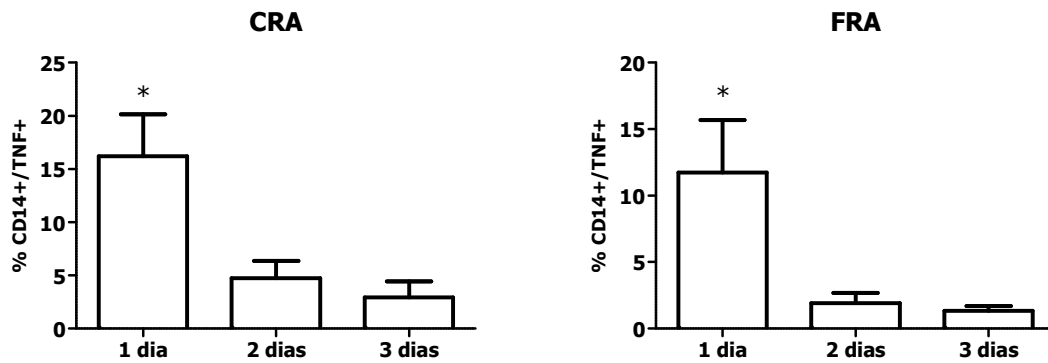


Figura 14: Cinética da detecção de TNF- $\alpha$  em células CD14+ durante os períodos de 1, 2, e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA. As diferenças estatísticas estão representadas por \* com o valor de  $p \leq 0,05$ .

Com relação à produção de IFN- $\gamma$  por células CD14+, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os dias de cultivo analisados, apesar de evidenciarmos maiores médias de produção desta citocina no 1º dia de cultivo (Figura 15).

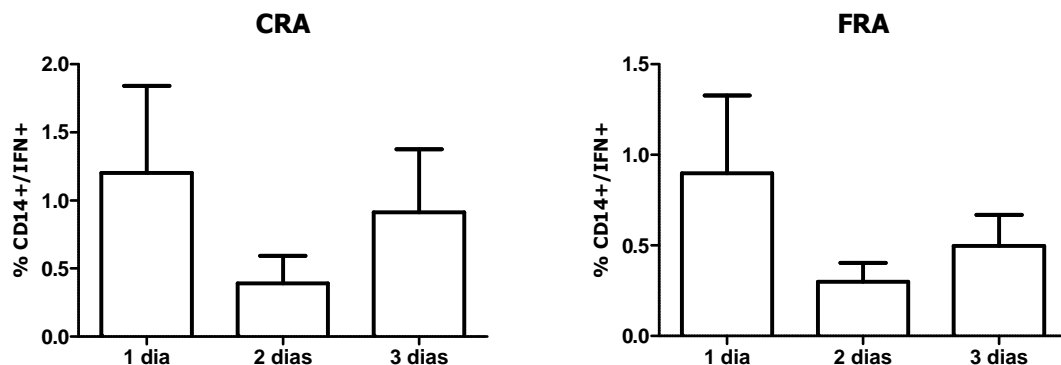


Figura 15: Cinética da detecção de IFN- $\gamma$  em células CD14+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA.

Observamos níveis mais elevados da produção de IL-10 por células CD14+ no 1º dia de cultivo após estímulo com CRA ou FRA, apesar de termos encontrado níveis significativamente maiores de IL-10 após 1 dia de cultivo, quando comparado aos demais períodos, após estímulo com FRA (Figura 16).

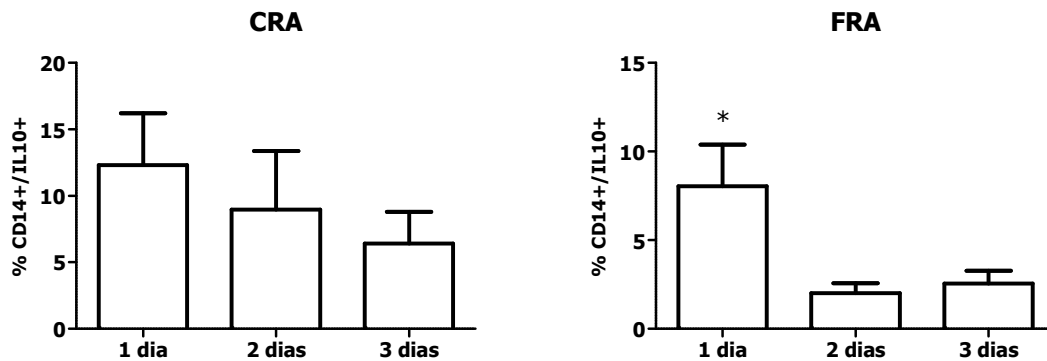


Figura 16: Cinética da detecção de IL-10 em células CD14+ durante os períodos de 1, 2 e 3 dias de cultivo *in vitro* na presença dos estímulos CRA ou FRA. As diferenças estatísticas estão representadas por \* com o valor de  $p \leq 0,05$ .

Diante desses dados, escolhemos o 1º dia de cultivo para a avaliação da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 por células T CD14+.

### 6.5 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T após estimulação *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*

Uma vez estabelecida a cinética tempo x resposta, a produção das citocinas intracitoplasmáticas foram avaliadas na população de linfócitos e monócitos após 1 dia de cultivo, como descrito na seção Material e Métodos.

A percentagem de células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas duplo-positivas foi avaliada entre os grupos de indivíduos estudados após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*.

### 6.5.1 Linfócitos T CD4+ após estímulo com CRA

A Figura 17 mostra os percentuais de células T CD4+ em culturas de sangue periférico de indivíduos infectados (portadores de distintas formas clínicas crônicas) e NI após estímulo com CRA.

A produção das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  após estímulo com CRA é verificada em todos os grupos de indivíduos chagásicos (Figuras 17A, 17B e 17D), quando comparada à do grupo de indivíduos NI. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos de indivíduos chagásicos, a não ser, entre indivíduos do grupo FC1, que apresentaram níveis mais elevados de IL-4 quando comparado aos indivíduos do grupo FC2 (Figura 17B).

Com relação à produção de IL-10, verificamos que o CRA, foi capaz de induzir níveis significativos do percentual CD4+/IL-10+ apenas nos indivíduos portadores da FI da doença (Figura 17C).



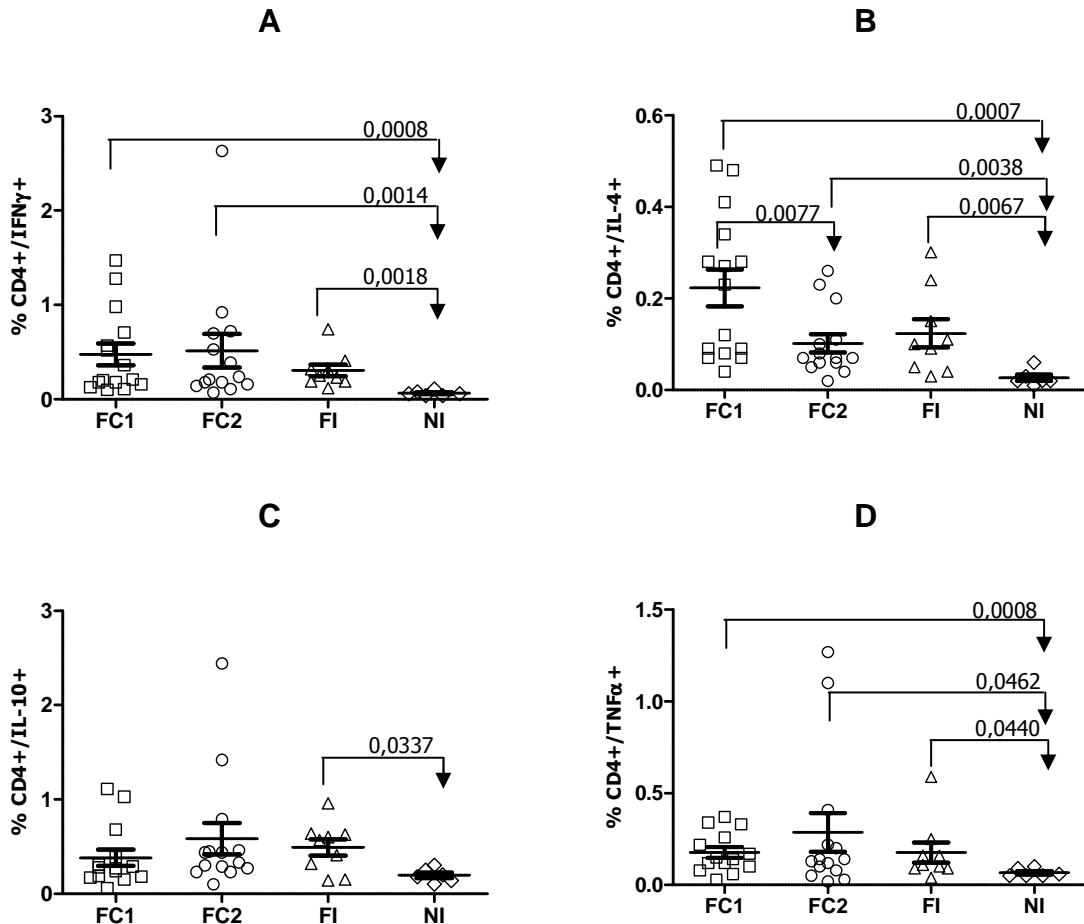


Figura 17: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por células T CD4+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.5.2 Linfócitos T CD4+ após estímulo com FRA

Ao avaliar a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo com FRA, não verificamos nenhuma diferença entre os grupos de indivíduos estudados (Figura 18A).

A Figura 18B, mostra que indivíduos chagásicos portadores da FC1, bem como da FI, possuem níveis significativos de IL-4, quando comparado aos indivíduos NI. No entanto, nenhuma produção significativa foi observada entre os indivíduos portadores da FC2.

A produção da IL-10 intracitoplasmática por células T CD4+ após estímulo com FRA é verificada por todos os grupos de indivíduos chagásicos (Figura 18C), quando comparado ao grupo de indivíduos NI.

Semelhante ao observado sobre o percentual de CD4+ produtoras de IL-10 por indivíduos da FI após estímulo com CRA (Figura 17C), também verificamos que apenas esses indivíduos foram capazes de produzir TNF- $\alpha$  após estímulo com FRA (Figura 18D).

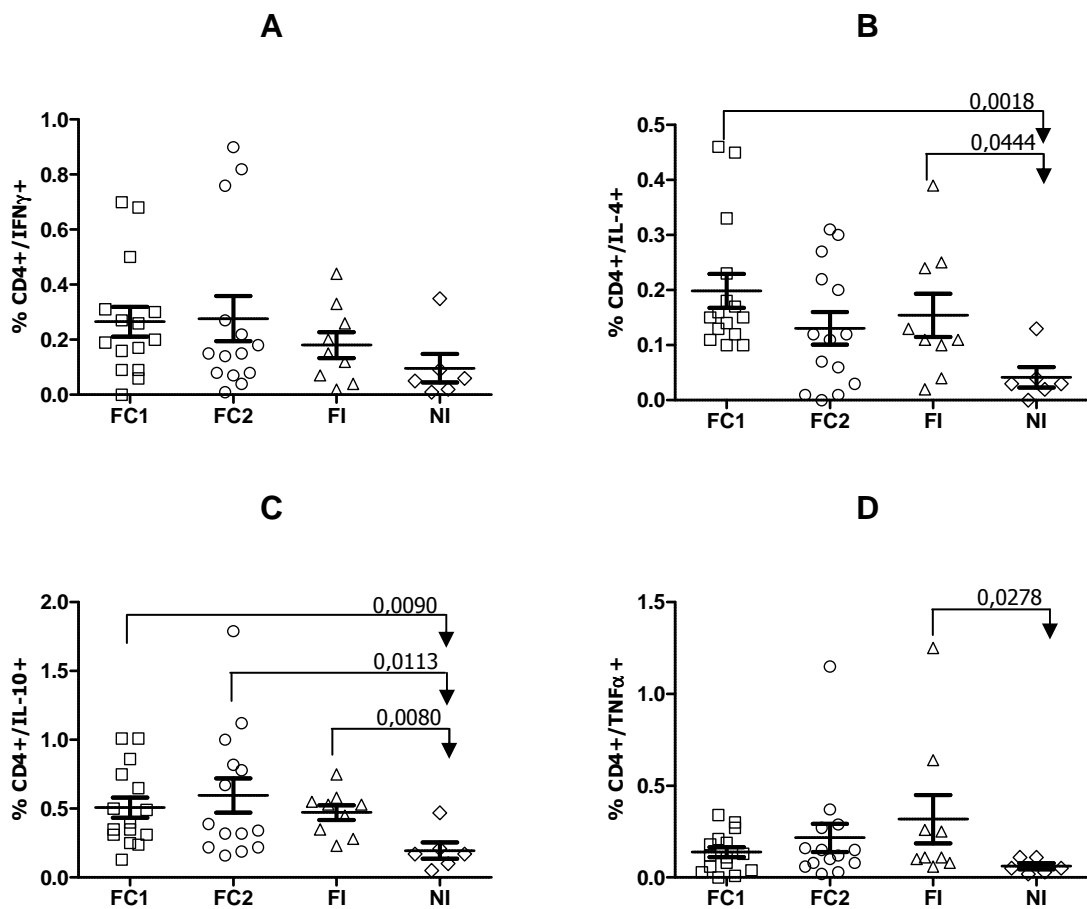


Figura 18: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por células T CD4+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.5.3 Linfócitos T CD8+ após estímulo com CRA

A produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8+, após estímulo com CRA, foi observada em todos os grupos de indivíduos estudados, quando comparado ao grupo de indivíduos NI (Figura 19A). Além disso, foi possível evidenciar que os indivíduos portadores da FC2 apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ , quando comparados aos indivíduos portadores da FC1 e FI.

Apenas os indivíduos portadores da FC1 produziram níveis significativos de IL-4, quando comparado aos indivíduos NI. Também foi possível verificar que os níveis desta citocina foram mais elevados, quando comparados aos níveis produzidos pelos indivíduos da FI (Figura 19B).

Apesar de termos evidenciado a produção de IL-10 por células T CD8+, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 19C).

A avaliação do percentual de produção de TNF- $\alpha$  mostra que a produção foi verificada por todos os grupos de indivíduos estudados, quando comparado ao grupo de indivíduos NI. Além disso, os indivíduos da FC2 puderam ser distinguidos dos indivíduos portadores da FC1 e FI (Figura 19D).

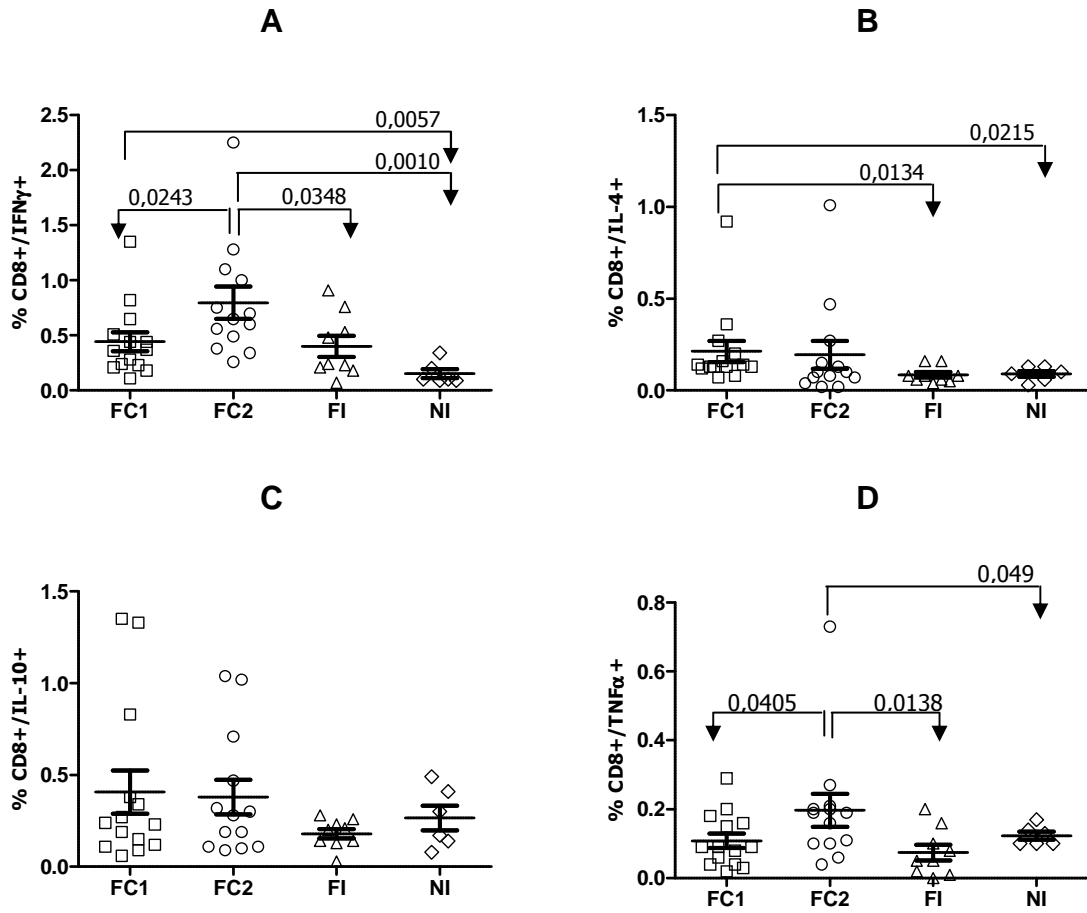


Figura 19: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por células T CD8+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.5.4 Linfócitos T CD8+ após estímulo com FRA

Não detectamos diferenças significativas de produção intracitoplasmática das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD8+ quando as células foram estimuladas com FRA (Figura 20).

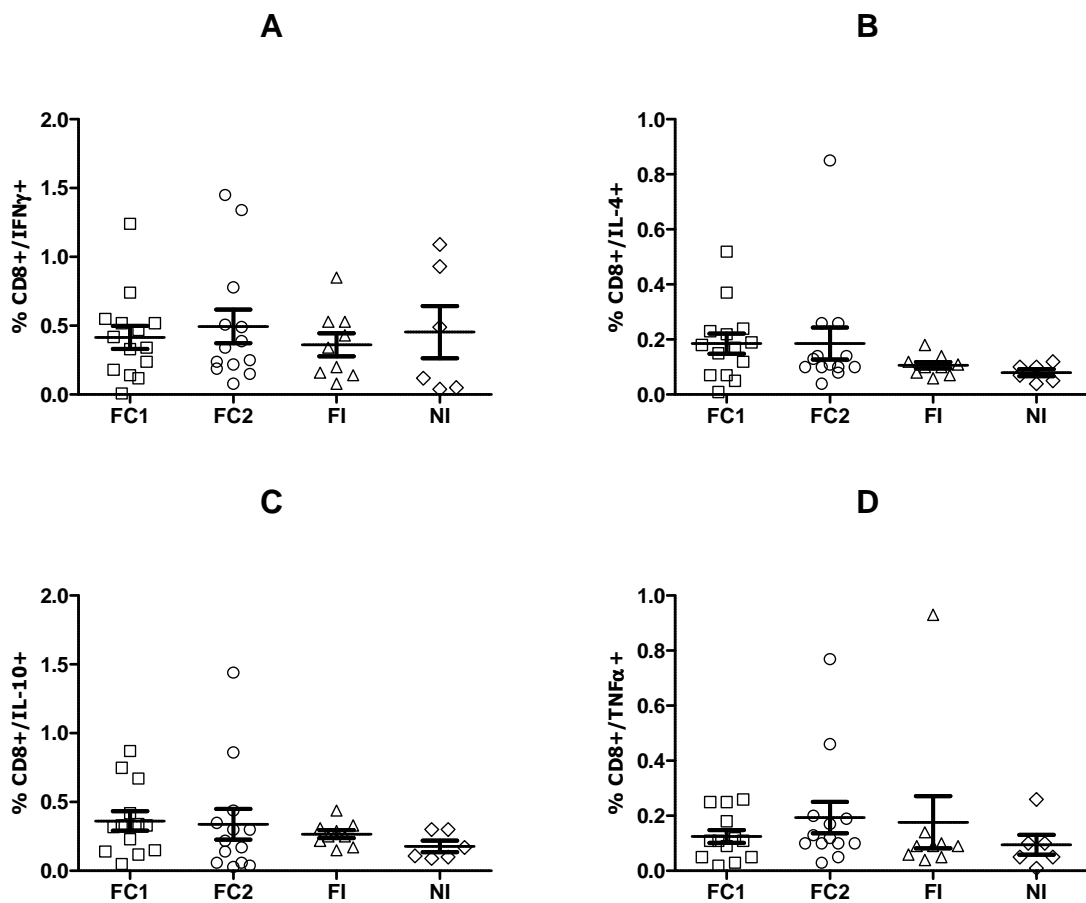


Figura 20: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por células T CD8+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

## 6.6 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por monócitos CD14+ após estimulação *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*

### 6.6.1 Monócitos CD14+ após estímulo com CRA

A produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  por células T CD14+, após estímulo com CRA foi observada por todos os grupos de indivíduos estudados, quando comparado ao grupo de indivíduos NI (Figura 21). No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos de pacientes chagásicos.

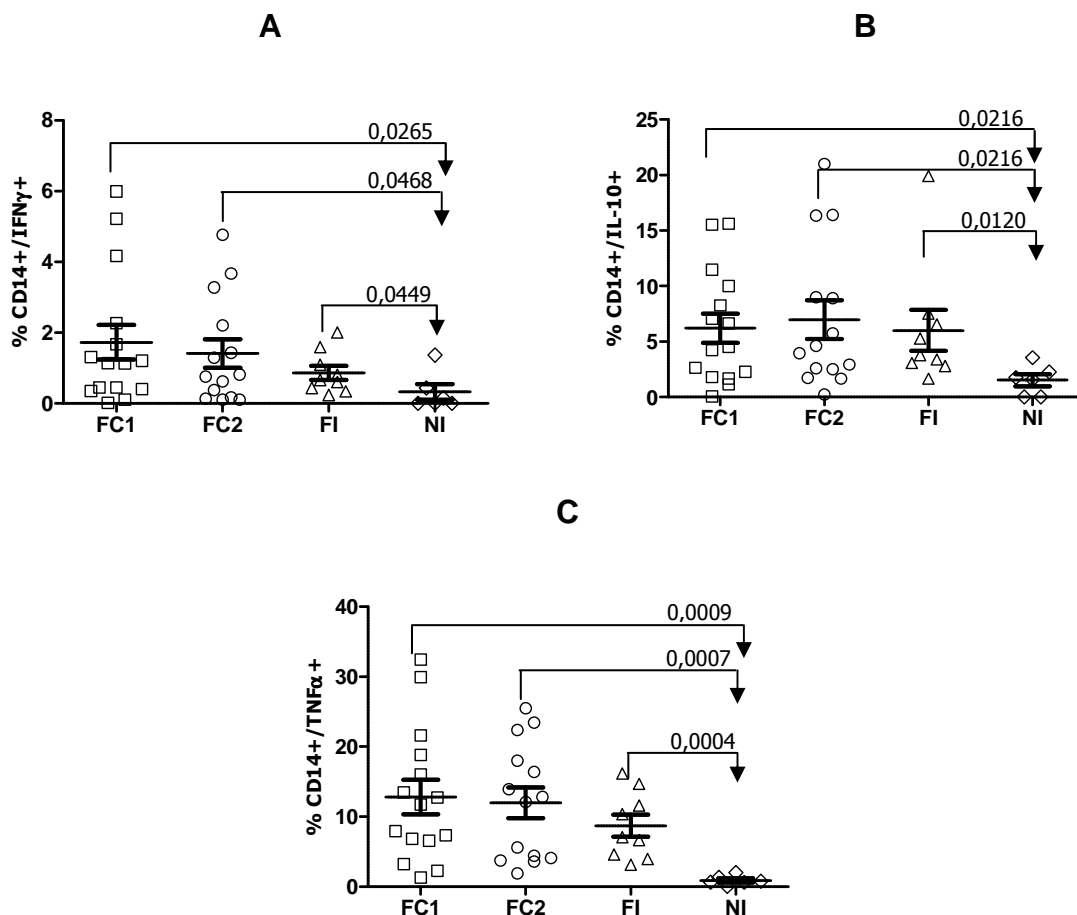


Figura 21: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B) e TNF- $\alpha$  (C) por monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante CRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.6.2 Monócitos CD14+ após estímulo com FRA

Com relação à produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , verificamos que FRA foi capaz de induzir a produção estatisticamente significativa destas citocinas por células T CD14+ de indivíduos chagásicos, quando comparados ao grupo de indivíduos NI (Figuras 22A e 22C). No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos de pacientes chagásicos. Com relação à produção de IL-10, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos estudados.

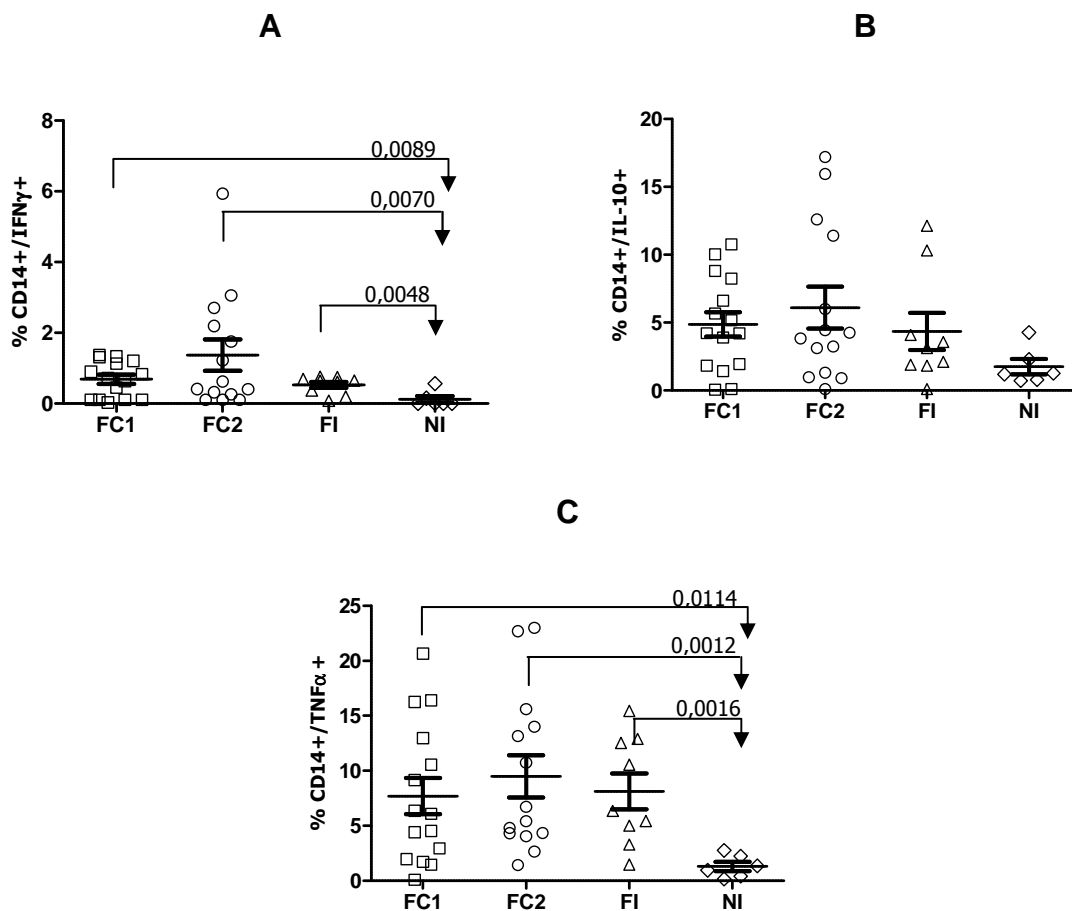


Figura 22: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B) e TNF- $\alpha$  (C) por monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos e indivíduos não infectados após estímulo com o antígeno recombinante FRA de *T. cruzi*. Pacientes portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) (n=15), da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) (n=15) e forma clínica indeterminada (FI) (n=9) e indivíduos não infectados (NI) (n=6). As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

## **6.7 Avaliação da frequência dos altos produtores de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi***

Aplicamos o conceito de “altos” e “baixos” produtores de citocinas a partir do estabelecimento de um *cut-off* obtido através da média global (média da produção de todos os indivíduos estudados) da produção de citocina e investigamos a existência da frequência de produção de citocinas entre os grupos estudados.

A Tabela 3 mostra a frequência dos altos produtores de citocinas após estímulo *in vitro* com CRA. A maioria (60%) dos pacientes chagásicos portadores da FC2 foram considerados altos produtores de TNF- $\alpha$  por células CD14+ quando comparado aos indivíduos NI. O mesmo foi observado quando avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8+. Um fato interessante, é que 55,56% dos indivíduos chagásicos portadores da FI apresentaram-se altos produtores de IL-10 produzidas por células T CD4+. No entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi observada (Tabela 3).



Tabela 3: Frequência dos indivíduos altos produtores de citocinas baseada na média global após estímulo com CRA.

% Células/Citocinas	Média Global Cut-off	Altos produtores de citocinas (%)			
		FC1	FC2	FI	NI
<b>% de células CD14+</b>					
IL-10	5,68 (0,01 – 21,00)	46,67	33,33	33,33	0,00
IFN- $\gamma$ +	1,23 (0,01 – 5,99)	40,00	33,33	22,22	16,67
TNF- $\alpha$ +	10,60 (0,61 – 33,40)	53,33	60,00 <sup>a</sup>	33,33	0,00
<b>% de Linfócitos T CD4+</b>					
IL-4+	0,13 (0,01 – 0,49)	53,33	20,00	33,33	0,00
IL-10+	0,45 (0,06 – 2,44)	14,29	40,00	55,56	0,00
IFN- $\gamma$ +	0,39 (0,04 – 2,63)	40,00	40,00	22,22	0,00
TNF- $\alpha$ +	0,20 (0,02 – 1,27)	35,71	33,33	22,22	0,00
<b>% de Linfócitos T CD8+</b>					
IL-4+	0,16 (0,02 – 1,01)	35,71	21,43	22,22	0,00
IL-10+	0,32 (0,07 – 1,35)	35,71	35,71	0,00	33,33
IFN- $\gamma$ +	0,49 (0,07 – 2,25)	28,57	60,00 <sup>a</sup>	33,33	0,00
TNF- $\alpha$ +	0,13 (0,02 – 0,73)	35,71	57,14	22,22	50,00

Nota: Os dados são expressos como a percentagem dos indivíduos que apresentam percentagem de células produtoras de citocinas igual ou maior que a média global (cut-off) calculada utilizando os dados de todos os grupos dentro das populações celulares avaliadas. Forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1), cardíaca com dilatação (FC2), indeterminada (FI) e indivíduos não infectados (NI). As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pela letra 'a' para a comparação com NI.

Com relação à frequência dos indivíduos produtores de citocinas, após estímulo *in vitro* com FRA, observamos que a frequência de indivíduos chagásicos altos produtores de IFN- $\gamma$  por células CD14+ são aqueles portadores das formas FC1 e FC2, quando comparados aos indivíduos portadores da FI. Além disso, 64,29% dos pacientes chagásicos portadores da FC1 apresentaram níveis mais elevados (acima do *cut-off*) de linfócitos T CD8+ produtores de IL-4, quando comparado aos demais grupos de indivíduos (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência dos indivíduos altos produtores de citocinas baseada na média global após estímulo com FRA.

% Células/Citocinas	Média Global Cut-off	Altos produtores de citocinas (%)			
		FC1	FC2	FI	NI
<b>% de células CD14+</b>					
IL-10+	4,66 (0,10 – 17,19)	46,67	33,33	22,22	0,00
IFN- $\gamma$ +	0,80 (0,01 – 5,93)	46,67 <sup>b</sup>	46,67 <sup>b</sup>	0,00	0,00
TNF- $\alpha$ +	7,45 (0,15 – 23,00)	40,00	40,00	44,44	0,00
<b>% de Linfócitos T CD4+</b>					
IL-4+	0,13 (0,02 – 0,46)	73,33	33,33	26,67	16,67
IL-10+	0,49 (0,05 – 1,79)	46,67	46,67	55,56	0,00
IFN- $\gamma$ +	0,23 (0,01 – 0,90)	46,67	26,67	33,33	16,67
TNF- $\alpha$ +	0,19 (0,02 – 1,15)	26,67	26,67	44,44	0,00
<b>% de Linfócitos T CD8+</b>					
IL-4+	0,15 (0,04 – 0,52)	64,29 <sup>a, b, c</sup>	20,00	11,11	0,00
IL-10+	0,30 (0,05 – 1,44)	61,54	42,86	33,33	16,67
IFN- $\gamma$ +	0,43 (0,01 – 1,45)	42,86	35,71	44,44	50,00
TNF- $\alpha$ +	0,15 (0,01 – 0,93)	30,77	35,71	11,11	16,67

Nota: Os dados são expressos como a porcentagem dos indivíduos que apresentam porcentagem de células produtoras de citocinas igual ou maior que a média global (cut-off) calculada utilizando os dados de todos os grupos dentro das populações celulares avaliadas. Forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1), cardíaca com dilatação (FC2), indeterminada (FI) e indivíduos não infectados (NI). As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras 'a', 'b' e 'c' para a comparação com NI, FI e FC2, respectivamente.

## 6.8 Avaliação das células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas

A média do percentual de produção de cada citocina foi avaliada intergrupos para verificar a principal célula produtora de citocinas intracitoplasmáticas.

Avaliando a produção de citocinas no grupo de pacientes chagásicos portadores da FC1, verificamos que as principais células produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , após estímulo com CRA, foram os monócitos (CD14+) (Figuras 23A, 23C e 23D). O mesmo fato foi observado após estímulo com FRA, com exceção da produção de IL-10, que apesar de as células CD14+ produzirem maiores níveis desta citocina, nenhuma diferença estatística significativa foi observada (Figura 23C). Além disso, quando avaliamos a produção de IL-4, verificamos que tanto

linfócitos T CD4+, quanto linfócitos T CD8+ são responsáveis pela produção desta citocina (Figura 23B).

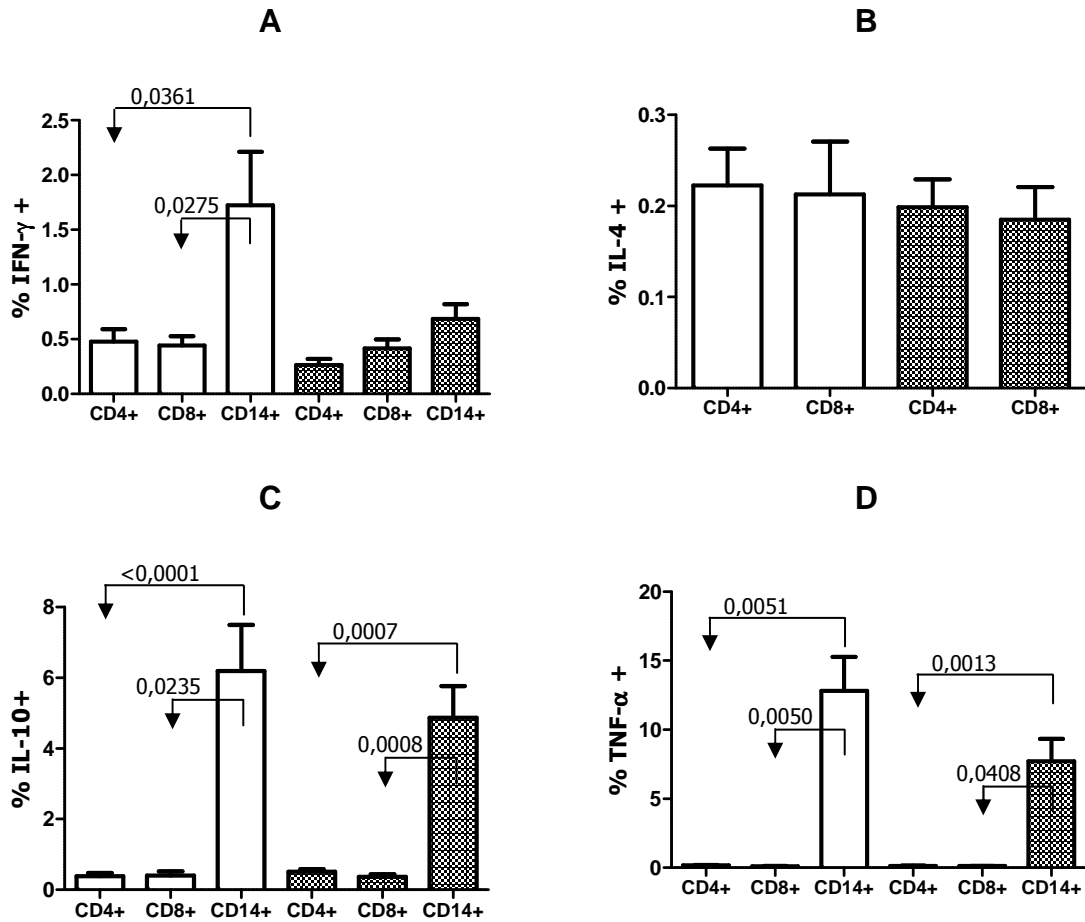


Figura 23: Detecção das citocinas IFN-γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF-α (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação (FC1) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de *T. cruzi*. As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

Com relação à produção de citocinas no grupo de pacientes chagásicos portadores da FC2, verificamos que as principais células produtoras de IFN-γ, IL-10 e TNF-α, após estímulo com FRA, foram os monócitos (CD14+) (Figura 24A, 24C e 24D). Porém, após estímulo com CRA, apesar de verificarmos níveis maiores de produção de IFN-γ por células CD14+ nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 24A). Além disso, quando avaliamos a produção de IL-4 pelos pacientes portadores da FC2, verificamos que tanto linfócitos T CD4+, quanto linfócitos T CD8+ são responsáveis pela produção desta citocina (Figura 24B).

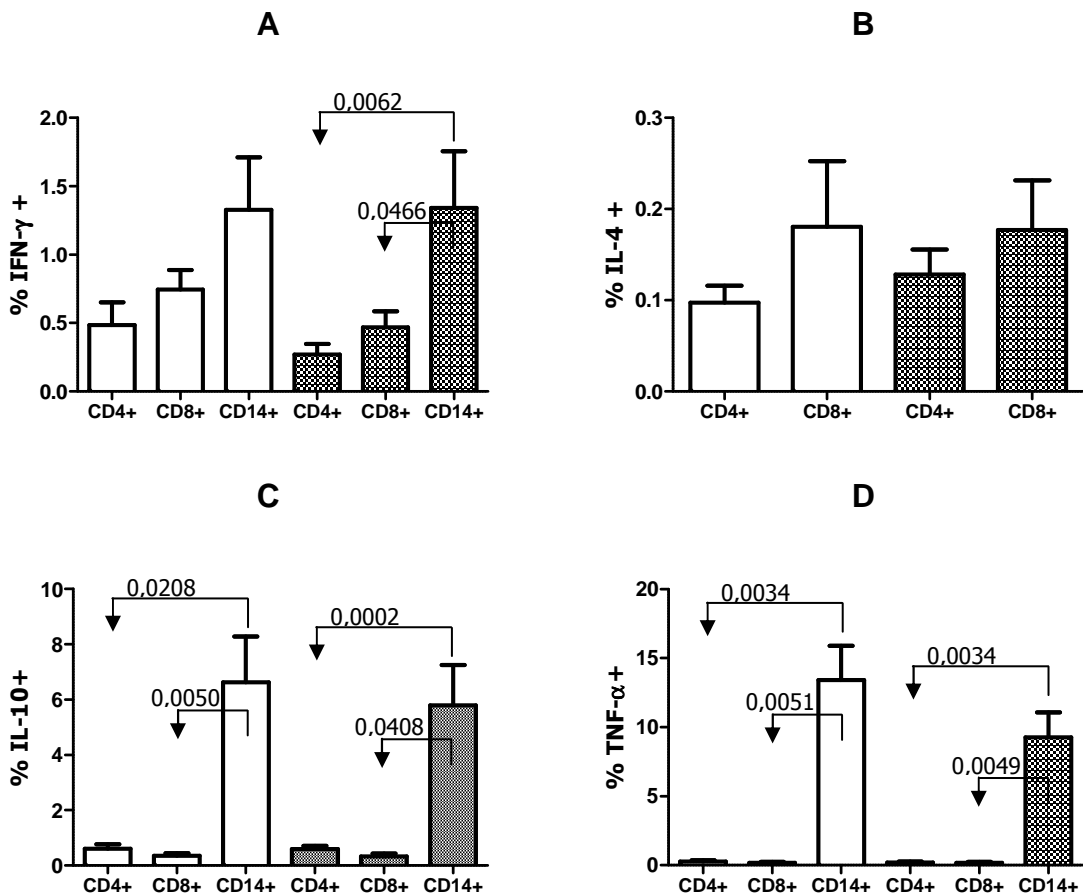


Figura 24: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica cardíaca com dilatação (FC2) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de *T. cruzi*. As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

Quando analisamos a produção de citocinas por indivíduos da FI, verificamos que as células responsáveis pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são as células CD14+ após estímulo com ambos os antígenos (Figura 25A e 25D). O mesmo foi observado quando avaliamos a produção de IL-10, onde verificamos que os monócitos foram as principais células produtoras, seguidos dos linfócitos T CD4+ e T CD8+, respectivamente (Figura 25C). Como visto nos grupos de pacientes portadores da FC1 e FC2, a IL-4 é produzida por ambos os linfócitos T CD4+ e CD8+ após estímulo com os Ags-Recs (Figura 25B).

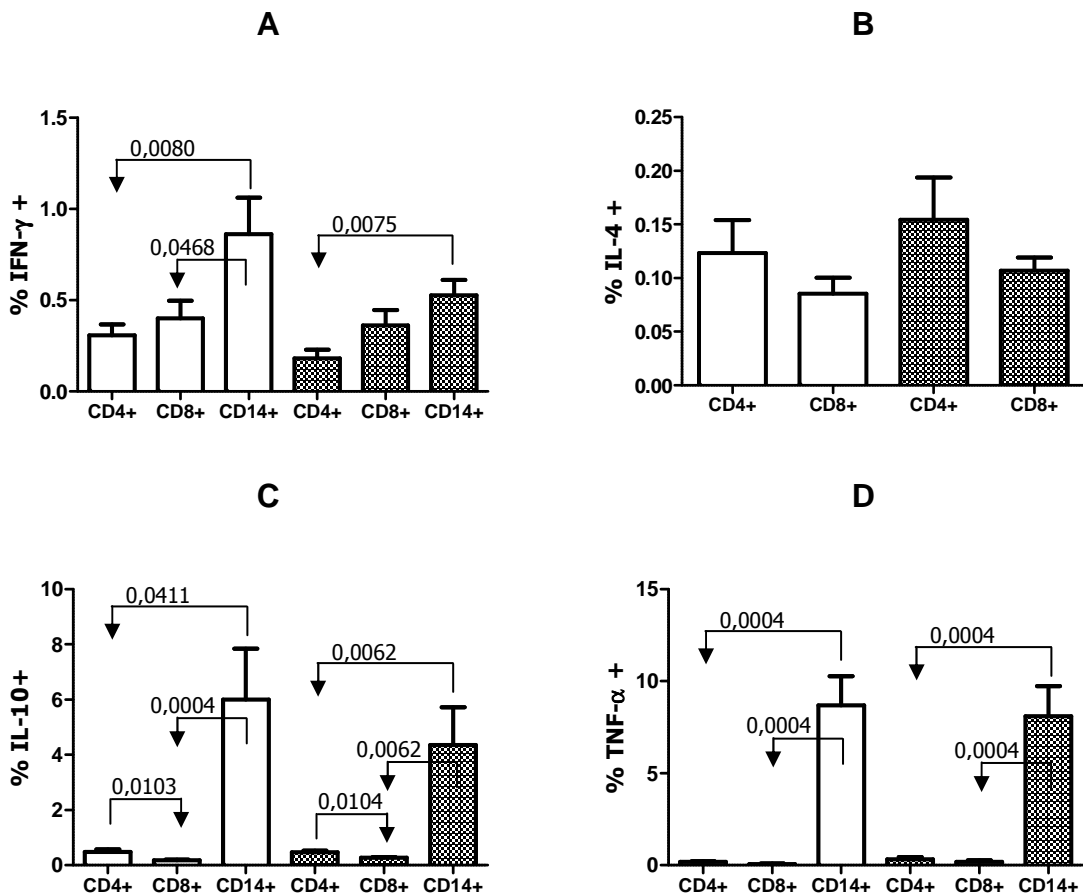


Figura 25: Detecção das citocinas IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e TNF- $\alpha$  (D) por linfócitos T CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ de sangue periférico de pacientes chagásicos portadores da forma clínica indeterminada (FI) após estímulo com os antígenos recombinantes CRA (□) e FRA (■) de *T. cruzi*. As barras horizontais representam a média aritmética e o erro padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas na figura com o valor de  $p \leq 0,05$ .

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

Investigamos possíveis correlações positivas ou negativas entre as citocinas intracitoplasmáticas produzidas pelas células T e monócitos de pacientes chagásicos nas diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

#### 6.9.1 Correlações observadas em pacientes portadores da FC1

A Tabela 5 expressa as correlações entre as citocinas produzidas pelas células estudadas obtidas a partir do estímulo *in vitro* com CRA ou FRA de *T. cruzi*. Observamos uma correlação positiva de 0,82 e 0,58, entre as citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  após estímulo com FRA, em células T CD8+ e CD14+, respectivamente.

Por outro lado, ao avaliarmos a correlação entre as citocinas IL-4 e IL-10 produzidas por linfócitos T CD8+, verificamos que esses pacientes apresentaram uma correlação positiva de 70% após estímulo com CRA. No entanto, verificamos uma correlação positiva (80%) entre IL-10 e TNF- $\alpha$  produzidas por células CD14+, após estímulo com CRA.

Tabela 5: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da FC1.

Coeficiente de correlação						
CD4+	IFN $\gamma$ x IL10	IFN $\gamma$ x TNF $\alpha$	IL10 x TNF $\alpha$	IFN $\gamma$ x IL4	IL10 x IL4	IL4 x TNF $\alpha$
CRA	0,13	-0,10	-0,21	0,31	0,18	0,32
FRA	-0,10	-0,08	-0,23	0,20	-0,24	0,30
CD8+						
CRA	-0,09	0,48	-0,09	-0,21	0,70*	0,07
FRA	0,08	0,82*	-0,05	0,21	0,33	0,38
CD14+						
CRA	0,34	0,00	0,80*			
FRA	0,41	0,58*	0,31			

Nota: *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), Forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1), cardíaca com dilatação (FC2) e indeterminada (FI). O \* representa a diferença estatística com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.9.2 Correlações observadas em pacientes portadores da FC2

A análise da correlação entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas por linfócitos T CD4+, CD8+ e CD14+, verificamos as correlações positivas de 0,62, 0,66 e 0,69 respectivamente, entre pacientes portadores da FC2, após estímulo com FRA, indicando uma forte resposta Th1. Interessantemente, neste grupo de pacientes,

observamos um padrão misto de produção de citocinas por todas as células estudadas (Tabela 6).

Tabela 6: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da FC2.

Coeficiente de correlação						
CD4+	IFN $\gamma$ x IL10	IFN $\gamma$ x TNF $\alpha$	IL10 x TNF $\alpha$	IFN $\gamma$ x IL4	IL10 x IL4	IL4 x TNF $\alpha$
CRA	-0,21	0,23	0,22	-0,06	0,11	0,64*
FRA	0,01	0,62*	0,38	0,15	0,48	0,34
CD8+						
CRA	0,58	0,46	0,37	0,88*	0,47	0,43
FRA	0,31	0,66*	0,32	0,63*	0,44	0,92*
CD14+						
CRA	0,14	0,08	0,22			
FRA	0,40	0,69*	0,55*			

Nota: *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), Forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1), cardíaca com dilatação (FC2) e indeterminada (FI). O \* representa a diferença estatística com o valor de  $p \leq 0,05$ .

### 6.9.3 Correlações observadas em pacientes portadores da FI

Observamos apenas uma correlação negativa (-0,64) entre IL-10 e TNF- $\alpha$  em pacientes portadores da FI após estímulo com FRA (Tabela 7).

Tabela 7: Correlação entre as citocinas produzidas por células CD4+, CD8+ e CD14+ após estímulos *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* por pacientes portadores da FI.

<b>Coefficiente de correlação</b>						
<b>CD4+</b>	IFN $\gamma$ x IL10	IFN $\gamma$ x TNF $\alpha$	IL10 x TNF $\alpha$	IFN $\gamma$ x IL4	IL10 x IL4	IL4 x TNF $\alpha$
CRA	-0,62	0,03	-0,40	0,47	-0,37	-0,54
FRA	-0,36	0,31	-0,64*	0,01	-0,13	0,31
<b>CD8+</b>						
CRA	0,21	0,08	0,15	-0,01	0,20	-0,30
FRA	-0,25	0,26	0,27	0,06	-0,07	-0,39
<b>CD14+</b>						
CRA	0,41	0,25	-0,27			
FRA	-0,10	0,48	-0,03			

Nota: *Cytoplasmatic Repetitive Antigen* (CRA), *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), Forma clínica crônica cardíaca sem dilatação (FC1), cardíaca com dilatação (FC2) e indeterminada (FI). O \* representa a diferença estatística com o valor de  $p \leq 0,05$ .



## 7 DISCUSSÃO

A resposta imune Th1 caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  contribui para o controle dos níveis de parasitemia e aumento da sobrevivência de camundongos infectados (ALIBERTI et al., 1996; MARTINS, 1999). Por outro lado, as citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-10, são relatadas por sustentar o parasitismo, por tornar o camundongo mais susceptível à infecção chagásica (REED et al., 1994; ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Porém, a divisão dos aspectos protetores e lesivos no paradigma Th1 x Th2 nunca chegou a ser estabelecido na doença de Chagas humana. No entanto, não há dúvidas que as citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e seguramente estejam envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia da doença.

Uma visão panorâmica do perfil de citocinas produzidas por leucócitos oriundos de portadores das distintas formas clínicas crônicas da doença pode oferecer descobertas dentro do campo dos eventos imunológicos relevantes que possam fortalecer esses conhecimentos. A associação de todos esses estudos, que avaliam os perfis de produção de citocinas, podem também providenciar um melhor conhecimento dos parâmetros imunológicos envolvidos no controle e/ou patogenia da doença. Essas características imunológicas poderiam induzir o desenvolvimento de marcadores de prognóstico das formas clínicas severas. A utilização desses marcadores biológicos identificaria antecipadamente a evolução das formas clínicas da doença de Chagas, auxiliando no redirecionamento da conduta terapêutica pelos médicos.

Apesar de vários achados importantes ao se estudar a imunidade celular na infecção chagásica, pouco foi encontrado sobre distintos perfis de reatividade por pacientes chagásicos portadores das formas cardíaca, digestiva ou indeterminada da doença. Muitas vezes, isso se deve ao fato desses trabalhos fazerem uso de antígenos complexos das formas evolutivas de *T. cruzi*. Assim, a utilização de antígenos que pudessem identificar respostas específicas ao parasito, aliada aos trabalhos realizados por Pereira et al. (2002), Verçosa et al. (2007) e Lorena et al., (2008), que mostraram uma específica resposta imune de pacientes chagásicos frente os Ags-Recs CRA e FRA, impulsionaram o presente estudo, onde avaliamos a

produção de citocinas por pacientes portadores da FC e FI da doença após estímulo *in vitro* com os referidos antígenos. A seguir, discutiremos os resultados obtidos subdivididos em tópicos conforme os objetivos específicos propostos.

### **7.1 Avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas após estimulação *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi***

Nossos dados mostraram que indivíduos portadores da FC2 apresentaram maiores níveis de linfócitos T CD8+/IFN- $\gamma$ + (Figura 19A), bem como de linfócitos T CD8+/TNF- $\alpha$ + (Figura 19D), quando comparado aos indivíduos portadores da FC1 e FI da doença quando utilizamos o Ag-Rec CRA para estimulação *in vitro*. Estes resultados sugerem que estas citocinas poderiam ser bons marcadores biológicos desta forma clínica. A detecção dessas citocinas produzidas especificamente por linfócitos T CD8+, pode indicar que a severidade do dano cardíaco está relacionada com altos níveis de citocinas inflamatórias. No entanto, nenhuma diferença estatística sobre a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por linfócitos T CD8+ foi verificada quando o estímulo antigênico foi o antígeno FRA (Figura 20).

Na doença de Chagas experimental, IFN- $\gamma$  tem sido identificado como um fator de resistência por apresentar uma importante função no controle da parasitemia em camundongos infectados com *T. cruzi* (MINOPRIO *et al.*, 1986, REED, 1988; TORRICO *et al.*, 1996). Por outro lado, na doença de Chagas humana, níveis elevados de IFN- $\gamma$  têm sido associados com a severidade da doença cardíaca em pacientes chagásicos crônicos (DUTRA *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2003; BARROS-MAZON *et al.*, 2004), provavelmente por uma exacerbação da resposta imune, particularmente nas fibras cardíacas, promovendo a destruição dessas células. De fato, estudos têm mostrado a participação dos linfócitos T CD8+ em infiltrados inflamatórios cardíacos de pacientes portadores da FC, sobretudo secretando TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (REIS *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.* 1997, 2003; CUNHA-NETO *et al.*, 1998;).

A citocina TNF- $\alpha$  tem sido demonstrada por modular a expressão de moléculas de adesão, participando, desta forma, dos processos inflamatórios por

recrutar linfócitos ao sítio de inflamação e contribuindo com a progressão da reação inflamatória local na cardiopatia chagásica (BACHMAIER et al., 1997). Prévios estudos têm demonstrado que pacientes portadores da FC são capazes de produzir altos níveis de TNF- $\alpha$ , consistente com o estabelecimento de uma forte resposta de linfócitos T CD8+ que é responsável por uma inflamação exacerbada e dano tissular (REIS et al., 1993; SOUZA et al., 2004). Além disso, pacientes portadores da FC severa apresentam níveis significativamente mais elevados de TNF- $\alpha$  sérico, quando comparados à pacientes com alterações cardíacas leves (FERREIRA et al., 2003). Como já mencionado nossos resultados mostram a produção de TNF- $\alpha$  por pacientes portadores da FC2 sugerindo que esta citocina está envolvida na progressão da cardiomiopatia em pacientes chagásicos.

Já quando estudamos a produção dessas citocinas por linfócitos T CD4+, observamos que todos os grupos de pacientes apresentaram níveis elevados de CD4+/IFN- $\gamma$ + e CD4+/TNF- $\alpha$ + comparado aos indivíduos NI, após estímulo com CRA (Figuras 17A e 17D). No entanto, contrariamente ao que é descrito na literatura (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003), observamos que apenas os indivíduos portadores da FI produziram TNF- $\alpha$  após estímulo com FRA, quando comparados ao grupo de NI (Figura 18D). Alguns trabalhos recentes têm demonstrado um perfil misto de produção de citocinas Th1 e Th2 por pacientes portadores da FI (LAUCELLA et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008), corroborando com os nossos resultados obtidos.

Estudos experimentais demonstraram que a produção de citocinas do tipo Th2, no início da infecção, possui papel na regulação negativa da secreção de IFN- $\gamma$  (LAUCELLA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1996). Segundo Soares et al. (2001) o processo progressivo de dano tissular em portadores da FC poderia ser resultante de uma falha na regulação do IFN- $\gamma$  pela IL-4. Além disso, a IL-10 exerce importante papel regulatório, controlando a patologia em situações de intensa ativação de citocinas do padrão Th1 de resposta (ABRAHAMSOHN et al., 1996). Em indivíduos na fase crônica da doença, acredita-se que a persistência de IL-10 não só contribuiria com o controle do processo inflamatório excessivo, como impediria a manifestação de sinais e sintomas característicos de formas severas, mantendo o indivíduo sempre assintomático, ou seja, portador da FI (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que após estímulo com CRA, a percentagem de células T CD4+ produtoras de IL-4 por portadores da FC1 foi maior quando comparado aos indivíduos portadores da FC2 (Figura 17B). Quando o estímulo foi o antígeno FRA, verificamos que apenas os pacientes portadores da FC2 não produziram níveis significativos de CD4+/IL-4+, comparados aos indivíduos NI (Figura 18B). O mesmo foi observado ao avaliarmos os níveis de CD8+/IL-4+ específicos ao CRA (Figura 19B). Esses achados sugerem que a severidade cardíaca de indivíduos portadores de cardiomiopatia possa estar associada a uma incapacidade de regulação imunológica pela produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4.

Quando estudamos a produção de IL-10 após estímulo com CRA, apenas os indivíduos portadores da FI apresentaram níveis de CD4+/IL-10+ maiores que os indivíduos NI (Figura 17C), indicando que a produção de IL-10 por linfócitos T CD4+ pode realmente, estar exercendo um papel regulatório neste grupo de indivíduos. No entanto, todos os grupos de indivíduos produziram esta citocina após estímulo com FRA, quando comparado ao grupo de indivíduos NI (Figura 18C). Além disso, linfócitos T CD8+ não foram capazes de produzir IL-10 após estímulo com ambos os antígenos (Figuras 19C e 20C), demonstrando que esses linfócitos poderiam estar envolvidos diretamente com os mecanismos inflamatórios através da secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  como mencionado.

Monócitos/macrófagos de indivíduos portadores da FI da doença, têm sido relatadas como as principais células produtoras de IL-10 (GOMES et al., 2003), quando comparado aos indivíduos portadores da FC, e poderiam estar envolvidas na regulação da resposta imune na doença de Chagas, modulando a expressão e a função de IL-12 e IFN- $\gamma$  (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Em nosso estudo, verificamos que as células CD14+ produziram níveis significativos de todas as citocinas estudadas após estímulo com CRA ou FRA, quando comparado ao grupo de indivíduos NI (Figuras 21 e 22), com exceção da produção de IL-10 após estímulo com FRA, onde nenhuma diferença significativa foi verificada entre os grupos avaliados (Figura 22B).

Nossos resultados mostraram que o Ag-Rec CRA tem a capacidade de induzir uma resposta imune inflamatória, através da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em indivíduos portadores de cardiomiopatia dilatada (FC2) comprovando a hipótese do nosso estudo. Essa observação oferece um conhecimento adicional no estudo dos

eventos imunológicos relevantes na evolução dos pacientes chagásicos portadores da FI. Acreditamos que o antígeno CRA, na infecção crônica humana parece ter papel mais importante no desenvolvimento/manutenção de memória imunológica, do que o antígeno FRA, presente no flagelo de tripomastigotas. Por estar presente no citoplasma de formas amastigotas, o estímulo imunológico parece ser contínuo e permanente, já que esta forma evolutiva do parasito está presente nos tecidos afetados do hospedeiro.

A diferenciação das formas clínicas crônicas por antígenos específicos do *T. cruzi*, como demonstrado por nosso trabalho, pode trazer benefícios no entendimento da evolução de indivíduos assintomáticos (FI) e portadores de formas clínicas sintomáticas leves (FC1). As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas por linfócitos T CD8+, poderiam ser avaliadas num estudo prospectivo de indivíduos portadores da FI e FC1, para verificar a evolução clínica desses indivíduos para a cardiomiopatia severa. Essa ferramenta poderia ser utilizada para o seguimento das intervenções terapêuticas.

## **7.2 Avaliação da frequência dos altos produtores de citocinas intracitoplasmáticas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi***

A categorização de pacientes produtores de citocinas tem sido utilizada para avaliar aqueles indivíduos, que dentro do grupo, possuem altos níveis de produção de citocinas (GOMES et al., 2003; VITELLI-AVELAR et al., 2008). Gomes et al. (2003), ao estudarem a produção de IFN- $\gamma$ , dividiram o grupo de pacientes com alterações cardíacas de acordo com a severidade da doença através de exames clínicos mais sensíveis. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação entre “altos” e “baixos” produtores de IFN- $\gamma$  e o estado clínico do paciente. Vitelli-Avellar et al. (2008), estabeleceram um *cut-off* obtido através de uma média global entre todos os indivíduos do estudo e desta forma foi possível segregar os “altos” produtores de citocinas.

Associamos a experiência desses dois autores, onde subclassificamos os pacientes chagásicos cardiopatas em dois grupos (FC1 e FC2) e também

estabelecemos um *cut-off* para investigar os “altos” produtores de citocinas. Com esse tipo de avaliação, verificamos que a maioria dos pacientes portadores da FC2 apresentaram níveis elevados de CD8+/IFN- $\gamma$ + e CD14+/TNF- $\alpha$ +, quando comparados aos indivíduos NI, após estímulo com CRA (Tabela 3).

Quando o estímulo foi o antígeno FRA, a frequência de pacientes portadores da FC (tanto FC1 quanto FC2) foi maior quando comparado aos indivíduos portadores da FI na avaliação das células CD14+/IFN- $\gamma$ + (Tabela 4), mostrando mais uma vez, uma forte resposta inflamatória na maioria dos pacientes portadores da cardiomiopatia chagásica crônica.

Por outro lado, verificamos que a maioria dos pacientes portadores da FC1 apresentaram produção significativa de IL-4 (Tabela 4). O fato de verificarmos a presença de citocinas regulatórias, como a IL-4, sendo produzidas por pacientes FC1, é compreensível. Esses indivíduos apresentam uma forma clínica intermediária entre simples alterações eletrocardiográficas e ocorrência de dilatação cardíaca (forma mais severa), podendo apresentar concomitantemente, os perfis de resposta Th1 e Th2.

### **7.3 Avaliação das células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas**

Não existem dúvidas sobre a participação dos subtipos de linfócitos T na doença de Chagas experimental (TARLETON et al., 1986; TARLETON, 1995). Os linfócitos T participam deste controle por diminuir a parasitemia e a mortalidade durante o curso natural da infecção. Esta resistência contra o *T. cruzi* está relacionada principalmente com uma população viável de linfócitos T CD4+ (ARAÚJO, 1989).

Os linfócitos T CD4+ direcionam e potencializam os mecanismos efetores, incluindo a mudança de isotipo de imunoglobulinas e ativação de fagócitos e células T CD8+. Segundo Menezes et al. (2004), os linfócitos T CD4+ secretam diferente perfil de citocinas entre as duas formas clínicas FC e FI da doença, exercendo papel oposto por secretar IL-10 em pacientes chagásicos portadores da FI e, TNF- $\alpha$  em pacientes portadores da FC. Segundo os autores, essas células são importantes na

imunorregulação da infecção chagásica, sugerindo que podem ter participação nos mecanismos imunológicos para o controle ou para o desenvolvimento da patologia.

A resposta imune induzida por células CD4+ frente aos Ags-Recs não foi capaz de diferenciar as formas clínicas através do perfil de produção de citocinas. Embora, os linfócitos T CD4+ apresentem papel importante na doença de Chagas experimental, está descrito que existe uma resposta escassa de linfócitos T CD4+ na presença de antígenos de *T. cruzi*, sugerindo que o parasito possa estar inibindo a apresentação desses antígenos por células apresentadoras de antígenos (REIS et al., 1993, 1997). Esse mecanismo de inibição sugere que parasitos possam induzir a produção de citocinas que diminuam a expressão de moléculas essenciais para a estimulação/ativação de linfócitos T (RUSSO et al., 1993). Souza et al. (2007) mostraram um aumento na molécula CTLA-4 expressa por células T CD4+ de pacientes portadores da FC quando comparados aos pacientes portadores da FI e NI. Desta forma, a avaliação de moléculas co-estimulatórias, bem como inibitórias da ativação dos linfócitos T deveriam ser melhor estudadas.

Os linfócitos T CD8 são capazes de lisar células infectadas por parasitos e também contribuem a favor da resistência contra a infecção (NICKELL; SHARMA, 2000). Os linfócitos T CD8 citotóxicos participam da imunidade adaptativa utilizando mecanismos de destruição de células-alvo, ou seja, aquelas células infectadas pelo parasito. Apesar de termos evidenciado níveis mais elevados de produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8+ em indivíduos portadores da FC2, ao compararmos os níveis de produção de citocinas pelas células estudadas neste grupo de pacientes, verificamos que as células CD14+ secretam quantidades maiores dessas citocinas, quando comparados aos subtipos de linfócitos (Figura 24). Nossos dados concordam com os de Vitelli-Avelar et al. (2008) que avaliando os níveis de citocinas por células de sangue periférico após estímulo com antígeno solúvel de tripomastigota, demonstraram que a média global de monócitos CD14+ produtores de TNF- $\alpha$  é 20,1%, enquanto que linfócitos T CD4+ e CD8+ apresentam média de 0,8% e 1,3%, respectivamente.

O nosso estudo mostra que os monócitos CD14+ são as principais células produtoras das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 em todos os grupos de pacientes chagásicos (Figuras 23, 24 e 25). No entanto, em indivíduos portadores da FI, verificamos que seguida à produção por células CD14+, a segunda célula produtora

de IL-10 são os linfócitos T CD4+ (Figura 25), mostrando a importância dessa citocina nesse grupo de pacientes.

Apesar de verificarmos que a principal fonte de citocinas são as células CD14+, os resultados discutidos no item 7.1, onde verificamos uma resposta imune de clones de linfócitos T CD4+ e de T CD8+ específicos aos Ags-Recs entre os indivíduos portadores das distintas formas clínicas da doença, nos levam a pensar, que os antígenos CRA e FRA exerçam papéis importantes nos mecanismos de proteção e de patologia na doença de Chagas. Pereira et al. (2005) mostraram forte resposta de linfócitos T CD4 e CD8 específica a esses antígenos na fase aguda da doença por camundongos imunizados com CRA ou FRA. Os autores concluíram que ambos os antígenos são importantes para a imunidade protetora na fase aguda da doença. No entanto, nenhum estudo experimental foi realizado em camundongos infectados cronicamente.

O estudo do papel das células, tanto da imunidade adaptativa, quanto da imunidade inata, que possam estar atuando nesta resposta imunológica da doença humana, devem ser exploradas. Por exemplo, a frequência de indivíduos portadores da FI que apresentam neutrófilos-IL12+ obtidos de culturas estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, é maior (100%), quando comparado ao grupo de pacientes portadores da FC (25%) (VITELLI-AVELAR et al., 2008). Além disso, eosinófilos de pacientes portadores da forma mista (FC e FD) têm se mostrado importantes células produtoras de citocinas, quando comparado aos indivíduos portadores da FC (CARDOSO et al., 2006).

Assim, muito resta ainda a ser esclarecido quanto à função de outras populações celulares, tais como polimorfonucleares, mastócitos, células dendríticas, células T regulatórias e ainda as subpopulações de linfócitos e monócitos na infecção pelo *T. cruzi*.

#### **7.4 Correlações entre a produção das citocinas nos diferentes grupos de portadores da doença de Chagas**

A avaliação de correlações ajuda a compreender a associação entre duas citocinas estudadas. Conforme já mencionado, nossos resultados mostraram



claramente a presença de linfócitos T CD8+ no sangue de pacientes portadores da FC2, específicos ao CRA, que produziram TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Figuras 19A e 19D), sugerindo que pacientes portadores da FC da doença, apresentam forte resposta do tipo inflamatória. Fortalecendo esta idéia, verificamos que existe uma forte correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os pacientes portadores da FC, tanto FC1 quanto FC2 (Tabelas 5 e 6), indicando que essas duas citocinas estão fortemente associadas, o que já tem sido demonstrado na literatura (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al. 1997, 2003).

Por outro lado, verificamos correlações positivas entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nos dois grupos de pacientes portadores de cardiomiopatia (Tabelas 5 e 6). Nossos resultados discordam de outros estudos que realizaram este tipo de análise, onde é hipotetizado que pacientes chagásicos com as formas severas da doença, tenham perdido completamente a capacidade de imunomodulação pela secreção de citocinas anti-inflamatórias (GOMES et al., 2003; D'ÁVILA et al., 2009). Porém, acreditamos que esses pacientes por apresentarem uma exacerbada resposta inflamatória, ainda tenham a capacidade de manter alguns mecanismos de regulação, como a secreção de IL-4 e IL-10, na tentativa de evitar danos teciduais causados principalmente por IFN- $\gamma$ . Para suportar esta nossa hipótese, observamos uma correlação negativa entre IL-10 e TNF- $\alpha$  no grupo de pacientes portadores da FI da doença (Tabela 7).

O controle dos níveis de parasitas durante a fase aguda pelo sistema imunológico do hospedeiro, poderia ter consequências sobre a patologia da forma clínica crônica. Em estudo experimental, camundongos infectados com alta dose de tripomastigota, após um ano de infecção, apresentaram infiltrado inflamatório cardíaco com níveis elevados de linfócitos T CD8+, sugerindo que a alta parasitemia poderia ativar mais fortemente o padrão de resposta do tipo Th1 (moléculas efetoras como IgG2a e IFN- $\gamma$  e células como macrófagos e linfócitos T CD8+) para eliminar o *T. cruzi*, embora também tenha sido verificada uma tentativa de regulação imunológica pela existência de uma correlação positiva entre IL-4 e IFN- $\gamma$  (MARINHO et al., 1999). Provavelmente, uma carga parasitária mais elevada exporia quantidades maiores de antígenos ao sistema imune do hospedeiro, a serem reconhecidos pelos linfócitos, induzindo uma forte resposta celular protetora, mas

que, por outro lado, essa resposta poderia promover a evolução para formas clínicas severas, após a fase aguda.

## 8 CONCLUSÕES

- a) As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidas por linfócitos T CD8+ após estímulo *in vitro* de sangue periférico com o Ag-Rec CRA foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores da FC2 dos pacientes portadores da FC1 e da FI, podendo ser candidatos a marcadores imunológicos da forma clínica cardíaca severa da doença;
- b) Dentre os grupos de indivíduos avaliados, apenas os pacientes portadores da FC2 não apresentaram níveis de CD8+/IL-4+ e de CD4+/IL-4+ específicos ao CRA e FRA, respectivamente, quando comparados aos indivíduos NI sugerindo que a severidade da lesão cardíaca esteja associada a uma regulação imunológica pela produção e secreção de níveis efetores de IL-4;
- c) Indivíduos portadores da FI, e não indivíduos portadores da FC (FC1 e FC2) apresentaram níveis de CD4+/IL-10+ específicos ao CRA mais elevados que os indivíduos NI, indicando que a produção de IL-10 por linfócitos T CD4+ esteja exercendo um papel regulatório nesses pacientes;
- d) Os linfócitos T CD4+, bem como os linfócitos T CD8+ específicos aos Ags-Recs, estão envolvidos nos mecanismos de proteção contra o *T. cruzi* e nos mecanismos imunopatológicos das formas clínicas crônicas da doença;
- e) Indivíduos portadores da FC2 são “altos” produtores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sugerindo que os níveis secretados dessas citocinas estejam relacionados com a severidade do dano cardíaco, porém, esses indivíduos apresentam correlações positivas entre citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), indicando que possuem mecanismos de regulação, como a secreção de IL-4 e IL-10, na tentativa de evitar danos teciduais causados principalmente por IFN- $\gamma$ .

## 9 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar o fenótipo das células da resposta imune adaptativa e inata dos pacientes chagásicos portadores das FC, FD e FI;
- b) Avaliar o papel das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes no sangue periférico dos pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs;
- c) Avaliar o papel das células Th17 presentes no sangue periférico dos pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas após estímulo *in vitro* com os Ags-Recs;
- d) Avaliar as moléculas co-estimuladoras/inibidoras presentes nas células de sangue periférico de indivíduos chagásicos portadores das formas clínicas FC, FD e FI.;
- e) Comparar os parâmetros acima entre os pacientes chagásicos de diferentes áreas endêmicas, onde circulam cepas de *T. cruzi* de diferentes biotemas.

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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.

ARAÚJO, F.G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) lymphocytes. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 57, p. 2246-2248, 1989.

ARAÚJO, F. F. et al. Potential role of CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 12, p.2797-2806, 2007.

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

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

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

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

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

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

CARDOSO et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 11, p. 1158-1163, 2006.

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

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

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

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

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

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

D'ÁVILA D. A. et al. Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  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. 104, 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. 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. et al. The impact of Chagas' disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.5, p. 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P. et al. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 2, p. 193-196, 2008.

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

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

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

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

DUTRA, 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.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl. I, p. 208-218, 2009.

FERREIRA et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 407-411, 2003.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 181-187, 2007.

FUENMAYOR, C. et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. **Acta Cardiologica**, Leuven, v. 60, p. 33-67, 2005.

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

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

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

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

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



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

HIGUCHI et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 60, p. 96-107, 2003.

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.

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

HYLAND, K. V.; ENGMAN, D. M. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. **Trends Parasitology**, Londres, v. 22, p. 101-102, 2006.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human Chagas cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n. 4, p. 348-357, 1993.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the immunity hypothesis of Chagas disease? **Trends Parasitology**, Londres, v. 21, p. 513-516, 2005.

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.

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.

LAUCELLA, S.A., ROTTENBERG, M.E., DE TITTO, E.H. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 28, p. 99-109, 1996.

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

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

LORENA, V. M. B. 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. 22, p. 91-98, 2008.

LORENA, V. M. B. et al. Produção de citocinas intracitoplasmáticas em pacientes chagásicos após estímulo *in vitro* com os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*. In: 45º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009, Recife. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, supl. I, p. 155, 2009.

MARTINS, G. A. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 3, p.3864-3871, 1999.

MARINHO, C. R. F. Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitismo, and Activation of the Immune System at the chronic phase of Chagas disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.

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

MENEZES C. A. S.; TEIXEIRA M. M.; DUTRA W. O., 2009. **A resposta imunológica dos pacientes chagásicos**, Portal de Chagas: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>.

MICHAILOWSKY, 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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, supl. III, 29p. 2005.

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.

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.

NICKELL, S. P.; SHARMA, D. *Trypanosoma cruzi*: roles for perforin-dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. **Experimental Parasitology**, v. 94, p. 207-216, 2000.

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

OLIVEIRA, L. C. B. et al. Antigen-specific IL-4 and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase *in vivo* susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, New York, v. 170, p. 41-53, 1996.

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

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. **Revista da**

**Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003a.

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

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

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

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

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

REED, S.G. In vivo administration of recombinant IFN $\gamma$  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.

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, Oslo, v. 153, p. 3135-3140, 1994.

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

REIS, M. M. et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence

of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical immunology and immunopathology**, New York, v. 83, n. 2, p. 165-172, 1997.

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

ROCHA, M. O. C. An update on the management of Chagas cardiomyopathy, Review. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Londres, v. 5, n. 4, p. 727-743, 2007.

RUSSO, D. M. et al. Human T cell responses in Leishmania infections. **Progress in Clinical Parasitology**, New York, v.3, p. 119-124, 1993.

SHIKANAI-YASUDA et al. Posible oral transmisión of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 355-361, 1991.

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

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

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

SOARES, M. B. P. et al. Modulation of Chagasic cardiomyopathy by Interleukin-4. Dissociation between Inflammation and Tissue Parasitism. **American Journal of Pathology**, New York, v. 159, n. 2, p. 703-709, 2001.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics

associated with morbidity. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, P. E. A et al. *T. cruzi* infection induces differential modulation of coestimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.75, n., 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**, Amsterdam, v. 60, p. 25-32, 2008.

TARLETON R.L. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. **Research Immunology**, New York, v. 142, p. 130-133, 1991.

TARLETON. R.L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitology Today**, Hamilton, v. 11, p. 7-12, 1995.

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

VAGO, A. R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. **Lancet**, Londres, v. 348, p. 891-892, 1996.

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.

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.

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

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

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.

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

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

## ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz



Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** "Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*"

**Pesquisador responsável:** Virgínia Maria Barros de Lorena

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

**Data de apresentação ao CEP:** 23/04/2007

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 22/07

**Registro no CAAE:** 0022.0.095.000-07

**PARECER Nº 019/2007**

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 13 de junho de 2010. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de junho de 2007.

  
 Dr.<sup>a</sup> Zulma Maria de Medeiros  
Biomédica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

**Observação:****Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 13/06/2008.



## APÊNDICE A - Características dos indivíduos portadores da doença de Chagas

	<b>Registro CPqAM</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Naturalidade</b>	<b>Forma clínica</b>
1.	HUOC 218	M	35	Jaboatão dos Guararapes-PE	FC 1
2.	HUOC 219	F	36	Pesqueira-PE	FC 2
3.	HUOC 221	F	57	Triunfo-PE	FC 1
4.	HUOC 225	M	62	Buíque-PE	FC 1
5.	HUOC 226	F	63	Triunfo-PE	FC 1
6.	HUOC 228	F	69	Chã de Alegria-PE	FC 1
7.	HUOC 234	F	NI	Viçosa-AL	FC 1
8.	HUOC 235	F	70	São José da Lage-AL	FC 2
9.	HUOC 236	M	NI	Escada-PE	FI
10.	HUOC 237	M	69	Carpina-PE	FC 2
11.	HUOC 239	F	63	Buíque-PE	FI
12.	HUOC 240	F	58	Itapeti-PE	FC 2
13.	HUOC 241	F	61	Afogados da Ingazeira-PE	FC 1
14.	HUOC 242	M	59	Bom Jardim-PE	FC 2
15.	HUOC 243	M	54	Itambé-PE	FC 1
16.	HUOC 244	F	64	Belém de Maria-PE	FC 2
17.	HUOC 245	F	77	Vicência-PE	FC 1
18.	HUOC 246	F	55	Bom Jardim-PE	FC 1
19.	HUOC 250	F	45	Caetés-PE	FI
20.	HUOC 251	M	52	Bom Jardim-PE	FC 2
21.	HUOC 252	F	59	Sertânia-PE	FI
22.	HUOC 253	M	44	São Benedito do Sul-PE	FC 1
23.	HUOC 254	M	30	Sertânia-PE	FC 1
24.	HUOC 255	M	61	Nazaré da Mata-PE	FC 1
25.	HUOC 258	M	63	São José do Egito	FC 2
26.	HUOC 259	F	NI	Cachoeira-PE	FI
27.	HUOC 260	F	55	Macaparana-PE	FC 1
28.	HUOC 261	M	63	Bom jardim-PE	FI
29.	HUOC 264	F	60	Tabira-PE	FC 2
30.	HUOC 265	F	67	São José da Lage-AL	FC 2
31.	HUOC 267	M	30	Terra Nova-PE	FI
32.	HUOC 268	F	69	Nazaré da Mata-PE	FC 1
33.	HUOC 269	F	60	Paciência-PE	FC 2
34.	HUOC 270	F	38	Arcoverde-PE	FI
35.	HUOC 276	F	72	Itapeti-PE	FC 2
36.	HUOC 277	M	62	Carpina-PE	FC 2
37.	HUOC 278	F	65	Limoeiro-PE	FC 2
38.	HUOC 279	M	23	Mirandiba-PE	FI
39.	HUOC 281	F	59	São Vicente Férrer-PE	FC 2

Nota: NI: não informado; F: sexo feminino; M: sexo Masculino; FC1: portadores da forma clínica cardíaca sem dilatação; FC2: portadores da forma clínica cardíaca com dilatação; FI: portadores da forma clínica indeterminada;

## APÊNDICE B - Características dos indivíduos não-chagásicos estudados

	<b>Registro CPqAM</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Naturalidade</b>
1.	NI 32	F	57	Carpina-PE
2.	NI 33	F	67	Desterro-PB
3.	NI 37	F	38	Pesqueira-PE
4.	NI 38	F	37	Paudalho-PE
5.	NI 39	F	62	Aliança-PE
6.	NI 40	F	54	Olinda-PE

Nota: NI: Não infectado; F: sexo feminino; M: sexo Masculino;

## APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE

**Título de projeto:** Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é investigar o potencial dos antígenos recombinantes CRA e FRA como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Fui informado que como portador da doença de Chagas terei meu sangue (30-40ml) coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável, contendo uma substância que não coagula o sangue. Esse procedimento é praticamente isento de risco pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (uma substância envolvida no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se os antígenos CRA e FRA funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença, será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador 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: \_\_/\_\_/\_\_  
Assinatura do Paciente

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_  
Assinatura do responsável pelo projeto

Responsável pelo projeto:

Virginia Maria Barros de Lorena

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566/ 9965-1663

Médica responsável:

Dra Maria da Glória de Melo

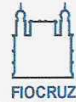
Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz

Telefone para contato: 2101-1441/ 9976-5398

## APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Voluntário Controle



Centro de Pesquisas  
**AGGEU MAGALHÃES**



Ministério da Saúde

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O VOLUNTÁRIO CONTROLE

**Título de projeto:** Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é investigar o potencial dos antígenos recombinantes CRA e FRA como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Fui informado que, como voluntário controle para o estudo, terei meu sangue (30-40ml) coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável, contendo uma substância que não coagula o sangue. Esse procedimento é praticamente isento de risco pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (uma substância envolvida no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se os antígenos CRA e FRA funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença, será de grande auxílio para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador 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.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário controle

Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo projeto

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Responsável pelo projeto:  
Virginia Maria Barros de Lorena  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ  
Telefone para contato: 2101-2559/ 2101-2566/ 9965-1663

Médica responsável:  
Dra Maria da Glória de Melo  
Ambulatório de Doença de Chagas, Hospital Universitário Oswaldo Cruz  
Telefone para contato: 2101-1441/ 9976-5398

## APÊNDICE E - Formulário de Pesquisa



Centro de Pesquisas  
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

## Formulário de Pesquisa

**Título do projeto:** Investigação de marcadores imunológicos na doença de Chagas utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* (Responsável: Virginia Lorena)

1. Nome: \_\_\_\_\_  
Prontuário nº: \_\_\_\_\_ Registro CPqAM: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_  
Paciente do(a) Dr(a): \_\_\_\_\_

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino 3. Idade: \_\_\_\_\_ (1) De 18 a 29 anos  
(3) De 30 a 39 anos  
(4) De 40 a 59 anos  
(5) A partir de 60 anos

4. Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
Telefone: (\_\_\_\_) - \_\_\_\_\_ Celular: (\_\_\_\_) - \_\_\_\_\_

5. Município de nascimento: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

## 6. Epidemiologia:

Morou em casa de taipa? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe  
Já recebeu transfusão sanguínea? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe  
Conhece o barbeiro? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe  
A mãe é portadora da doença de Chagas? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe  
Quando descobriu a doença? \_\_\_\_\_

## 7. Sorologia HUOC:

IFI: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_  
HAI: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_  
ELISA: (1) positivo (2) negativo (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_

## 8. Exames clínicos:

**RX de tórax:** (1) normal (2) dilatação (3) não realizado. OBS: \_\_\_\_\_

**ECO:** (1) Função sistólica: ( ) normal (quando FE>55%)  
( ) Disfunção leve (quando FE: 55-40%)

Fração de ejeção: \_\_\_\_\_ ( ) Disfunção moderada (quando FE: 40-30%)  
( ) Disfunção grave (quando <30%)

(2) Função Diastólica: ( ) normal  
( ) anormal

(3) Aumento do ventrículo esquerdo

(4) Não realizado. OBS: \_\_\_\_\_

**ECG:** (1) normal (2) anormal (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_

Sendo anormal: ( ) Bloqueios \_\_\_\_\_  
( ) Alterações isquêmicas  
( ) Extrassístoles/ taquicardia  
( ) Arritmias  
( ) Sobrecarga  
( ) Dilatação  
( ) Marca-passo

**RX esôfago:** (1) normal (2) dilatação (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_

**Enema opaco:** (1) normal (2) dilatação (3) não realizado; OBS: \_\_\_\_\_

9. Possui queixas digestivas (engasgo e/ou constipação)? ( ) Sim ( ) Não

10. Tratamento etiológico (Benzonidazol): (1) Sim (2) Não

11. Forma clínica crônica: (1) Forma cardíaca ( ) sem dilatação ( ) com dilatação  
(2) Forma digestiva ( ) megaesôfago ( ) megacólon  
(3) Forma indeterminada  
(4) Forma mista

## APÊNDICE F - Artigo publicado

Journal of Clinical Laboratory Analysis 22:91–98 (2008)

## Cellular Immune Response From Chagasic Patients to CRA or FRA Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*

Virginia M.B. Lorena,<sup>1</sup> Alinne F.A. Verçosa,<sup>1</sup> Raquel C.A. Machado,<sup>1</sup>  
 Lucas Moitinho-Silva,<sup>1</sup> Maria G.A. Cavalcanti,<sup>2</sup> Edimilson D. Silva,<sup>3</sup>  
 Antonio G.P. Ferreira,<sup>3</sup> Rodrigo Correa-Oliveira,<sup>4</sup> Valéria R.A. Pereira,<sup>1</sup>  
 and Yara M. Gomes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/Fiocruz, Recife-PE, Brazil

<sup>2</sup>Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC)/Universidade de Pernambuco (UPE), Recife-PE, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Reativos para Diagnóstico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)/Fiocruz, Belo Horizonte-MG, Brazil

We propose to analyze the relation between the cellular immune response of Chagas' disease patients after in vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with recombinant antigens cytoplasmatic repetitive antigen (CRA) or flagellar repetitive antigen (FRA) of *T. cruzi* and the chronic clinical forms of disease. Cells were stimulated using phytohemagglutinin, CRA, FRA, or a soluble antigen of Epimastigota (Ag-Epi) for 24 hr, 72 hr, or 6 days. The proliferation of cells was evaluated after 6 days of culture by quantification of incorporated <sup>3</sup>H-thymidine. Cytokines were measured in the supernatants obtained after 24 hr (tum or necrosis factor [TNF]- $\alpha$  and interleukin [IL]-4), 72 hr (IL-10), and 6 days (interferon [IFN]- $\gamma$ ) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cells of the Chagas patients stimulated with the recombinant antigens exhibited higher proliferation responses

compared with that of non-Chagas (NC) individuals. However, when proliferation was compared between patients with the cardiac form (CF) or indeterminate form (IF), it was not possible to establish a difference in the response. So far as the cytokines secreted in the culture supernatants after stimulation in vitro with *T. cruzi* antigens were concerned, the results showed that CRA, as well as Epi-Ag, were able to stimulate the production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in Chagas patients as compared with NC individuals. However, the cytokine levels after stimulation with the *T. cruzi* antigens were not different between the patients with CF and IF. CRA was capable of inducing a T helper type 1 (Th1) immune response, with elevated production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in Chagas patients that are carriers of CF and IF clinical forms. *J. Clin. Lab. Anal.* 22:91–98, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** cytokines; recombinant antigens; Chagas' disease

### BACKGROUND

Chagas' disease is considered an important public health problem, as the global prevalence of this human infection is estimated at around 16–18 million cases and approximately 120 million people are under risk of infection (1). It is estimated that around 25–30% of the individuals infected by *Trypanosoma cruzi* will develop irreversible clinical forms of the disease, causing considerable mortality and morbidity rates in populations of endemic countries (2).

\*Correspondence to: Yara M. Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Grant sponsor: Biomanguinhos/Fiocruz; Grant number: CC 01/2004; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Accepted 12 September 2007

DOI 10.1002/jcla.20209

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

The pathology of the lesions that lead to severe forms of the disease is still unknown (3,4). With respect to the initial mechanisms involved in the development of Chagas' disease cardiomyopathy, some works suggest the participation of autoimmune mechanisms (4-6). However, other authors recognize the existence of a specific immune response to the antigens of the parasite that could contribute directly to the evolution of the disease (7-12).

Differences in the intensity of the proliferative cellular response between the asymptomatic form and the symptomatic forms have been reported by various authors. Cetron et al. (13) identified a greater intensity of cell proliferation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of individual carriers of the indeterminate clinical form (IF) when compared to carrier patients of the cardiac form (CF) and digestive clinical forms after *in vitro* stimulation with trypomastigote lysate of *T. cruzi*. Inverse results were produced when the cell stimulation was performed with antigens obtained from epimastigote forms of the parasite (14). Differences in cellular reactivity were reported in individual carriers of severe CF to flagellar (69%) and cytosolic (63%) fractions of *T. cruzi* when compared to the results of asymptomatic individuals (38% and 27%, respectively) (15). However, other studies found no differences in the proliferative cell response between asymptomatic patients and these carriers of symptomatic forms after *in vitro* stimulation of PBMC with lysates from different strains and clones of epimastigote forms of *T. cruzi* (16); purified epimastigote fractions (17) and paraflagellar rod proteins (PFR) (18).

Complex *T. cruzi* antigens have been used to investigate patterns of cytokine secretions in PBMC of Chagas' disease patients (8,9,19). These studies demonstrated that the interleukin (IL)-10 is the cytokine secreted by IF patients, suggesting that this cytokine could be associated with the protection of the host against the development of chronic symptomatic forms. The CF patients, however, have high levels of interferon (IFN)- $\gamma$ , being correlated with the level of severity of cardiac injury (9).

Few studies have been performed with purified antigens of the parasite. PBMC from chagasic individuals after *in vitro* stimulation with PFR secreted high levels of IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . However, no difference was found between CF and IF individuals (18). The predominant response of IFN- $\gamma$  was reported in cardiomyopathy patients when PBMCs were stimulated with trans-sialidase (20), with a recombinant *T. cruzi* B13 protein (21) or with purified subfractions of trypomastigote antigens (22). Another study, also showed the IFN- $\gamma$  production after stimulation with cruzipain (23).

The use of molecularly defined sequences of the parasite is a requisite not just for the development of serological blood tests and screening in blood banks, but also for the identification of important molecules in parasite-host interaction and to understand processes related to the immunopathology of Chagas' disease (24,25).

Two recombinant antigens (Rec-Ags), cytoplasmatic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA), already studied in murine model (26-29), have been successfully used in the immunodiagnosis of Chagas' disease (30-33). These antigens were also used to evaluate the cure for Chagas' disease in patients from Minas Gerais (Brazil) treated in the acute phase of the infection (34). In a pilot study performed through our group, CRA and FRA were capable of inducing the production of cytokines in the PBMC of Chagas individuals (Pereira et al., unpublished results). FRA stimulated PBMC in CF patients to produce IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and, CRA stimulated the production of IL-10 by individual carriers of the IF form of the disease, suggesting that these antigens could identify distinct profiles of cytokines between individual carriers of the different clinical forms of the disease.

Considering the importance of the immune response against the antigens of the parasite, evidenced by the production of specific antibodies against CRA or FRA by Chagas patients (35) and by the potential prognostic value of Rec-Ags (Pereira et al., unpublished results), the present study evaluated the specific immune cellular response to these antigens by PBMCs of CF and IF Chagas individuals aiming to use prognostic markers of the evolution of severe clinical forms of Chagas' disease.

## METHODS

### *T. cruzi* Antigens

The CRA and FRA antigens were prepared in the Bio-Manguinhos Department of Reactives for Diagnostics and obtained as previously published by Krieger et al. (31). The soluble epimastigote antigen (Epi-Ag) from the Y strain of *T. cruzi* was obtained according to Pereira et al. (36).

### Study Population

Patients carrying forms of chronic Chagas' disease were selected in the Chagas' disease Unit of the Osvaldo Cruz University Hospital (HUOC), at the University of Pernambuco (UPE). The selection of these individuals was based on the following criteria: 1) clinical tests for the characterization of the clinical forms established by the World Health Organization (WHO) (1); 2) positive serological tests for Chagas' disease; and 3) not having

been submitted to etiological treatment. The individual carriers of CF (n = 19, 33–82 years old; 8 females and 11 males), were selected by showing alterations in electrocardiogram and/or dilatation of the heart, absence of dilatation of the esophagus, absence of digestive complaints and positive serological results for *T. cruzi* infection. Individual carriers of IF (n = 17, 22–69 years old; 10 females and seven males), were selected by not having shown any type of cardiac and/or digestive alterations, but with positive serological results for *T. cruzi* infection (1). A group of non-infected Chagas' disease volunteers (NC) (n = 19, 21–50 years old; 14 females and seven males), was assembled for comparison with Chagas patients according to three criteria: 1) never having resided in an endemic area of Chagas' disease; 2) never having received a blood transfusion; and 3) having a negative serological result for Chagas' disease. The methods presented in this study were approved by the ethics committee of CPqAM/Fiocruz.

#### Obtaining the Mononuclear Cells of Peripheral Blood

A total of 40 mL of heparinized blood was mixed to phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (1:2) and added to tubes containing Ficoll-Hipaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) (1:3 of the blood-PBS mixture). After centrifuging (900 g for 40 min at 20°C), the PBMC was removed. The cells were washed two times by centrifuge (400 g for 10 min at 20°C) in medium RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) and counted in a Neubauer chamber. The cell concentrations were adjusted for the cell proliferation tests and to obtain culture supernatants.

#### Cell Proliferation Assay

Cellular suspensions ( $2 \times 10^5$  cells/well) were deposited in 96-well culture plates (Costar 3595; Corning Incorporated, Corning, NY) and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) (Cultilab, São Paulo, Brazil) (2.5 µg/mL), Epi-Ag (25 µg/mL), and the Rec-Ags CRA or FRA (2 µg/mL) (after previous kinetic dose-responses), and without stimulation. The plates were incubated (37°C/5% CO<sub>2</sub>) for 6 days (after previous kinetic time-response). At 16 hr before the end of incubation, 0.5 µCi of <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Biosciences) was added. The material of the cell culture was collected through a semiautomatic cell harvester and deposited on glass-fiber paper (Skatron Instruments, Sterling, VA). The incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine was quantified following the emitted β radiation expressed in counts per minute (CPM). The stimulation index (SI) was calculated by dividing the mean CPM of the stimulated cultures by the mean CPM of the nonstimulated cultures.

#### Evaluation of the Cytokines of Culture Supernatants

Cell suspensions ( $5 \times 10^5$  cells/well) were deposited in culture plates of 48 wells (Costar 3548; Corning Incorporated) and stimulated with PHA (10 µg/mL), Epi-Ag (25 µg/mL), and Recs-Ags CRA or FRA (2 µg/mL) (after previous kinetic dose-response) and without any stimulation. The plates were incubated (37°C/5% CO<sub>2</sub>) for 24 and 72 hr and 6 days (after previous kinetic time-response). Supernatants were collected after centrifugation and stored at -70°C. Then, 96-well microplates (Nalge Nunc International Corporation, Rochester, NY) were sensitized with the monoclonal anticytokine antibodies (TNF-α = 2 µg/mL, IL-4 = 2 µg/mL, IL-10 = 1 µg/mL, and IFN-γ = 0.5 µg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN) and incubated overnight at 4°C. The culture supernatants (50 µL/well), as well as standards (R&D Systems) were added in duplicate and incubated overnight at 4°C. The standards were added after serial dilution with factor 2 from the initial concentrations: TNF-α = 2,000 pg/mL; IL-4 = 8,000 pg/mL; IL-10 = 8,000 pg/mL; IFN-γ = 16,000 pg/mL in RPMI 1640 2% fetal bovine serum (FBS). The monoclonal anticytokine antibodies combined with biotin (TNF-α = 100 ng/mL; IL-4 = 12.5 ng/mL; IL-10 = 500 ng/mL; and IFN-γ = 12.5 ng/mL) (R&D Systems) were added for 2 hr at ambient temperature. Streptavidin-peroxidase (1:10,000) (Pharmingen, San Jose, CA) was then added at room temperature and the immunocomplexes were detected utilizing revealing solution (KPL, Gaithersburg, MD). The reaction was blocked with citric acid 0.2 M and the reading was carried out in a spectrophotometer (model 3550; Bio-Rad Laboratories, Inc., Vienna, VA) at 405 nm. The results were done as the mean of the duplicates ± standard deviation (SD).

#### Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test evaluated the normality assumption of the data. To verify the existence of differences between stimulated and unstimulated cultures within each group studied, the Wilcoxon test was used for paired samples. To compare the difference between the groups, the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test were used, when a difference between existed. All conclusions were taken to a significance level of 5%. The software programs used were Excel 2000 and Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Redmond, WA) version 8.0 (SPSS Incorporated, Chicago, IL).

#### RESULTS

The lymphoproliferation response expressed as an SI is shown in Table 1. Proliferative responses of the



TABLE 1. Lymphoproliferative response when faced with *T. cruzi* antigens and with mitogens\*

	CF (n = 19)		IF (n = 17)		NC (n = 19)
	SI ± SD	P	SI ± SD	P	SI ± SD
CRA	2.96 ± 2.22	<0.01	2.99 ± 2.43	<0.01	0.91 ± 0.23
FRA	2.96 ± 2.66	<0.01	2.40 ± 0.93	<0.01	0.82 ± 0.25
EpiAg	6.15 ± 2.85	<0.01	7.59 ± 5.16	<0.01	0.77 ± 0.34
PHA	16.02 ± 9.99	>0.05	20.92 ± 16.68	>0.05	10.84 ± 8.75

\*A total of 36 Chagas carriers of the clinical cardiac (CF) and indeterminate (IF) forms were evaluated. The means of the stimulation indices (SI) of the Chagas patients were compared to those of the non-Chagas individuals (NC).

SD, standard deviation; P, P value comparing CF and IF with NC; CRA, cytoplasmatic repetitive antigen; FRA, flagellar repetitive antigen; Epi-Ag, soluble epimastigote antigen; PHA, phytohemagglutinin.

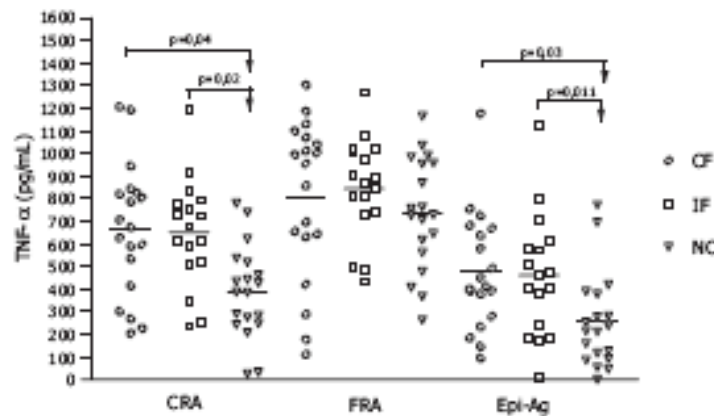


Fig. 1. Detection of TNF-α in supernatant of PBMC cultures of Chagas patients and NC carriers after stimulation with *T. cruzi* antigens CRA, FRA, and soluble Epi-Ag of *T. cruzi*. Individual carriers of the CF (n = 19) and of the IF (n = 17) and NC individuals (n = 19). The points (○, □, ▽) represent the mean of the duplication. The horizontal bars represent the arithmetic mean. The statistical differences are indicated in the figure with the P value.

*T. cruzi* antigens were verified after 6 days of cell cultivation. It was observed that both CF and IF individuals showed a greater antigen-specific response than the NC individuals after stimulation with CRA, FRA, and Epi-Ag. The mitogenic stimulation, used as a positive control, was significantly larger in Chagas' disease patients when compared to NC individuals.

High levels of TNF-α and IFN-γ cytokines were detected in the culture supernatants of PBMC of CF and IF individuals after cell stimulation with CRA or Epi-Ag (Figs. 1 and 2). The production of TNF-α in PBMC cultures of CF (mean = 662.52 pg/mL ± SD = 294.01) and IF (mean = 652.16 pg/mL ± SD = 239.88) stimulated with CRA was higher when compared to the PBMC cultures of NC (mean = 386.60 pg/mL ± SD = 203.80). A similar result was observed in the stimulated cultures with Epi-Ag, that is, CF (mean = 478.97 pg/mL ± SD = 259.93) and IF (mean = 460.64 pg/mL ± SD = 270.72) (Fig. 1).

Significant values were found when comparing production of IFN-γ of CF (mean = 2,725.56 pg/mL ± SD = 2,786.60) and IF (mean = 1,821.22 pg/mL ± SD = 1,578.22) with NC (mean = 977.80 pg/mL ± SD = 2,087.44) individuals, when the cells were stimulated with CRA. In the cell cultures stimulated with Epi-Ag, the production of IFN-γ was also significant when compared to CF (mean = 5,749.14 pg/mL ± SD = 5,084.95) and IF (mean = 8,181.38 pg/mL ± SD = 4,683.94) with NC (mean = 600.67 pg/mL ± SD = 1,331.80) individuals (Fig. 2). However, no significant differences were found between CF and IF. Although increased production of IL-10 in supernatants of PMBC of Chagas patients (CF and IF) after stimulation with *T. cruzi* antigens has been manifested, above all with FRA (Fig. 3), there was no significant difference in this production with the group of NC individuals. The production of IL-4 after stimulation with *T. cruzi* antigens was not observed (data not shown).

## Cellular Immune Response in Chagasic Patients 95

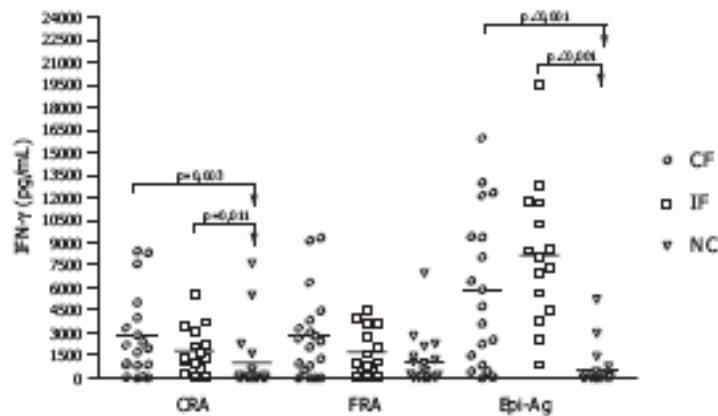


Fig. 2. Detection of IFN- $\gamma$  in supernatant of PBMC cultures of Chagas and NC carriers after stimulation with *T. cruzi* antigens CRA, FRA, and soluble Epi-Ags of *T. cruzi*. Individual carriers of the CF (n = 19) and of the IF (n = 17) and NC individuals (n = 19). The points ( $\circ$ ,  $\square$ ,  $\nabla$ ) represent the means of the duplication. The horizontal bars represent the arithmetic mean. The statistical differences are indicated in the figure with the P value.

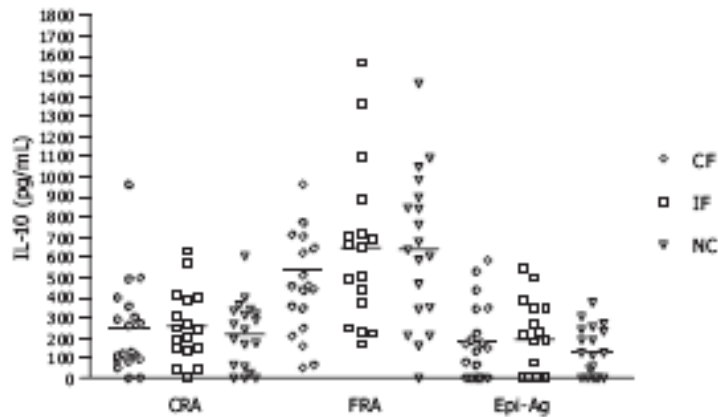


Fig. 3. Detection of IL-10 in supernatant of PBMC cultures of Chagas and NC patients after stimulation with *T. cruzi* antigens CRA, FRA, and soluble Epi-Ags of *T. cruzi*. Individual carriers of the CF (n = 19) and of the IF (n = 17) and NC individuals (n = 19). The points ( $\circ$ ,  $\square$ ,  $\nabla$ ) represent the means of the duplication. The horizontal bars represent the arithmetic mean.

## DISCUSSION

The immune system plays a crucial role in Chagas' disease pathology, possibly performing both in the control of the *T. cruzi* infection by limiting the severity of the disease, and promoting tissue damage in the recognized area of the parasite (37). This fact makes it difficult to understand the participation of the cell immune response, especially regarding the functions of cytokines in the development of Chagas cardiopathy. The relationship between the reactivity of T cells against the parasite and its antigens has thus been demonstrated, and the phenotypical and functional characterization of these cells has permitted the investigation of

their functions in the establishment of the pathological responses (individual carriers of serious forms) or protectors (individuals with indeterminate forms) (37). This study's purpose was to investigate the cellular immune response in this disease by evaluating the response of two recombinant antigens of the parasite and their correlation with the clinical forms of Chagas' disease. To this end, PBMCs of cardiac clinical form and indeterminate form carrier patients were stimulated in vitro with the Rec-Ags CRA and FRA of *T. cruzi* and total parasite extract.

Our results showed that both CF and IF individuals demonstrated specific and significant specific proliferative response against CRA and FRA, that is two to three

times less than the response observed for the total parasite extract (Table 1). These results were not surprising, first as it is known that there is a large variation in the cell response of these individuals, and second because it is related to the response to recombinant antigens. This variation in cell response against raw antigens has already been demonstrated by Morato et al. (16) where 30% of IF and 33.3% of CF Chagas patients showed low reactivity of PBMC to six antigens derived from different clones of *T. cruzi*. The decrease in lymphoproliferative response was also related in a longitudinal study of immune response carried out by Mosca et al. (14), where levels of parasitemia (evaluated after artificial xenodiagnosis) were correlated with the reduction in cell proliferation in individuals with IF, suggesting that, in patients with CF, a modulating mechanism could have been missing.

Barros-Mazon et al. (10) showed that cell proliferation resulting from the activation of soluble trypomastigote antigens was significantly greater in Chagas patients (both CF and IF) when the cultures were treated with indometacine, an inhibitor of prostaglandin synthesis, suggesting that cell responses in Chagas patients are negatively regulated by prostaglandins. It is known that macrophages and/or dendritic cells, among others, secrete cytokines, such as IL-10, or soluble mediators, such as the reactive intermediates of oxygen and nitrogen, that can increase or suppress proliferative cell response (38-40). In general, there is little information about the mechanisms that regulate the parasite-specific lymphocytic response in Chagas patients.

Little, however, is known about the specific response to isolated antigens of the parasite. In this study, high levels of TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  were detected in Chagas patients after stimulation of PBMC with CRA or Epi-Ag. However, the cytokines levels were not different between the patients with CF and IF (Figs. 1 and 2).

Studies in patients with CF have revealed a Type 1 immune response, with elevated production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . Cunha-Neto et al. (41) studied the production of cytokines in supernatant cultures of T cells obtained in heart biopsies of eight CF patients. The results showed that the cells of seven of eight biopsies produced IFN- $\gamma$ , six of eight produced TNF- $\alpha$  and three of eight produced IL-10. However, IL-4 and IL-12 were not detected. The presence of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , in the absence of IL-4, indicates a pattern of Type 1 inflammatory response in individual carriers of Chagas cardiomyopathy. Despite the small number of individuals studied by Cunha-Neto et al. (41), this predominance of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  is in agreement with other previous studies (42,43).

High levels of IFN- $\gamma$  are associated with the severity of cardiac disease (9) probably due to an exacerbation of the immune response, particularly in the cardiac fiber, promoting the destruction of these cells (9,44). TNF- $\alpha$ , however, has been shown to modulate the expression of adhesion molecules, thus participating in the inflammatory processes for impressing lymphocytes to the inflammation site and contributing to the progression of the local inflammatory reaction in Chagas cardiopathy (45).

In our study, although we found evidence of an increased production of IL-10 in PBMC supernatants of Chagas patients (CF and IF) after stimulation with *T. cruzi* antigens, especially with FRA, there was no significant difference in this production with the group of NC individuals (Fig. 3).

It is known that immunoregulating cytokines (IL-10, IL-4, and transforming growth factor [TGF]- $\beta$ ) are important for controlling infection by *T. cruzi* (46). The regulatory T cells have been described as a population of T cells that regulate both innate and adaptive responses, including the response to pathogens or to self antigens (47,48). However, they can contribute to the escape of *T. cruzi* from the immune system of the host and to the establishment of the chronic phase of the disease (46).

Monocytes/macrophages in PBMC, of individuals with the IF form of the disease, are the main cell producers of IL-10 after stimulation with trypomastigote and epimastigote lysate (9) and can be involved in the regulation of the immune response in Chagas' disease, modulating the expression and function of IL-12 and IFN- $\gamma$  (3). The destructive process in the patients with CF could, for this reason, be due to a failure in the regulation of the T helper type 1 (Th1) response by IL-10. According to Gomes et al. (9), factors such as genetic characteristics of the host, changes in the immune system dependent on age, superposition of infections by other microorganisms and/or reinfection with *T. cruzi*, could be involved in this immunopathological process.

Furthermore, individuals with positive serological tests for the infection, and without electrocardiographic changes, residents of communities in Paraguay, showed elevated levels of IL-4, another cytokine secreted by T cells from type 2 (49), suggesting that repeated exposures to the parasite could have caused a different profile of cytokines. The results of this study showed that there was no production of IL-4 after stimulation with *T. cruzi* antigens, in agreement with recent studies (18,21,22,50), in which patient selection did not occur solely in an endemic area of the disease.

The differences between our results and those described by Pereira et al. (unpublished results), where a distinct profile of cytokines was shown between CF and IF individuals, could have been related, principally,

to the different methods used in the studies. The low levels of cytokines in the cultures and/or their rapid consumption by cell receptors could alter the level of detection of these factors through ELISA capture (51). The evaluation of the intracytoplasmic cytokines by flow cytometry is thus more representative, as the cytokines are imprisoned in the interior of the cell cytoplasm (52).

In resume, this study showed that CRA was capable of inducing a type Th1 immune response, with elevated production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in Chagas patients with CF and IF clinical forms. However, to fully understand the evolution of the clinical forms of the disease, cytokines secreted by PBMC of Chagas patients will be evaluated following flow cytometry involving individual residents of different endemic areas, where other strains of *T. cruzi* are found.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Cristina Tavares, Marisa Melo, and Jarbas Malta for the selection of patients. We are grateful to Carlos Luna for support in statistical analysis. We are also grateful to Mineo Nakazawa for his technical assistance. Y.M.G. is a recipient of a CNPq research fellowship. V.M.B.L. and A.F.A.V. were the recipients of a CAPES MSc scholarship during the study. R.C.A.M. and L.M.-S. were recipients of a PIBIC/Fiocruz scholarship.

#### REFERENCES

- World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 2002;905:109.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas' disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:603-612.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol 1997;114:103-110.
- Kierzenbaum F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;37:1-11.
- Kouskoff V, Korganov AS, Duchelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell 1996;87:811-822.
- Higuchi ML. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines, and microvascular abnormalities. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:263-267.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. Int Immunol 1994;6:499-506.
- Corrêa-Oliveira R, Gomes JAS, Lemos EM, et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:253-255.
- Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun 2003;71:31185-31193.
- Barros-Mazon S, Guarieto ME, Silva C, Coffman RL, Abrahamson IA. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. Clin Immunol 2004;111:137-145.
- Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. Infect Immun 2005;73:7960-7966.
- Cardoso GM, Morato MJ, Gomes JA, et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. Front Biosci 2006;11:158-163.
- Cetron MS, Basílio FP, Moraes AP, et al. Humoral and cellular immune response of adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. Am J Trop Med Hyg 1993;49:370-382.
- Mosca W, Piña J, Hulsch R, Celisios R. Longitudinal study of immune response in human Chagas' disease. J Clin Microbiol 1985;22:438-441.
- De Tito EH, Braun M, Lazzari JO, Segura EL. Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. Immunol Lett 1985;9:249-254.
- Morato MJ, Brener Z, Cancado JR, Nunes RM, Chian E, Gazzinelli G. Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. Am J Trop Med Hyg 1986;35:505-511.
- Gazzinelli RT, Leme VMC, Cancado R, Gazzinelli G, Schaufstein J. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. Infect Immun 1990;58:1437-1444.
- Michalowski V, Lührs K, Rocha MOC, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived panflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. Infect Immun 2003;71:3165-3171.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Rocha MOC, et al. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? Braz J Med Biol Res 1998;31:127-131.
- Ribeirão M, Pereira-Chioccola VL, Niu L, Augusto Fragata FA, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Parasite Immunol 2000;22:49-55.
- Abel LCJ, Rizzo LV, Ianni B, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Autoimmun 2001;17:99-108.
- Cuna WR, Encina JLR, Cuna CR. Interferon- $\gamma$  or IL-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. J Parasitol 2000;86:295-299.
- Amholdt AC, Plávenan MR, Russo DM, et al. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteine1 proteinase. J Immunol 1993;151:3171-3179.
- Loza M, González A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Am J Trop Med Hyg 1992;46:44-49.
- Motran CC, Serra HM, Gea SE, Vullio C, Vottero-Cima E. Antibody isotypes profiles against *Trypanosoma cruzi* antigens in two Andean populations from Chagas' disease endemic area. Acta Trop 1994;58:105-114.

## 98 Lorena et al.

26. Pereira VRA, Lorena VMB, Nakazawa M, et al. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003a;36:435-440.
27. Pereira VRA, Lorena VMB, Verçosa AFA, et al. Antibody isotype responses in BALB/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003b;98:823-825.
28. Pereira VRA, Lorena VMB, Galvão da Silva AP, et al. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitology* 2004;129:563-570.
29. Pereira VRA, Lorena VMB, Nakazawa M, et al. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57Bl/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2005;96:154-161.
30. Goldenberg S, Krieger MA, Lafaille JJ, Almeida E, Oelemann W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Butantan* 1991;53:71-76.
31. Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:427-434.
32. Gomes YM, Pereira VRA, Nakazawa M, et al. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguiños kit. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:497-501.
33. Gadeña AAM, Verçosa AFA, Lorena VMB, et al. Chagas's disease diagnostics: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test. *Vox Sang* 2003;85:165-170.
34. Silva ED, Pereira VRA, Gomes JAS, et al. Use of EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguiños kit to monitor cure of human Chagas' disease. *J Clin Lab Anal* 2002;16:132-136.
35. Verçosa AFA. Caracterização do perfil isotípico das imunoglobulinas G de indivíduos chagásicos anti os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Pat Trop* 2006;35:178.
36. Pereira VRA, Nakazawa M, Furtado C, Aharh FGC, Gomes YM. Immunodiagnosis of chronic Chagas disease using Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:367-370.
37. Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol* 2005;21:12581-12587.
38. Schleifer KW, Mansfield JM. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol* 1993;151:5492-5503.
39. De Wall Mäkelä R, Yssel H, Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cells clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754-4765.
40. Pinge-Filho P, Tafakoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1999;193:90-98.
41. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Bras J Med Biol Res* 1998;31:133-137.
42. Reis DD, Jones EM, Tostes S, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- $\alpha$  + cells and dominance of granulocyte A+, CD8 + lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:637-642.
43. Reis MM, Higuchi ML, Bavenusi LA, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R + in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:165-172.
44. Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* 1997;45:74-80.
45. Bachmaier K, Neu N, Pummerer C, et al. iNOS expression and nitrotyrosine formation in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. *Circulation* 1997;96:585-591.
46. Silva JS, Morrissey PJ, Grubstein KH, Mehler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992; 175:169-174.
47. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-822.
48. Trzeciowski P, Szmit E, Mysińska J, Dobyszyk A, Mysińska A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112:258-267.
49. Sanudo M, Montenegro-James S, Cabral M, et al. Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of *Trypanosoma cruzi* infections. *Acta Trop* 1998;69:89-97.
50. Lauzella SA, Postan M, Martín D, et al. Frequency of interferon- $\gamma$ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 2004;189:909-918.
51. Baroja ML, Ceuppens JL. More exact quantification of interleukin-2 production by addition of anti-Tac monoclonal antibody to cultures of stimulated lymphocytes. *J Immunol Methods* 1987; 98:267-270.
52. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995;188:117-128.