

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação *in vitro* da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o *Trypanosoma cruzi*

RECIFE
2017

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação *in vitro* da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

RECIFE

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S676a Soares, Ana Karine de Araújo.
Avaliação in vitro da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o *Trypanosoma cruzi* / Ana Karine de Araújo Soares.
- Recife: [s.n.], 2017.
124 p.: ilus.; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Yara de Miranda Gomes; coorientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.
1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Doença de Chagas - quimioterapia. 3. Imunidade inata. 4. Tripanossomicidas - uso terapêutico. 5. Doença Crônica. I. Gomes, Yara de Miranda. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

Ana Karine de Araújo Soares

Avaliação *in vitro* da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 04/05/2017

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz)

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

Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dedico este trabalho a DEUS,
pois sem Ele nada seria.
A minha pequena grande família,
Gilmário e Helena, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A JESUS CRISTO, o autor da minha fé, razão da minha esperança. Só tenho a agradecer por tudo que tenho e por tudo que sou. Nas piores horas estivestes sempre me carregando e me motivando a continuar. Obrigada por cada lágrima derramada, cada erro cometido, cada tristeza sentida, cada dificuldade passada... tudo foi um grande ensinamento para o meu crescimento pessoal e profissional! Maravilhoso és tu em minha vida.

Ao meu esposo Gilmário, pelo incentivo, motivação, apoio, encorajamento, auxílio, além das críticas construtivas que sempre me impulsionaram a buscar o melhor de mim. Obrigada por toda a compreensão e suporte nos momentos difíceis e por me fazer enxergar a imunologia com seus olhos! Te amo, meu Branco!

A minha filha Maria Helena, produto do amor, mágica da ciência e obra do criador. Razão da minha vida! Te amo incondicionalmente! Seu esforço e luta me ensinaram muito e me fizeram ter ânimo para chegar até aqui! Você é a minha guerreira!

A minha mãe Fátima, minha grande incentivadora, o meu agradecimento por tudo o que investiu em mim e por sempre acreditar que eu podia mais! Obrigada por nunca ter desistido de mim, te amo mãe!

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

A minha avó Carminha (*In MEMORIAN*), que me deixou no início dessa jornada, mas que me acompanhou e sempre me impulsionou a alcançar meu lugarzinho ao Sol. Saudades eternas!

A todos os meus familiares, que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins, me dando apoio e auxílio, amo todos vocês!

A minha orientadora, Dra. Yara Gomes, pela oportunidade e pelo exemplo de dedicação profissional. Sou eternamente grata por tudo!

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

A equipe TripoBenzo (Patrícia, Amanda, Arthur e Priscilla) que foi uma base sólida de trabalho. Com vocês o trabalho era mais leve, mais feliz! Esse trabalho é nosso! Sinto saudades de todos!

A equipe de Leishmaniose, alegria e torcida para os meus dias!

A dra. Regina Bressan que fez parte da construção final dos objetivos desse trabalho, ampliando nossos horizontes para enxergarmos mais além. Obrigada pelas valiosas aulas!

Ao amigo Mineo, que sempre teve uma palavra de ânimo nos momentos difíceis. Desde o início de PIBIC pude contar com essa valiosa pessoa que mesmo com tantos afazeres sempre tinha um instante para nos ajudar com paciência e dedicação.

A amiga Camila Carvalho, companheira de lutas, graduação e pos-graduação. Amiga mais chegada que irmã, companheira das horas boas e ruins. Você foi o começo de tudo, serei sempre grata!

A amiga Taciana Higyno, que me acompanha desde o mestrado e que o Senhor me deu o prazer de estarmos mais próximas no doutorado. Obrigada por tudo que me ensinou e pelo ombro, sempre que precisei!

A amiga Leyllane Rafael, que chegou quase no fim do segundo tempo, mas que foi para mim um braço direito na finalização dessa tese. Obrigada por tudo o que fez por mim!

A amiga Michelle Barros, que tornou os meus dias mais alegres e engraçados, sempre prestativa e ajudadora. Obrigada por tudo o que fez por mim!

Aos companheiros Cristiane Moutinho, Kamila Kássia e Diego. Bons momentos os que vive, tanta coisa aprendi com vocês que colaboraram e torceram para a conclusão desta minha etapa profissional. Com vocês fui sempre mais feliz!

As doutoras Clarice Lins, Joelma Rodrigues, Karla Luna, Milena Paiva por todo incentivo e carinho nas horas que mais precisei!

Aos amigos Hélio, Graça e Carmem que sempre deixaram meus almoços mais divertidos. Obrigada pelo apoio sempre que precisei, nunca vou esquecer aquela “caminha” preparada para minha pequena, tanto cuidado e carinho!

A todos os amigos que sempre me acompanharam e torceram por mim. Obrigada por sempre serem um refúgio de alegria nos momentos difíceis.

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

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

A equipe da Casa de Chagas (Procapes) pela colaboração na seleção dos pacientes.

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

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

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

(Provérbios 3.5-6)

SOARES, Ana Karine de Araújo. **Avaliação *in vitro* da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o *Trypanosoma cruzi*.** 2017. Tese (Doutorado em Biociência e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhaes, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

O benefício do Benzonidazol (Bz) aos portadores crônicos da doença de Chagas (DC) ainda demonstra controvérsias, mas seu uso pode ter a finalidade de prevenir/retardar a evolução da doença para as formas mais graves. Um dos principais fatores que pode influenciar na eficácia do tratamento é a possível cooperação entre os efeitos da droga e a resposta imunológica do hospedeiro. Nesse contexto, avaliamos a resposta imune de células aderentes obtidas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (de pacientes portadores da DC) submetidas ao tratamento com Bz após a infecção com *T. cruzi*. Amostras de sangue de portadores crônicos da DC (n = 7) e de indivíduos não infectados (n = 6) foram coletados para obtenção de PBMCs. As células foram cultivadas com *T. cruzi*, seguido de adição do Bz. Após o tempo de cultivo, os sobrenadantes foram coletados e armazenados, e as células foram avaliadas por citometria de fluxo, quanto à expressão de moléculas de superfície. Avaliamos também a produção de Óxido Nítrico (NO), a capacidade fagocítica, o índice de sobrevivência intracelular do parasita e por fim a morte celular. Os resultados mostraram que o Bz induz a regulação positiva de moléculas de ativação (CD80), de apresentação de antígenos (HLA-DR), e de fagocitose (CD64, CD35) e a morte celular das PBMCs pelo processo de necrose. Entretanto, não influencia na resposta inflamatória, nem na produção de NO, bem como, sobre a capacidade fagocítica e sobre o índice de sobrevivência intracelular dos parasitas. A presença do *T. cruzi* modulou negativamente a expressão de moléculas fagocíticas e inflamatórias (CD16a, CD11b e CD32) e positivamente a molécula fagocítica e de ativação CD64. Também induziu a produção de NO, pelas células aderentes. Os resultados apontam para a relevância do uso do Bz, por apresentar um conjunto de interações fármaco/resposta imune importantes para o equilíbrio imunológico frente ao *T. cruzi*, bem como por ser também um importante tripanocida.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, Benzonidazol, Monócitos/macrófagos.

SOARES, Ana Karine de Araújo. **In vitro evaluation of the action of benznidazole on adherent cells of chronic carriers of Chagas disease submitted to interaction with *Trypanosoma cruzi***. 2017. Thesis (Doctorate in Bioscience and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhaes, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

The benefit of Benznidazole (Bz) to chronic carriers of Chagas' disease (CD) is still controversial, but its use may be aimed at preventing/slowing the progression of the disease to more severe forms. One of the main factors that may influence the efficacy of the treatment is the possible cooperation between the effects of the drug and the immune response of the host. In this context, we evaluated the immune response of adherent cells obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (from patients with CD) submitted to Bz treatment after infection with *T. cruzi*. Blood samples from chronic CD (n = 7) and non-infected individuals (n = 6) were collected to obtain PBMCs. Cells were cultured with *T. cruzi*, followed by addition of Bz. After the culture time, the supernatants were collected and stored, and the cells were evaluated by flow cytometry for the expression of surface molecules. We also evaluated the production of nitric oxide (NO), phagocytic capacity, intracellular survival rate of the parasite and, finally, cell death. The results showed that Bz induces positive regulation of activation molecules (CD80), antigen presentation (HLA-DR), and phagocytosis (CD64, CD35) and cell death of PBMCs by the necrosis process. However, it does not influence the inflammatory response, nor the NO production, as well as the phagocytic capacity and the intracellular survival rate of the parasites. The presence of *T. cruzi* negatively modulated the expression of phagocytic and inflammatory molecules (CD16a, CD11b and CD32) and positively the phagocytic and CD64 activation molecule. It also induced the production of NO by adherent cells. The results point to the relevance of the use of Bz because it presents a set of important drug / immune response interactions for the immune balance against *T. cruzi*, as well as being an important trypanocidal agent.

Keywords: Chagas disease, Benznidazole, Monocytes/macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Países endêmicos na América Latina.....	21
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 3	Macrófago infectado com formas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 4	Apresentação de antígenos para células T.....	32
Quadro 1	Indivíduos participantes do estudo.....	42
Figura 5	Etapas do procedimento para obtenção de PBMC.....	44
Figura 6	Esquema do co-cultivo - Células aderentes, não aderentes, tripomastigotas e Benzonidazol.....	45
Figura 7	Co-cultivo de PBMC, <i>T. cruzi</i> e adição de tratamento com dose ótima e sub-ótima do Bz.....	50
Quadro 2	Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de otimização e padronização por citometria de fluxo.....	52
Figura 8	Exemplo de gráfico dot plot da aquisição de monócitos no citômetro de fluxo.....	53
Figura 9	Exemplo de análise de histograma das células aderentes no citômetro de fluxo.....	54
Figura 10	Exemplo de gráfico dot plot da aquisição das células aderentes após fagocitose das <i>beads</i> no citômetro de fluxo.....	55
Figura 11	Exemplo de aquisição e análise para a avaliação de necrose a apoptose no citômetro de fluxo.....	56
Quadro 3	Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.....	58
Quadro 4	Função de cada molécula de superfície.....	59
Figura 12	Comparação entre os níveis de expressão das moléculas de superfície CD3 ⁺ e CD14 ⁺ em PBMC, células aderentes e não aderentes nos diferentes intervalos de agitação.....	63
Figura 13	Gráfico dot plot exibindo a expressão da molécula de superfície CD14 ⁺ após a exposição a tripsina/EDTA em diferentes tempos de retirada e incubação.....	64
Figura 14	Avaliação da concentração do Bz através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD28 ⁺ presentes no co-cultivo e adição de BzO e BzSO.....	65

Figura 15	Avaliação da concentração do Bz através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo com BzO e BzSO.....	66
Figura 16	Avaliação dos tempos de cultivo <i>versus</i> resposta através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD28 ⁺ presentes no co-cultivo.....	67
Figura 17	Avaliação dos tempos de cultivo <i>versus</i> resposta através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo.....	68
Figura 18	Comparação da percentagem de células aderentes CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	69
Figura 19	Comparação da MIF da molécula HLA-DR em células CD14 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	70
Figura 20	Comparação da percentagem de células aderentes CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ CD80 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	71
Figura 21	Comparação da MIF da molécula CD80 em células CD14 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	72
Figura 22	Comparação da percentagem de células aderentes CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ CD86 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	73
Figura 23	Comparação da MIF da molécula CD86 em células CD14 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	73
Figura 24	Comparação da percentagem de células aderentes CD14 ⁺ CD16a ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	75
Figura 25	Comparação da MIF da molécula CD16a em células CD14 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	76
Figura 26	Comparação da percentagem de células aderentes CD14 ⁺ CD16a ⁺ CD11b ⁺ , CD14 ⁺ CD16a ⁺ CD32 ⁺ , CD14 ⁺ CD16a ⁺ CD35 ⁺ e CD14 ⁺ CD16a ⁺ CD64 ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d....	79
Figura 27	Comparação MIF das moléculas CD35, CD11b, CD64 e CD32 na superfície de células CD14 ⁺ CD16a ⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.....	81
Figura 28	Avaliação da produção de Óxido nítrico através da quantificação de nitrito nos tempos de 24h e 5d.....	83

Figura 29	Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas.....	84
Figura 30	Microscopia óptica (100x) das células aderentes após exposição ao Bz.....	85
Figura 31	Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes antes e após exposição ao Bz.....	86
Figura 32	Avaliação do processo de apoptose e necrose em linfócitos e monócitos nos tempos de 24h e 5d.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	A doença de Chagas e sua epidemiologia	21
2.2	Manifestações clínicas e aspectos laboratoriais da doença de Chagas	24
2.3	O Tratamento etiológico	26
2.3.1	Benzonidazol.....	26
2.4	Resposta imune na doença de Chagas	28
2.4.1	Resposta imune inata.....	28
2.4.1.1	<i>Monócitos/Macrófagos</i>	30
2.5	Resposta imune versus Benzonidazol	34
3	JUSTIFICATIVA	36
4	HIPÓTESE	37
5	OBJETIVOS	38
5.1	Objetivo geral	38
5.2	Objetivos específicos	38
6	MATERIAIS E MÉTODOS	39
6.1	Obtenção de formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i>	39
6.1.1	Cultivo de células Vero.....	39
6.1.2	Obtenção de tripomastigotas para Infecção das células Vero.....	39
6.2	População do estudo	40
6.3	Coleta de Sangue	43
6.4	Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	43
6.5	Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)	43
6.6	Otimização e padronização das condições experimentais	44
6.6.1	Otimização dos protocolos de Co-cultivo de PBMC, <i>T. cruzi</i> e adição de tratamento com Benzonidazol.....	44
6.6.2	Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura.....	46
6.6.3	Otimização do protocolo para a retirada das células da placa após a cultura.....	47

6.6.4	Otimização da infecção das células aderentes.....	48
6.6.5	Otimização da dose de Benzonidazol.....	49
6.6.6	Otimização da cinética de tempo de Co-cultivo <i>versus</i> concentração do Benzonidazol.....	50
6.6.7	Coleta de sobrenadante de cultura.....	51
6.6.8	Imunofenotipagem.....	51
6.6.8.1	<i>Aquisição e análise dos dados por Citometria de fluxo.....</i>	52
6.6.9	Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura através da técnica de Cytometric Beads Array - CBA.....	56
6.7	Co-cultivo células/tripomastigotas/Benzonidazol de INFEC e CN.....	56
6.8	Produção de Óxido Nítrico.....	57
6.9	Imunofenotipagem - Marcações de Superfície.....	58
6.10	Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas.....	59
6.11	Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes após exposição ao Benzonidazol.....	60
6.12	Avaliação da necrose e/ou apoptose em células aderentes.....	60
6.13	Aspectos éticos.....	61
6.14	Análises Estatísticas.....	61
7	RESULTADOS.....	62
7.1	Otimização dos protocolos de Co-cultivo de PBMC e <i>T. cruzi</i> e adição de tratamento com Benzonidazol.....	62
7.1.1	Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura.....	62
7.1.2	Otimização do protocolo para a retirada das células da placa após a cultura.....	63
7.1.3	Otimização da dose de Benzonidazol.....	64
7.1.4	Otimização da cinética de tempo de Co-cultivo <i>versus</i> concentração do Benzonidazol.....	66
7.2	Avaliação do perfil imunológico das células aderentes obtidas de PBMC tratadas com Bz após exposição a tripomastigotas.....	68
7.2.1	Avaliação do perfil de ativação e apresentação de antígenos das	

	células aderentes CD14 ⁺	69
7.2.2	Avaliação do perfil fagocítico e inflamatório das células aderentes CD14 ⁺ CD16a ⁺	74
7.2.3	Dosagem dos níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes tratadas com Benzonidazol após exposição à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	82
7.2.4	Avaliação do efeito do tratamento com o Benzonidazol sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas.....	83
7.2.5	Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes na presença ou ausência de Benzonidazol.....	85
7.2.6	Avaliação de morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	86
8	DISCUSSÃO	88
8.1	Avaliação do perfil imunológico das células aderentes obtidas de PBMC tratadas com Bz após exposição a tripomastigotas.....	88
8.1.1	Avaliação do perfil de ativação e apresentação de antígenos das células aderentes CD14 ⁺	88
8.1.2	Avaliação do perfil fagocítico e inflamatório das células aderentes CD14 ⁺ CD16a ⁺	90
8.2	Dosagem dos níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	93
8.3	Avaliação de morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	95
8.4	Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes na presença ou ausência de Bz.....	96
8.5	Avaliação de morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	97
9	CONCLUSÃO	100

REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE A - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente.....	115
APÊNDICE B – Termo de consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle.....	117
APÊNDICE C – Artigo Publicado.....	119
ANEXO A – Parecer do comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM.....	124

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas listadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e permanece como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, com um número de infectados no mundo de 6 - 7 milhões de pessoas e com menos de 1% dos indivíduos infectados recebendo tratamento etiológico.

Muitos são os estudos sobre a resposta imune dos portadores da DC, desenvolvimento e evolução clínica da doença, entretanto, pouco tem sido estudado sobre a resposta desses portadores ao tratamento etiológico. Estudos sobre a resposta imune dos portadores da DC mostraram que indivíduos assintomáticos são capazes de reduzir o número de parasitas na fase inicial da infecção e possuem mecanismos imunoregulatórios que limitam o desenvolvimento da doença para as formas mais graves da infecção. Por outro lado, indivíduos que desenvolvem as manifestações cardíacas, apesar de serem capazes de controlar a parasitemia, podem não serem capazes de elaborar uma resposta imunoregulatória eficiente, persistindo um perfil inflamatório. Isto demonstra o papel da resposta imunológica específica do hospedeiro frente à persistência do parasita nos tecidos, influenciando a evolução clínica na fase crônica. Estudos mostraram também que a cooperação entre a droga utilizada para o tratamento da DC e a resposta imune pode ser um importante fator na determinação da eficácia do tratamento, entretanto, pouco se conclui sobre qual o verdadeiro impacto do Benzonidazol (Bz) na resposta imunológica do hospedeiro, e se esta resposta imune potencializa ou não a ação do Bz, ou vice-versa.

No Brasil encontra-se disponível o fármaco Bz. Os resultados acerca do tratamento com o Bz variam de acordo com a fase da doença, o período de tratamento e a dose, a idade e a origem geográfica do paciente, com cerca de 70% dos portadores tratados na fase aguda apresentando cura. O benefício da medicação aos portadores crônicos ainda é controverso. Evidências de atenuação no curso de miocardites em animais infectados com *T. cruzi*, bem como estudos observacionais de indivíduos que mostraram negatização dos testes sorológicos e prevenção de alterações clínicas e eletrocardiográficas, vem ratificar o papel do tratamento etiológico no controle do curso da doença. Porém, estudos avaliando

pacientes após tratamento verificaram o fracasso da medicação na eliminação dos parasitas na fase crônica, não interferindo na progressão da doença.

Diante das evidências da relação entre o Bz e a resposta imune, o presente trabalho se propôs avaliar a resposta imune de células aderentes obtidas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores da DC submetidas ao tratamento com Bz após a interação *in vitro* com o *T. cruzi* a fim de observarmos as possíveis alterações dessas células. Com isso, compreender os mecanismos envolvidos na interação parasita/hospedeiro que estejam associados à droga antiparasitária.

Conhecer os efeitos do Bz sobre esta importante célula da resposta imune inata é de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, potencializando ou melhorando a sua eficácia, além de aumentar o conhecimento sobre os eventos decorrentes do tratamento etiológico com esse fármaco *in vivo*.

2 REFERENCIALTEÓRICO

2.1 A doença de Chagas e sua epidemiologia

A DC é caracterizada como sendo uma infecção tecidual e hematológica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A biologia do *T. cruzi*, bem como seus vetores, reservatórios, clínica da doença, epidemiologia e patologia, foram descobertas pelo então pesquisador Carlos Chagas (1879-1934) em 1909 no estado de Minas Gerais, Brasil (RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Essa é uma importante doença negligenciada distribuída por 21 países da América Latina e está associada às baixas condições socioeconômicas da população (Figura 1) (HOTEZ et al., 2007). Nessas regiões a DC é uma importante causa de morbidade e mortalidade (HOTEZ et al., 2007, 2012).

Figura 1 - Países endêmicos na América Latina.



Fonte: Andrade et al. (2011).

Aproximadamente, 6 - 7 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e cerca de 15 mil mortes são relacionadas à doença todos os anos (BARRET; CROFT, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos decorrentes de infecções adquiridas no

passado. As estimativas mais recentes no Brasil relativas ao número de pessoas infectadas por *T. cruzi* variam de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas (HOTEZ, FUGIWARA 2014; MARTINS-MELO et al., 2014). Com o aumento dos movimentos migratórios, países não endêmicos como Japão (aproximadamente, 3.000 indivíduos infectados), Estados Unidos (aproximadamente, 300.000 indivíduos infectados), Canadá (aproximadamente, 5.500 indivíduos infectados), Austrália (aproximadamente, 1.500 indivíduos infectados) e países da Europa (aproximadamente, 80.000 indivíduos infectados) relatam números crescentes de casos da doença em seus territórios (SCHMUNIS; YADON, 2010). Esses dados geram preocupação com relação aos métodos de detecção e tratamento nesses países, pois, por ser uma doença não endêmica nesses locais, torna-se muito importante que os profissionais de saúde estejam capacitados para reconhecer a doença, assegurando assim a interrupção de novos casos.

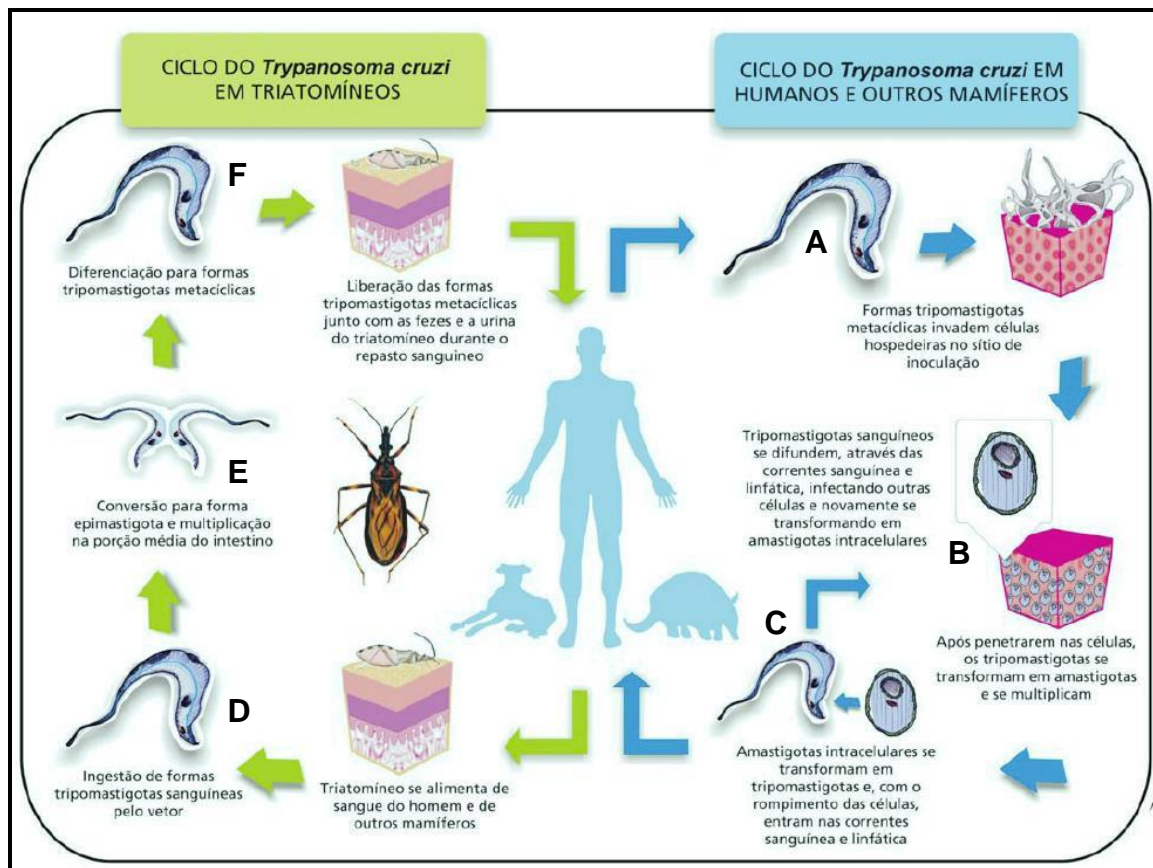
Esses dados demonstram que a DC não se trata mais de uma doença restrita apenas a América Latina, mas sim, uma preocupação mundial que sem a adequada contenção, pode vir a ter consequências graves para a saúde humana (COURA; VIÑAS 2010). O Brasil também tem recebido consideráveis fluxos migratórios de outros países endêmicos, como a Bolívia (SILVEIRA et al., 2013), levantando um alerta, no país, sobre políticas públicas de saúde que visem aumentar o nível de atenção a esta população de imigrantes (MARTES et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013).

Atualmente, há um claro deslocamento da prevalência da infecção pelo *T. cruzi* para faixas etárias mais avançadas no país (BRASIL, 2016). A via clássica de transmissão é a vetorial que ocorre através da inoculação das fezes contaminadas de insetos da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, o vetor mais importante da doença. Outras vias de infecção também podem ocorrer, como as vias oral, congênita, transfusional, transplante de órgãos contaminados e por acidentes laboratoriais (BRASIL, 2005).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inicia através do repasto sanguíneo do inseto vetor, popularmente conhecido como barbeiro. Ao se alimentar, o inseto elimina suas excretas contendo o parasita na forma de tripomastigota metacíclico (Figura 2A) que apresenta uma característica morfológica alongada. Ao entrar na pele lesionada, o parasita inicia o ciclo de infecção das células do hospedeiro. A forma intracelular do parasita é chamada de amastigota (Figura 2B), e caracteriza-se por apresentar

forma arredondada. Enquanto amastigota, o parasita inicia o processo de replicação por divisão binária. Após sucessivas replicações, o interior celular fica repleto de parasitas, que novamente mudam de forma, passando a tripomastigotas sanguíneos (Figura 2C). Com a ruptura celular, os tripomastigotas sanguíneos reiniciam o ciclo com a infecção de novas células. No vetor, o ciclo biológico se inicia quando o inseto se alimenta no homem ou em algum animal infectado e as formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 2D) são ingeridas junto com o sangue. No intestino, o parasita muda mais uma vez a sua morfologia, passando então para a forma epimastigota (Figura 2E). Nesta forma eles se multiplicam, por divisão binária em ciclos de aproximadamente 12 horas, e passam para a forma tripomastigota metacíclico (Figura 2F), forma infectante pronta para ser eliminada junto com as excretas do inseto (REY, 2001).

No Brasil, o controle vetorial por inseticidas foi instituído com o objetivo de conter a transmissão vetorial da doença a partir de 1975. Esse controle apresentou uma expressiva diminuição da transmissão do *T. cruzi* ao homem. Em 2006, o país recebeu a certificação internacional de interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans*, concedida pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e OMS (BRASIL, 2016). Apesar do expressivo controle vetorial, casos e surtos da doença por transmissão vetorial e oral (por ingestão de alimentos contaminados) ainda ocorrem em alguns estados do Brasil (BRASIL, 2016). Para os anos de 2000 a 2013 (Sinan, 2000 a 2013), verificou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos (1.081, 68,9%), seguida pela transmissão vetorial em 100 casos (6,4%).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Ribeiro (2016).

2.2 Manifestações clínicas e aspectos laboratoriais da doença de Chagas

A partir da avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas por portadores da DC, podemos classificá-la em duas fases: aguda e crônica. Na maioria dos casos, a fase aguda está associada com a alta parasitemia, além de sintomas como febre, mal-estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia (ANDRADE et al., 2011).

Devido à alta mortalidade em crianças e jovens (DIAS, 1987), o tratamento etiológico nessa fase é indicado, qualquer que tenha sido o mecanismo da infecção (ANDRADE et al., 2011; BRASIL, 2016). Com a alta parasitemia, o diagnóstico laboratorial nessa fase ocorre através de métodos parasitológicos para detecção do parasita circulante na corrente sanguínea (BRASIL, 2016). A evolução da fase aguda para a fase crônica ocorre a partir da diminuição das manifestações clínicas e da parasitemia. Portanto, a fase crônica, caracteriza-se principalmente pela baixa parasitemia, chegando a ser indetectável através de métodos parasitológicos diretos (LUQUETTI, 1987; ANDRADE et al., 2011; BRASIL, 2016). Por isso, o diagnóstico

pode ser realizado através de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-IgG (BRASIL, 2016).

Ainda com relação a fase crônica, três formas clínicas principais de grande importância médica podem ser descritas, as formas indeterminada (IND), cardíaca (CARD) e digestiva (DIG), que podem comprometer órgãos vitais do organismo. A forma IND foi reconhecida, já em 1916, por Carlos Chagas, e por ele conceituada para designar a infecção na “ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes”. Esta forma clínica caracteriza-se por apresentar eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais (BRASIL, 2016).

A forma CARD é considerada a principal responsável pela elevada morbidade e mortalidade da doença, ocorrendo na maioria dos pacientes sintomáticos da fase crônica (DIAS, 1989; BRASIL, 2016). Sua expressão clínica é caracterizada pela presença de sintomas, sinais físicos e alterações de exames laboratoriais simples, eletrocardiograma e a radiografia torácica (DIAS, 1989). A forma DIG, pode apresentar como principais manifestações clínicas, dilatações do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) que têm como características, infiltração linfocítica focal e degeneração neuronal com desnervação (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; BRASIL, 2016).

No entanto, não é possível prever a evolução clínica dos portadores. Cerca de 60-70% dos pacientes apresentam a forma IND ou assintomática da doença, 20-30% desenvolvem a forma CARD e 8-10% apresentam a forma DIG (RASSI Jr.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

As diferentes manifestações clínicas nessa fase podem ser conseqüências de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasita quanto ao hospedeiro. O tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo são aspectos relevantes relacionados ao *T. cruzi* (ANDRADE et al., 2002). Quanto ao hospedeiro, é importante considerar a faixa etária, o estado nutricional e, especialmente, as características imunológicas e genéticas (DIAS, 2000). O tratamento etiológico nessa fase ainda é controverso, devido aos baixos níveis de cura parasitológica (COURA et al., 1997).

2.3 Tratamento etiológico

2.3.1 Benzonidazol

O Bz é um composto derivado de 2-nitroimidazóis, os quais possuem atividade anti-parasitária comprovada na literatura desde a sua introdução para o tratamento da DC na década de 70. Sua estrutura química ainda atrai a atenção de muitos devido a sua semelhança com vários grupamentos presentes em constituintes fundamentais como proteínas e ácidos nucleicos (MAYENCEA et al., 2011), entretanto, os mecanismos por trás de seus efeitos tripanocidas bem como sobre as células do hospedeiro ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que esta droga leva a formação de metabólitos redutores que causam efeitos deletérios incluindo danos irreversíveis ao DNA do *T.cruzi* (HALL; WILKINSON, 2011).

Como resultado o Bz leva a geração de radicais livres e/ou metabólitos eletrolíticos, os quais têm potencial de afetar todas as macromoléculas do parasita. Entretanto, a falta de especificidade do Bz pode causar efeitos sistêmicos graves levando muitas vezes a suspensão e abandono do tratamento (CEVEY et al., 2016). Estes efeitos adversos incluem anorexia, vômito, polineuropatia, perda de peso, e dermatopatias alérgicas, provavelmente em consequência dos efeitos redutores/oxidativos danosos às células do hospedeiro (BRASIL, 2005). Por ser o único fármaco disponível, a resistência natural do parasita ao Bz pode ocorrer, influenciando também na sua eficácia em diferentes áreas geográficas (YUN et al., 2009).

Apesar dos seus efeitos tóxicos, até o presente momento não existem drogas superiores ao Bz para o tratamento da DC. Numerosos compostos naturais e sintéticos, tais como os derivados do alopurinol, ketaconazol e itraconazol têm sido testados, alguns destes, potentes inibidores da síntese de esterol e outras vias metabólicas do parasita. No entanto, por diversas razões, tais como insensibilidade ou resistência do parasita, solubilidade, toxicidade ou baixa eficácia clínica, a maioria destes compostos tem se mostrado inferiores ao Bz.

Estudos mais aprofundados sobre os efeitos a nível clínico e celular são bastante escassos, e por fim, as controversas com relação ao uso são agravadas

devido à ausência de exames que assegurem a total erradicação do parasita confirmando a cura da enfermidade após o tratamento (ANDRADE et al., 2011).

Indica-se o tratamento para todas as crianças com idade igual ou inferior a 12 anos em sua fase crônica, para os casos de infecção congênita, casos agudos, de pacientes na fase crônica recente, ou seja, de 5 a 12 anos após a infecção inicial, e para aqueles que estejam com a IND, CARD leve (sem dilatação da área cardíaca, e com fração de ejeção >55%) e DIG (BRASIL, 2016).

Tem sido demonstrado que a sua eficácia pode variar de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, a dose, a idade e a origem geográfica do paciente e o perfil imunológico do paciente (COURA; CASTRO, 2002). Cerca de 70% dos portadores tratados na fase aguda apresentam cura (MARIN-NETO et al., 2009), entretanto, na fase crônica a eficácia do Bz ainda é bastante controversa. Em adultos, a taxa de cura não ultrapassa 35% e em crianças, 60% (MOLINA et al., 2014; ROMANHA et al., 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que o tratamento pode ser benéfico ao paciente, evitando a progressão clínica da doença, independente da eliminação total do parasita (FRAGATA FILHO et al., 1995; GALLERANO; SOSA, 2001; GARCIA et al., 2005). Murcia et al. (2016), analisando o perfil parasitológico de 455 pacientes com DC crônica, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) demonstraram o efeito benéfico do Bz na negatificação da parasitemia na maioria dos pacientes 7 anos após o término do tratamento. Estudos clínicos preliminares sugerem que esse fármaco pode auxiliar na melhoria ou na estabilização do quadro clínico do paciente, sendo por isso, uma possível alternativa para a melhoria do prognóstico clínico na fase crônica (VIOTTI et al., 1994; CANÇADO et al., 2002; MARIN-NETO et al., 2008; MARIN-NETO et al., 2009).

Em uma avaliação, parte de um estudo maior o Benefit - *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*, multicêntrico, randomizado e prospectivo que contou com 2854 pacientes portadores da cardiomiopatia chagásica, tratados com Bz ou placebo por um período de 80 dias e acompanhados por aproximadamente 5 anos, foi demonstrado que a terapia tripanocida com o Bz reduziu significativamente a detecção do parasita no soro através da PCR, mas não reduziu de forma estatisticamente significativa a deterioração clínica cardíaca quando foi realizada a avaliação pelos 5 anos de acompanhamento (MORILLO et al., 2015).

2.4 Resposta imune na doença de Chagas

A resposta imune do hospedeiro frente ao *T. cruzi* é de grande importância na evolução da DC. Os mecanismos imunológicos são responsáveis pelo controle do parasita, mas também, responsáveis pela reação inflamatória localizada em alguns órgãos específicos (TEIXEIRA et al., 2002). A ausência de sintomas, ou o predomínio da forma IND, pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune anti-*T. cruzi*.

2.4.1 Resposta imune inata

Na resposta imune inata, os mecanismos envolvidos no controle do parasitismo intracelular do *T. cruzi*, durante a fase aguda, se iniciam com a produção dos interferons do tipo I (DE AVALOS et al., 2002), além de outras citocinas que terão como principal ação a ativação de macrófagos que produzirão moléculas efetoras tripanocidas, como o óxido nítrico (NO) que está envolvido com a resistência do hospedeiro a diversos patógenos, estando intimamente relacionado à destruição dos parasitas na DC (TEIXEIRA et al., 2002; KAYAMA; TAKEDA 2010). Células dendríticas, macrófagos e as células *Natural Killer* (NK), têm papel fundamental na defesa anti-*T. cruzi*. (TARLETON, 2007).

O controle da infecção pelo *T. cruzi* se inicia pela resposta imune inata com um importante papel na diminuição da replicação parasitária e consequentemente na migração do parasita para os tecidos do hospedeiro (KAYAMA; TAKEDA 2010). A resposta imune inata apresenta a capacidade de discriminar patógenos via Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), que são receptores desenvolvidos para reconhecer diferentes tipos de Padrões Moleculares Associados a Patógenos conhecidos como PAMPs. Diferentes classes de microorganismos, incluindo o *T. cruzi*, expressam diferentes PAMPs e acionam/ativam a resposta inata do hospedeiro (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). O sistema imune inato também tem a capacidade de reconhecer moléculas endógenas produzidas por células danificadas ou mortas conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Os PRRs são expressos por fagócitos, células dendríticas, células epiteliais e muitos outros tipos celulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Estão localizados na membrana plasmática ou na membrana endossômica e também no citoplasma.

Um exemplo de PRRs são os receptores *Toll-like* (TLRs) que apresentam especificidade para padrões de componentes microbianos, tais como estruturas de ácido nucleico, componentes da parede celular bacteriana e proteínas estruturais (ISHII et al., 2008). A associação dos PRRs com os PAMPs e DAMPs desencadeia eventos que promovem as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células em que são expressas além de orquestrar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (VÁZQUEZ et al., 2014; KUMAR et al., 2011). Existem diferentes classes de TLRs, que reconhecem diferentes tipos de PAMPs. Esses receptores são compostos de múltiplas repetições ricas em leucina que são úteis para o reconhecimento de vários PAMPs. A família de TLRs é constituída por pelo menos 10 membros (TLR1-TLR10) (BAFICA et al., 2006).

O primeiro TLR descrito no envolvimento da DC foi o TLR2, que juntamente com TLR4 e TLR9 são os TLRs mais importantes para a defesa inicial contra a infecção pelo *T. cruzi* (DOS SANTOS et al., 2016). Experimentos *in vitro* demonstraram que a baixa virulência de cepas de *T. cruzi* poderia levar a um aumento da produção de citocinas do tipo Th1, tais como IL-12 e TNF- α através de expressão elevada de TLR4. Cepas com elevada virulência induziram a uma diminuição da produção de TNF- α quando ocorreu uma baixa expressão de TLR4 (DA COSTA; SILVA; MENDES, 2014).

A resposta imune inata também apresenta receptores de reconhecimento para detecção de infecções ou danos celulares no citoplasma. Uma das classes principais são a de receptores semelhantes a NOD-like (proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica) (NLR). O reconhecimento de infecções intracelulares é de grande importância, já que, um grande número de microorganismos apresenta parte do seu ciclo normal de vida dentro da célula. A família NLR apresenta os subtipos moleculares NOD1 e NOD2 que estão presentes no citoplasma de diversos tipos celulares e respondem a peptidoglicanas da parede celular bacteriana (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

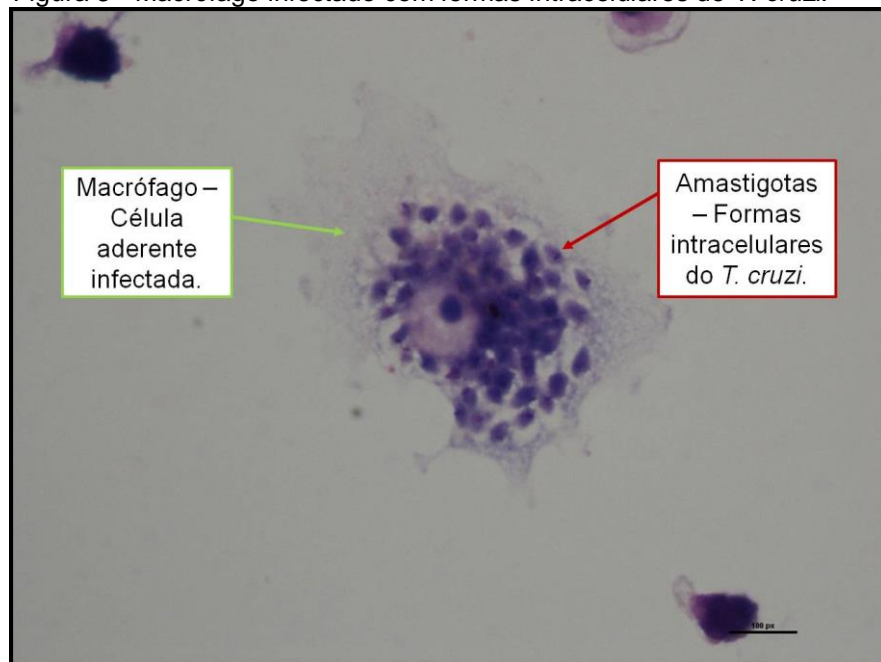
Silva et al. (2010), demonstraram que camundongos NOD1^{-/-} foram altamente susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, além de apresentarem aumento da parasitemia

e elevada mortalidade. Estes resultados sugerem que NOD1 é imprescindível no reconhecimento intracelular do *T. cruzi* (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

2.4.1.1 Monócitos/Macrófagos

A resposta imune inata apresenta diversos mecanismos associados para combater e/ou controlar a infecção inicial. Uma das principais células envolvidas nesse estágio da resposta imune é o Macrófago. A ativação dos macrófagos é importante para matar a forma intracelular obrigatória do *T. cruzi*, as amastigotas (Figura 3) (DOS SANTOS et al., 2016).

Figura 3 - Macrófago infectado com formas intracelulares de *T. cruzi*.



Fonte: Autora, 2015.

Com o início do processo de fagocitose, o fagossomo, um vacúolo formado pela invaginação da membrana celular e pelo material ingerido, amadurece para se tornar um fagolisossomo, uma organela membranar que se forma quando um fagossomo se funde com um lisossomo. Nessa organela o patógeno é morto por uma grande variedade de mecanismos microbicidas, entre eles: intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e peptídeos tóxicos. Os patógenos mortos são digeridos, principalmente através da ação de hidrolases, e os peptídeos microbianos alcançam o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) II. Os peptídeos

ligam-se à molécula de MHC, e os complexos são transferidos para a superfície celular, onde o complexo péptido/MHC II liga-se ao seu receptor de célula T resultando na ativação dos linfócitos (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

O processo de fagocitose mediado pelos macrófagos é capaz de estimular a produção de citocinas como IL-12 e TNF- α que estimularão também a produção da citocina IFN- γ (SILVA et al., 1992). Na DC experimental, a IFN- γ tem sido relatada como um fator de resistência ao parasita por apresentar uma importante função de contenção da parasitemia em camundongos infectados (MINOPRIO et al., 1986; REED, 1988; TORRICO et al., 1991). Entretanto, na DC humana, níveis elevados dessa citocina têm sido associados com a gravidade da doença cardíaca em pacientes na fase crônica (DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; BARROS-MAZON et al., 2004; LORENA et al., 2010). Macrófagos ativados pelo IFN- γ , controlam o crescimento parasitário intracelular através da produção NO (MAYA et al., 2010; BERGERON; OLIVIER 2016).

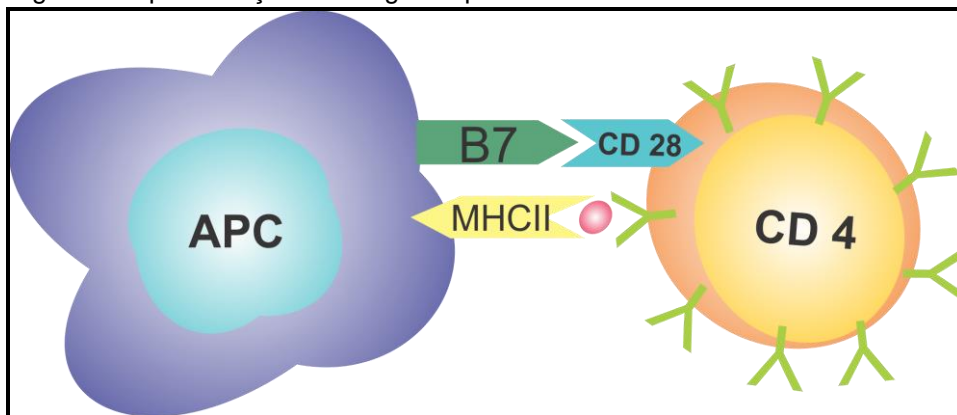
Na DC o IFN- γ apresenta um importante papel na resposta imune contra o *T. cruzi* uma vez que é um dos principais mecanismos responsáveis pela eliminação da forma intracelular deste parasita, apresentando ação citotóxica e citostática em parasitas intracelulares (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994; SAEFTEL; FLEISCHER; HOERAUF, 2001). Entretanto, seu acúmulo pode provocar danos teciduais (TATAKIHARA et al., 2015). Além de ser um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Os macrófagos (CD14⁺) também são conhecidos como Células Apresentadoras de Antígenos (APC) e/ou Células Aderentes por necessitarem de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a proliferação em cultura. Essas células têm papel essencial no controle da infecção pelo *T. cruzi*, por apresentarem como funções a secreção de citocinas e mediadores químicos, a captura, processamento e apresentação de antígenos para as células T (Figura 4). Os macrófagos apresentam em sua superfície moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86), que são importantes para promover a ativação e a diferenciação dos linfócitos T (FREEMAN et al., 1993a, 1993b).

A população de monócitos/macrófagos no sangue não é homogênea, apresentando subtipos baseados nas diferentes expressões das moléculas de

superfície CD14⁺ e CD16⁺ (DAYYANI et al., 2003). As subpopulações de monócitos/macrófagos são caracterizadas por CD14⁺CD16⁻ monócitos clássicos que representam aproximadamente 90-95% dos monócitos circulantes, e CD14⁺CD16⁺ monócitos pró-inflamatórios que correspondem apenas 10% do total de monócitos (ZIEGLER-HEITBROCK, 1996). Estas subpopulações divergem em alguns aspectos, tais como expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas. Os monócitos pró-inflamatórios CD14⁺CD16⁺ produzem concentrações elevadas da citocina TNF- α mas não da citocina IL-10, após estimulação com LPS (BELGE et al., 2002). Szaflarska et al., (2004), mostraram que após estimulação destas subpopulações de monócitos com células tumorais *in vitro*, foram encontradas expressões mais elevadas de NO sintase e produção de NO por monócitos CD14⁺CD16⁺.

Figura 4 - Apresentação de antígenos para células T.



Fonte: Autora, 2014.

Nota: Quando antígenos proteicos presentes no meio extracelular são fagocitados pelas APCs e confinados em vesículas citoplasmáticas, são transformados em peptídeos que passam a serem exibidos pelas moléculas do MHC de classe II que apresentam os antígenos aos receptores expressos na superfície dos linfócitos CD4⁺. Além disso, as APCs expressam em sua superfície moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e CD86⁺) que são reconhecidas por um receptor chamado de CD28⁺, expresso em praticamente todas as células T.

Em 2007, Molica, estudou o fenótipo de células mononucleares totais e células não aderentes, demonstrando que células CD14⁺ expressam moléculas HLA-DR⁺ (MHC de classe II), CD80⁺ e CD86⁺ com intensidade semelhante entre as formas clínicas nas culturas estimuladas ou não com *T. cruzi*. Entretanto, apesar de não haver diferença estatística foi possível observar no grupo dos pacientes portadores da forma IND uma expressão menor de moléculas HLA-DR⁺ e CD80⁺

sugerindo que a ativação dos linfócitos T por essas células poderia estar mais controlada.

Souza et al., (2004), quando estimularam células aderentes obtidas de PBMC com tripomastigotas vivos, observaram que monócitos de pacientes com a forma IND estão relacionados com a produção de IL-10, enquanto monócitos de pacientes com a forma CARD expressam TNF- α . A citocina IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da forma IND contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, os autores sugerem que pacientes portadores da IND, os quais são capazes de manter baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-10, poderiam não desenvolver a doença cardíaca.

Apesar de todo o empenho do sistema imunológico em combater o *T. cruzi*, na fase crônica, o parasita ainda persiste no organismo do hospedeiro em níveis baixos. Isso demonstra que o *T. cruzi* desenvolve mecanismos capazes de se evadir do sistema imunológico (NAGAJYOTHI et al., 2012), persistindo no hospedeiro na forma intracelular. Alguns Glico-inositol-fosfolipídios, encontrados na membrana celular de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, podem apresentar função supressiva na ativação das APCs, inibindo a secreção de citocinas como TNF- α e IL-12 (SILVA et al., 1998; VAN OVERTVELT et al., 1999; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002) e também induzindo a diminuição da expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86) (BRODSKYN et al., 2002). Antígenos liberados pelo parasita, como trans-sialidase e HSP70, induzem a apoptose de linfócitos (LEGUIZAMÓN et al., 1999; MARAÑÓN et al., 2000). Portanto, é possível que o parasita explore a apoptose das células hospedeiras para evadir da resposta imune (DOS REIS; LOPES 2009).

Estes mecanismos de inibição podem ser adicionados a uma lista de outros mecanismos de escape utilizados pelo *T. cruzi* para reduzir a eficácia da resposta imune do hospedeiro podendo explicar também a persistência dos parasitas e a lesão tecidual (RUSSO et al., 1993; KAYE et al., 1994; REINER, 1994; SAHA et al., 1995; LA FLAMME et al., 1997; OVERTVELT et al., 1999; PLANELLES et al., 2003; GOTO; LINDOSO 2004; BRODSKYN et al., 2002; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

2.5 Resposta imune *versus* Benzonidazol

Poucos são os estudos que relatam a influência do tratamento etiológico da DC sobre a resposta imune do hospedeiro. O que se sabe é que um dos principais fatores que podem influenciar na eficácia do tratamento da DC é a possível cooperação entre os efeitos da droga e a resposta imunológica do hospedeiro (OLIVIERI et al., 2002). Além disso, o tempo decorrido entre a infecção inicial e o início da quimioterapia também podem influenciar (SOSA-ESTANI et al., 2009). Divergências quanto a cura no tratamento etiológico da DC são recorrentes (DUFFY et al., 2009; AGUIAR et al., 2011; LAURIA-PIRES et al., 2000), entretanto, há convergência quanto a sua utilidade, a depender de circunstâncias, como: fase da doença, idade do paciente e condições associadas (BRASIL, 2005; FRAGATA FILHO et al., 1995; GALLERANO; SOSA, 2001).

A detecção de baixos níveis de parasitas circulantes em uma significativa parcela de indivíduos cronicamente infectados (GUTIERREZ et al., 2009) sugere que o ciclo de vida intracelular do parasita é ativo, intermitente, e pode ser a base para a terapia antiparasitária em indivíduos cronicamente infectados.

Bahia-Oliveira et al. (2000), demonstraram que indivíduos considerados curados após o tratamento com Bz produziram altos níveis de IFN- γ quando comparados ao grupo de não tratados. O tratamento com Bz conduz para um tipo de modulação positiva da resposta imune Th1, sendo a IL-10 um elemento chave para controlar o dano tecidual deletério que eventualmente pode ocorrer devido à resposta pró-inflamatória mediada pelo IFN- γ observada durante o tratamento específico (SATHLER-AVELAR et al., 2006).

Ao avaliar o fenótipo celular de seis crianças portadoras da forma IND submetidas ao tratamento, foi verificado que o Bz levou a uma maior ativação de monócitos circulantes, mas este fenômeno foi negativamente associado com o número de células CD14⁺IL-12⁺ (SATHLER-AVELAR et al., 2008). Por outro lado, Laucella et al. (2009), verificaram que pacientes submetidos ao tratamento apresentaram declínio de IFN- γ após 12 meses do tratamento sugerindo que o Bz induz uma mudança de fenótipo de linfócitos T efetores para células de memória. Cutrullis et al. (2011), estudaram a ação do tratamento com o Bz sobre a produção de auto-anticorpos anti-M2 do receptor muscarínico (anti-M2R AABS) com atividade

colinérgica e adrenérgica, associados com a patogênese em hospedeiros do *T. cruzi*, e o perfil de IFN- γ em 30 crianças na fase inicial da DC e 19 crianças não infectadas. Os resultados demonstraram que anti-M2R AABS e IFN- γ aumentam precocemente durante a infecção em crianças e com a utilização do Bz, esse perfil altera, observando uma diminuição de anti-M2R AABS e IFN- γ . Os autores sugerem a utilidade do tratamento precoce com o Bz, não apenas com o objetivo de eliminar o parasita, mas também para reduzir respostas imunes exacerbadas.

Bahia et al. (2012), demonstraram que em avaliação *in vivo* com camundongos infectados com uma cepa resistente de *T. cruzi* (cepa Colombiana), o Bz reduziu o número de células inflamatórias na fase crônica da infecção experimental quando comparado aos animais não tratados.

Apesar dos estudos existentes, pouco se conclui sobre qual o verdadeiro impacto do Bz na resposta imunológica do hospedeiro, e se esta resposta imune potencializa ou não a ação do Bz. Por isso, estudos que possam elucidar essas lacunas ainda existentes com relação a ação do Bz sobre a resposta imune do hospedeiro são de grande importância para uma adequação terapêutica eficiente.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao fato da DC ser uma doença altamente negligenciada pela indústria farmacêutica e ao limitado potencial comercial das drogas usadas para o seu tratamento, o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença não seja, talvez, uma perspectiva muito próxima. O Bz continua sendo a única alternativa disponível no Brasil para o tratamento da DC.

O Brasil apresenta aproximadamente de 1,9 a 4,6 milhões de indivíduos portadores da DC (MARTINS-MELO et al., 2014; HOTEZ, FUGIWARA 2014). No entanto, o uso do Bz por pacientes crônicos ainda é controverso e pouco estudado. As evidências apresentadas na literatura nos sugerem que o tratamento com esse fármaco seja uma ferramenta benéfica ao paciente cronicamente infectado, melhorando seu estado clínico e aumentando sua sobrevida. Após mais de 100 anos da descoberta da doença, um estudo multicêntrico chamado Benefit (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) (MARIN-NETO et al., 2008; MARIN-NETO et al., 2009; MOREIRA et al., 2012; MORILLO et al., 2015) para avaliar a eficácia do Bz em portadores da doença crônica foi realizado e suas conclusões estão sendo divulgadas agora, gerando grandes expectativas sobre a recomendação do Bz de forma consensual no tratamento da DC crônica. Os resultados podem auxiliar estes e outros estudos em andamento, no intuito de comprovar a indicação ou não do uso do Bz em pacientes crônicos.

Conhecer os fenômenos decorrentes da interação de formas tripomastigotas do *T. cruzi* com células da resposta imune inata de indivíduos portadores da infecção chagásica associado ao Bz tem grande importância para o entendimento dos primeiros eventos que ocorrem entre o parasito e o hospedeiro. Portanto, esperamos descrever alguns mecanismos que possam estar relacionados à resposta imune inata de indivíduos cronicamente infectados e submetidos ao tratamento com o Bz, além de contribuir através da identificação de possíveis estratégias futuras para a melhoria da adequação do tratamento, como também para diminuir a disseminação do parasita e a progressão da doença sintomática.

4 HIPÓTESE

Existe alteração no perfil fenotípico e na resposta imunológica de células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas, após a exposição ao tratamento com o Benzonidazol.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune de células aderentes obtidas de PBMC (de pacientes portadores da DC) submetidas ao tratamento com Bz após a infecção com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

5.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar e padronizar as condições experimentais;
- b) Avaliar o perfil imunocelular das células aderentes obtidas de PBMC tratadas com Bz após exposição a tripomastigotas (*Avaliar a expressão das moléculas CD14⁺, CD11b⁺, CD16a⁺, CD32⁺, CD35⁺, CD64⁺, HLA-DR⁺, CD80⁺, CD86⁺ em células aderentes*);
- c) Dosar os níveis de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*;
- d) Avaliar o efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas;
- e) Avaliar a capacidade fagocítica das células aderentes na presença ou ausência de Bz;
- f) Avaliar a morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas conforme descrito no item 6.1.2, para posterior infecção das células aderentes humanas. Todo o processo ocorreu em duas etapas, sendo a primeira o cultivo das células Vero, e a segunda a infecção dessas células com as formas tripomastigotas.

6.1.1 Cultivo de células Vero

As Células Vero (Oriundas de células epiteliais renais do macaco-verde africano - *Cercopithecus aethiops*) são muito utilizadas em cultivo celular como célula hospedeira de parasitas eucariotos, especialmente os Tripanosomatídeos, por desenvolverem bem o ciclo desses parasitas (CÂMARA et al., 2013). As células criopreservadas em meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (soro bovino fetal - SBF - 10%) contendo DMSO a 10% foram descongeladas em banho-maria, resuspendidas em 5ml de RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 22°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células foi ressuspenso em 5ml do meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF). A suspensão celular foi depositada em frascos de cultura contendo 5ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e incubada (37°C/5% CO₂) até a confluência total das células.

6.1.2 Obtenção de tripomastigotas para Infecção das células Vero

As formas tripomastigotas, da cepa Y, criopreservadas (10⁷ tripomastigotas/ml) foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, os tripomastigotas foram distribuídos em tubos Falcon (15ml) e 10ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto foi adicionado aos tubos para centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 22°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 5ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (2% SBF). A suspensão foi distribuída em garrafas de

cultura contendo células VERO e incubada por 24 horas em estufa (37°C/5% CO₂). Ao fim da incubação, o sobrenadante foi retirado para remoção dos parasitas que não infectaram as células. Foram adicionados mais 5ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e em seguida as culturas foram incubadas por 7 dias. Diariamente, as culturas foram observadas no microscópio invertido para verificação da multiplicação dos parasitas intracelulares. Após a ruptura celular, os tripomastigotas foram coletados para posteriores infecções das células Vero e das células não aderentes.

6.2 População do estudo

Sete portadores crônicos da DC (INFEC) (Quadro 01) foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Recife - PE, da Universidade de Pernambuco (UPE). Os INFEC incluídos no estudo atenderam os seguintes critérios:

- a) Possuir sorologia reagente para a infecção pelo *T. cruzi* através de dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes ou dois testes com princípios metodológicos diferentes;
- b) Possuir exames clínicos para caracterização da forma clínica;
- c) Não ter sido submetido ao tratamento etiológico;
- d) Não ter apresentado queixas digestivas como disfagia e/ou constipação;
- e) Não ter apresentado alteração leucocitária no hemograma.

Para a caracterização clínica dos INFEC (n = 7), foram realizados exames físicos e laboratoriais, como eletrocardiograma, ecocardiograma, radiografia de tórax e esôfago, além do enema opaco, quando necessário. Os exames clínicos permitiram a caracterização dos INFEC estabelecida pela I Diretriz Latino-Americana para Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Desta forma, os INFEC incluídos no estudo, foram classificados como: indeterminado A (não apresentaram sintomatologia clínica, nem alterações eletrocardiográficas) e cardíaco B1 (apresentaram alterações

eletrocardiográficas, alterações ecocardiográficas discretas, mas que não possuíam disfunção ventricular). Todas as informações acerca dos aspectos clínicos dos INFEC (forma clínica apresentada e presença de comorbidades) foram registradas no formulário de pesquisa específico, obtidas através dos prontuários e informadas pelos médicos responsáveis. Nesse formulário também foram registradas informações sociodemográficas como: idade, gênero e município de residência e de origem.

Foram selecionados também dezesseis indivíduos não infectados para realização das padronizações e para parte dos experimentos (CNP = 16) e seis indivíduos, também não infectados, para os experimentos de imunofenotipagem e dosagem de óxido nítrico (CN = 6) (Quadro 01). Os indivíduos não infectados atenderam os seguintes critérios de inclusão: não habitaram em áreas endêmicas; nunca receberam transfusão de sangue; apresentaram sorologia negativa para a infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, todos assinaram o TCLE e também forneceram informações para o preenchimento do formulário de pesquisa.

Quadro 1: Indivíduos participantes do estudo.

Grupos	Objetivos					
	PAD	IMUNOF	NO	AMA	FAG	NEC/APO
CN/CNP						
CNP01	X			X		
CNP02	X			X		
CNP03	X			X		
CNP04	X					
CNP05	X					
CNP06	X				X	X
CNP07	X					
CNP08	X					
CNP09	X					
CNP10	X					
CNP11	X					
CNP12	X					
CNP13	X					
CNP14	X					
CNP15						X
CNP16						X
CN01		X	X			
CN02		X	X			
CN03		X	X		X	
CN06		X	X			
CN07		X	X		X	
CN08		X	X			
INFEC						
HOUC458		X	X			
HOUC459		X	X			
HOUC460		X	X			
HOUC464		X	X			
HOUC465		X	X			
HOUC468		X	X			
HOUC470		X	X			

Fonte: Autora, 2017.

Nota: CNP: controle negativo para padronizações; CN: controle negativo; INFEC: infectados; HUOC: Hospital Universitário Oswaldo Cruz; PAD: padronizações; IMUNOF: imunofenotipagem; NO: avaliação de dosagem de óxido nítrico; AMA: avaliação de contagem de amastigotas intracelulares; FAG: avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes e NEC/APO: avaliação de necrose e/ou apoptose celular.

6.3 Coleta de Sangue

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

6.4 Confirmação da sorologia para a infecção pelo *T. cruzi*

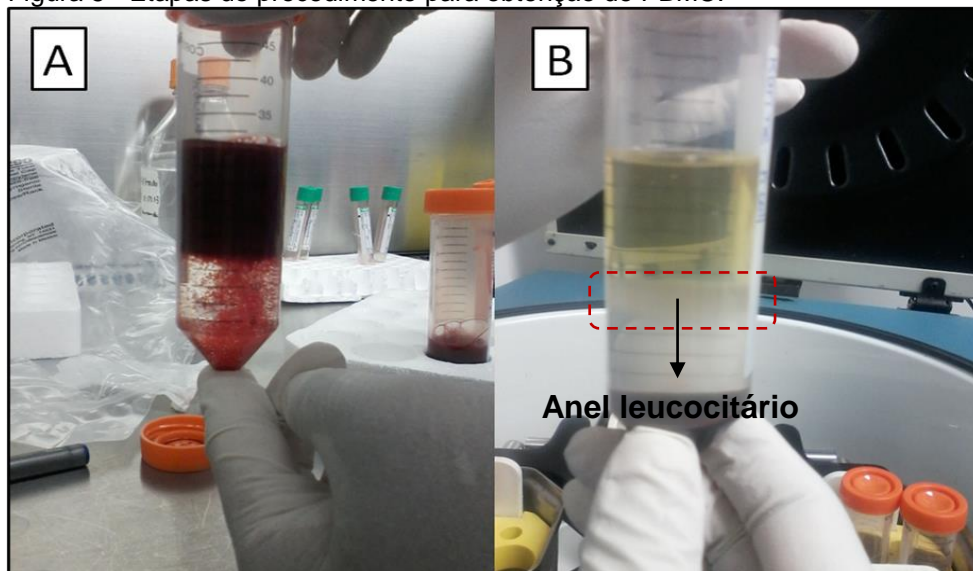
Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos com preparações antigênicas diferentes para a confirmação da infecção chagásica: o primeiro é constituído de uma mistura de extratos totais do *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagas test ELISA III) proveniente de Bioschile Ingenieria Genetica S. A.™ e o segundo utiliza Ag-Recs adsorvidos à placa (Imuno-ELISA Chagas) proveniente de Wama Diagnóstica™. Foram considerados reagentes os resultados reativos nos dois testes utilizados e não-reagentes os resultados que apresentaram não-reatividade nos dois testes (BRASIL, 2005). Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo instruções do fabricante. Amostras que se mantiverem discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas como inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

6.5 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Para realização do nosso estudo, obtivemos as Células Mononucleares de Sangue periférico que são os linfócitos (Células não aderentes) e os monócitos/macrófagos (células aderentes). Para obtenção das células, utilizamos a técnica de centrifugação do sangue em gradiente de densidade. O sangue coletado com heparina foi adicionado a tubos Falcon de 50ml (BD Falcon™), seguido da adição da solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril (pH 7,2), sendo a proporção de sangue/PBS de 1:2. Quinze mililitros dessa solução foram

adicionados a tubos de polipropileno (BD Falcon™; 50 ml) contendo 15ml de Ficoll-Hypaque PLUS™ (Amersham Biosciences), sendo o sangue adicionado sobre o Ficoll de forma inclinada com um ângulo aproximado de 45° para criar uma separação entre o Ficoll-Paque PLUS™ (Amersham Biosciences) e o sangue (1:2 sangue/PBS e Ficoll) (Figura 5A). Após a centrifugação a 900 x g por 30 minutos a 20°C, o anel de PBMC (Figura 5B) que se formou na interface entre o Ficoll e o plasma, foi removido e colocado em tubos de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 400 x g por 10 minutos em 14 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 2ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e, posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma™) em uma diluição de 1:10 (10µl da suspensão de células e 90µl do corante). O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10⁶ células/ml.

Figura 5 - Etapas do procedimento para obtenção de PBMC.



Fonte: Autora, 2014.

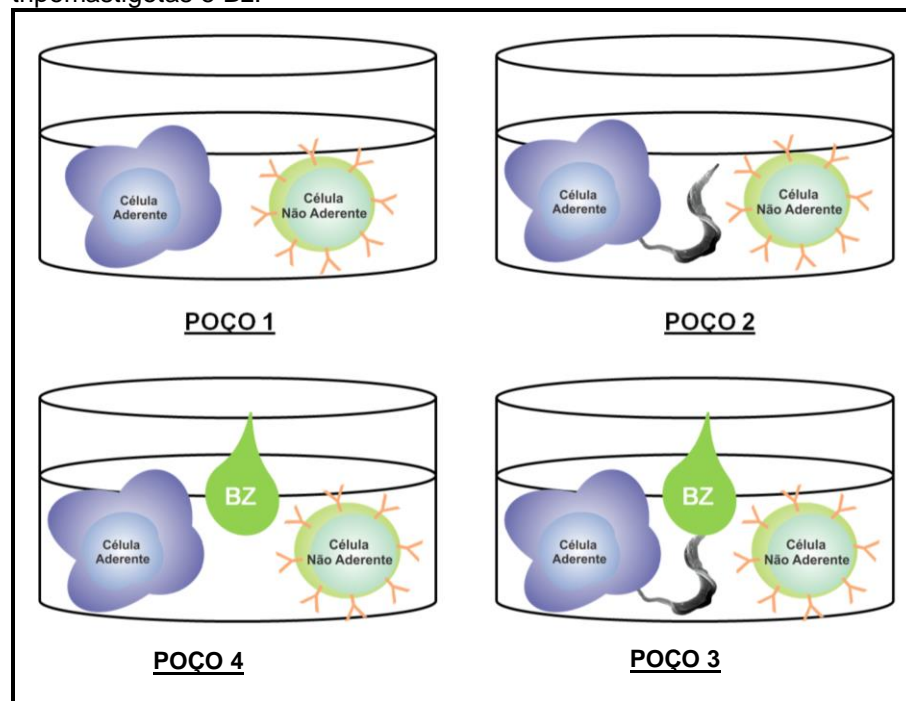
Legenda: (A) separação entre o Ficoll-Paque PLUS™ (Amersham Biosciences) e o sangue; (B) formação do anel leucocitário.

6.6 Otimização e padronização das condições experimentais

6.6.1 Otimização dos protocolos de Co-cultivo de PBMC, *T. cruzi* e adição de Bz

Para alcançarmos nossos objetivos, padronizamos o protocolo de cultivo celular para que a cultura fosse realizada da seguinte forma: as culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno contendo meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) para adesão das células aderentes (Figura 6 - Poço 1). Em seguida, as células não aderentes foram removidas e, posteriormente, as formas tripomastigotas foram adicionadas aos poços na concentração de 10^5 tripós/ml para infecção das células aderentes (Figura 6 - Poço 2). Após o período de incubação, as células não aderentes foram readicionadas ao cultivo, juntamente com o fármaco Bz na concentração de $1\mu\text{g/ml}$ e as placas incubadas (Figura 6 - Poço 3). Após o cultivo, as células foram retiradas para o procedimento de marcação de superfície e intracitoplasmática, sendo avaliadas por citometria de fluxo. Com a finalidade de otimizar essas etapas do co-cultivo, foram realizados experimentos definindo os protocolos que foram utilizados ao longo do trabalho.

Figura 6 - Esquema do co-cultivo - Células aderentes, não aderentes, tripomastigotas e Bz.



Fonte: Autora, 2015.

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

6.6.2 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura

Quando as PBMC são adicionadas aos poços das placas de cultivo, as células não aderentes tendem a se depositar no fundo do poço juntamente com as células aderentes. Com o objetivo de diminuir essa deposição, foi realizada a otimização do tempo de agitação da placa durante o período de 1 hora de cultivo das células aderentes, conforme Souza et al., (2007). Para isso, foi coletado sangue de dois indivíduos saudáveis em tubos contendo heparina, sendo 18ml de cada indivíduo (dois tubos de sangue de cada). Duas placas de 48 poços foram utilizadas para o cultivo das PBMC. Aos poços, foi adicionado 1ml de solução contendo 10^6 células/poço, sendo utilizados quatro poços em cada placa. As placas foram agitadas em tempos diferentes, sendo uma de 15 em 15 minutos (quatro momentos de agitação) e a outra de 30 em 30 minutos (dois momentos de agitação), durante 1 hora. Para verificar a porcentagem de células aderentes e não aderentes presentes na cultura, o sobrenadante contendo as células não aderentes foi retirado dos poços e adicionado em tubos de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml). Após a retirada dessas células, 1ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF) foi adicionado aos poços. Os tubos contendo as células não aderentes e as placas contendo as células aderentes foram incubados em estufa ($37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$) por um período de 24 horas. Após o tempo de cultivo, as células aderentes foram removidas dos poços com a adição de 500 μl da solução de tripsina/EDTA (solução salina tamponada contendo 2% de Tripsina – Fibco® e 0,2% de EDTA - Sigma™) por um período de 3 minutos sendo 2 minutos na estufa e 1 minuto sob forte agitação. As células foram colocadas em tubos de polipropileno (BD Falcon™; 15 ml) e, para bloquear a ação da tripsina, 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF) foi adicionado aos tubos. Em seguida, foi realizado o processo de imunofenotipagem das células aderentes, não aderentes e das PBMC utilizando 2,5 μl de anti-CD3 (conjugado ao fluorocromo PerCP) para marcação das células não aderentes e 2,0 μl de anti-CD14 (conjugado ao fluorocromo FITC) para marcação das células aderentes (conforme o item 6.6.3).

6.6.3 Otimização do protocolo para a retirada das células da placa após a cultura

Para otimizar o processo de retirada das células aderentes, foram utilizados dois métodos diferentes com a finalidade de retirar a maior quantidade possível de células. Para isso, amostras de sangue de um indivíduo saudável foram coletadas em tubos contendo heparina para obtenção de PBMC (conforme o item 6.5). Em seguida, 10^6 células/ml por poço foram adicionadas os poços da placa de cultura de 48 poços e incubadas em estufa ($37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$) por 24 horas. Foram utilizados os seguintes métodos:

- a) **Método 1:** solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 1 + 30 minutos de agitação no agitador mecânico (Incubator Shaker Series – Innova® 40) - Após o tempo de cultivo, foi retirado o sobrenadante de cultura do poço e colocado em tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) identificado. Em seguida, o poço foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto e a solução foi depositada nos tubos Falcon (BD Falcon™) já identificados. Aos poços foi adicionado 500 μl de tripsina, incubação por 3 minutos na estufa e forte agitação por 1 minuto. As células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) e a ação da tripsina foi bloqueada adicionando ao tubo 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF). Os tubos contendo as células foram incubados no agitador mecânico por 30 minutos a 37°C (Incubator Shaker Series – Innova® 40). Após a incubação as células foram lavadas com mais 8 ml de PBS-Wash e centrifugadas por 10 minutos à $400 \times g$. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1 ml de suspensão celular.
- b) **Método 2:** solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 1 + 60 minutos de agitação no agitador mecânico (Incubator Shaker Series – Innova® 40) - O protocolo foi seguido conforme o item "a - método 1" anterior com exceção do tempo de incubação final que foi de 60 minutos.
- c) **Método 3:** solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 2 + 30 minutos de agitação no agitador mecânico (Incubator Shaker Series – Innova® 40) - Após o tempo de cultivo, foi retirado o sobrenadante de cultura do poço e colocado em tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) identificado. Em seguida, o poço foi lavado com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto e a solução foi depositada

nos tubos Falcon (BD Falcon™) já identificados. Aos poços foi adicionado 500 µl de tripsina, incubação por 3 minutos na estufa e forte agitação por 3 minutos. As células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) e a ação da tripsina foi bloqueada adicionando ao tubo 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) completo (10% SBF). Os tubos contendo as células foram incubados no agitador mecânico por 30 minutos a 37°C (Incubator Shaker Series – Innova® 40). Após a incubação. As células foram lavadas com mais 8 ml de PBS-Wash e centrifugadas por 10 minutos à 400 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1 ml de suspensão celular.

- d) **Método 4:** solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 2 + 60 minutos de agitação no agitador mecânico (Incubator Shaker Series – Innova® 40) - O protocolo foi seguido conforme o item "c - método 3" anterior com exceção do tempo de incubação final que foi de 60 minutos.

Por fim, para verificarmos qual método (1, 2, 3 ou 4) atenderia aos nossos objetivos para os estudos das células aderentes, realizamos uma imunofenotipagem (conforme o item 6.6.8) das células CD14⁺ (anti-CD14 conjugado a FITC - 1,5µl).

6.6.4 Otimização da infecção das células aderentes

Para a infecção das células aderentes, formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram obtidas a partir de cultura de células Vero infectadas. O sobrenadante de cultura dessas células infectadas foi retirado e depositado em tubo de polipropileno (BD Falcon™; 15 ml). Cinco mililitros de meio RPMI incompleto foi adicionado para lavagem dos tripomastigotas por centrifugação (400 x g à 22°C por 10 minutos). Após as lavagens, os parasitas foram ressuspensos em 1ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e, posteriormente, contados em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma™) em uma diluição de 1:10 (10 µl da suspensão de células e 90 µl do corante). Em seguida, as formas tripomastigotas foram adicionadas às placas de 48 poços contendo as células aderentes, na concentração de 10⁵ tripomos/ml, segundo Souza et al., (2004). As células foram cultivadas por um período de 2 horas para a interiorização dos

tripomastigotas, onde os parasitas que não penetraram foram removidos por lavagem com meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF).

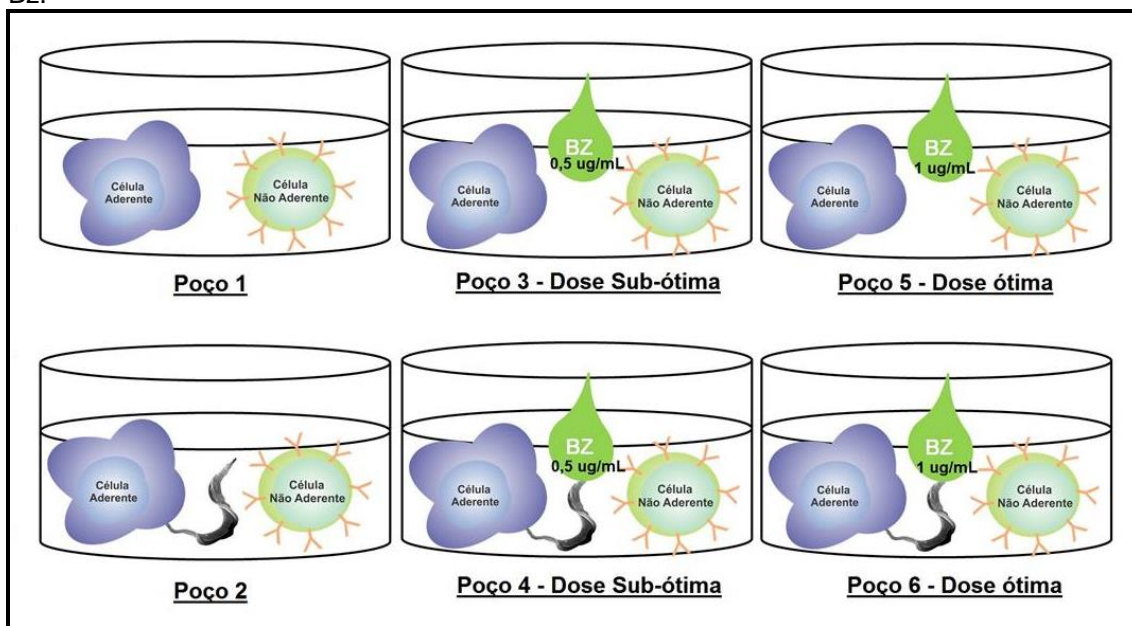
6.6.5 Otimização da dose de Benzonidazol

Com a finalidade de definir a melhor dose de uso do Bz, foi realizada uma otimização usando duas concentrações desse fármaco: dose sub-ótima (BzSO) (0,5 µg/ml) e dose ótima (BzO) (1 µg/ml), preconizada por Romanha et al., (2010), para utilização do fármaco em ensaios *in vitro*. Para essa otimização, amostras de sangue de um indivíduo saudável foram coletadas em tubos contendo heparina para obtenção de PBMC (conforme o item 6.5). Em seguida, 1ml da suspensão de células foi adicionado a cada poço com uma concentração de 10^6 células/ml. Ao todo, foram 6 poços em cada placa de 48 poços (foram usadas 5 placas). As células foram cultivadas em estufa (37°C/5%CO₂) durante 1 hora para adesão das células aderentes. Após a adesão, as células não aderentes foram retiradas de todos os poços e colocadas em tubo de polipropileno (BD Falcon™; 15 ml). Em seguida, os tripomastigotas foram adicionados aos poços (conforme o item 6.6.4). Os tubos contendo as células não aderentes e as placas contendo as células aderentes/tripomastigotas foram incubados na estufa por 2 horas. Subsequente ao tempo de incubação, os poços foram lavados com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto para retirada dos parasitas que não penetraram nas células e as células não aderentes foram readicionadas aos poços, juntamente com as doses do Bz (0,5 µg/ml e 1,0 µg/ml). Em seguida, as placas foram levadas à estufa e as células foram cultivadas durante 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias (Figura 7).

Ao final de cada tempo de cultivo, foi adicionado 500µl da solução de tripsina/EDTA para retirar as células aderentes dos poços. As células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) e a ação da tripsina foi bloqueada adicionando ao tubo 4ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF). As células foram lavadas com mais 8ml de PBS-Wash e centrifugadas por 10 minutos à 400 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1ml de suspensão celular. Em seguida, foi realizado o procedimento de imunofenotipagem (conforme o item 6.6.3)

e de CBA (*Cytometric Beads Array*) para avaliar as citocinas presentes no sobrenadante de cultura (IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) (conforme o item 6.6.9).

Figura 7 - Co-cultivo de PBMC, *T. cruzi* e adição de tratamento com dose ótima e sub-ótima do Bz.



Fonte: Autora, 2014.

Legenda – Poço 1: Células aderentes e células não aderentes; Poço 2: Células aderentes, não aderentes e tripomastigotas de *T. cruzi*; Poço 3: Células aderentes, não aderentes e BzSO₂; Poço 4: Células aderentes, células não aderentes, tripomastigotas de *T. cruzi* e BzSO₂; Poço 5: Células aderentes, não aderentes e BzO; Poço 6: Células aderentes, não aderentes, tripomastigotas de *T. cruzi* e BzO.

6.6.6 Otimização da cinética de tempo de Co-cultivo *versus* concentração do Benzonidazol

Para definirmos o tempo ideal para o co-cultivo das células, realizamos um ensaio com a amostra de um indivíduo saudável para avaliação da cinética, e a amostra de um indivíduo infectado para avaliar as doses do Bz. Foram coletados, aproximadamente, 40ml de sangue, e a partir dessa amostra foi obtido o PBMC, de acordo com o item 6.5. Após a obtenção do PBMC, foi realizada a etapa de adesão celular, descrito no item 6.6.1, utilizando o intervalo de agitação de 30 minutos. Após a adesão, as células não aderentes foram retiradas de todos os poços e colocadas em tubo de polipropileno (BD Falcon™; 15 ml). Em seguida, os tripomastigotas foram adicionados aos poços (conforme o item 6.6.4). Os tubos contendo as células não aderentes e as placas contendo as células aderentes/tripomastigotas foram incubados na estufa por 2 horas. Subsequente ao tempo de incubação, os poços

foram lavados com meio RPMI 1640 (Sigma™) incompleto para retirada dos parasitas que não penetraram nas células e as células não aderentes foram readicionadas aos poços, juntamente com a dose do Bz (1,0 µg/ml). Em seguida, as placas foram levadas à estufa e as células foram cultivadas durante 16h, 24h, 48h, 72h e 5 dias.

Ao final de cada tempo de cultivo, foi adicionado 500µl da solução de tripsina/EDTA para retirar as células aderentes dos poços. As células foram transferidas para o tubo de polipropileno (BD Falcon™ 15 ml) e a ação da tripsina foi bloqueada adicionando ao tubo 4ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF). As células foram lavadas com mais 8ml de PBS-Wash e centrifugadas por 10 minutos à 400 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da bomba a vácuo, deixando cerca de 1ml de suspensão celular. Em seguida, foi realizado o procedimento de imunofenotipagem (conforme o item 6.6.3) e de CBA (*Cytometric Beads Array*) para avaliar as citocinas presentes no sobrenadante de cultura (IFN-γ, TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) (conforme o item 6.6.9).

6.6.7 Coleta de sobrenadante de cultura

O sobrenadante de cultura foi coletado das placas antes da retirada das células aderentes para a realização da dosagem de NO. O sobrenadante foi estocado imediatamente a -20°C.

6.6.8 Imunofenotipagem

Para realização da imunofenotipagem, 500µl da suspensão celular foi depositado em tubo de poliestireno (BD Systems™, 5ml), seguido de lavagem com adição de 2 ml de PBS-Wash e centrifugação (400 x g por 5 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os anticorpos monoclonais de superfície (Quadro 2) conjugados a diferentes fluorocromos e previamente titulados, foram adicionados aos tubos e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.) e ao abrigo da luz. Com o fim do tempo de incubação, foram realizadas mais 2 lavagens sucessivas com a adição de 2ml de PBS-Wash e centrifugação a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram fixadas por 15

minutos com 150 µl da solução Cytofix (BD™ Systems). Em seguida, as células foram lavadas com 2ml de PBS-Wash e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 300µl de PBS-Wash foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram armazenados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Quadro 2 - Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de otimização e padronização por citometria de fluxo.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Volume (µl)	Fabricante
CD3	PerCP	S4.1(AKA 7D6)	1,5	Invitrogen
CD4	PerCP	S3.5	1,5	Invitrogen
CD28	PE	10F3	1,5	Invitrogen
CXCR3	PE	1C6/CXCR3	5	BD
CD14	FITC	TUK4	1,5	Invitrogen

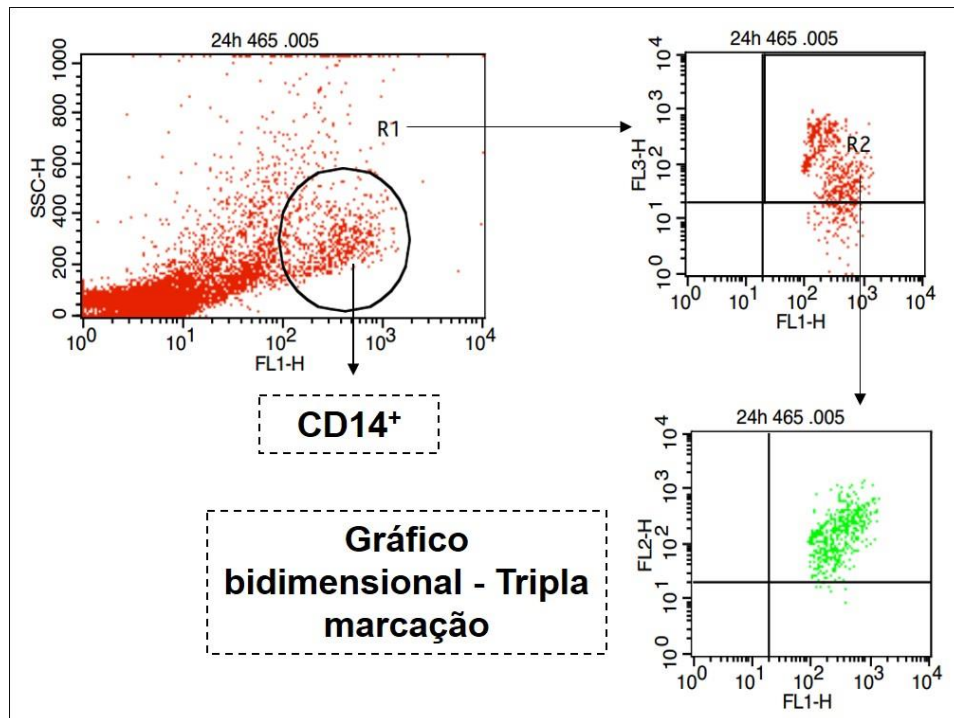
Fonte: Autora, 2017.

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

6.6.8.1 Aquisição e análise dos dados por Citometria de fluxo

O citômetro de fluxo utilizado foi o FACScalibur™ (Becton Dickson Immunocytometry Systems), localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) - CPqAM/Fiocruz. Para as analisarmos a porcentagem de células marcadas da população de células aderentes foi selecionado um *gate* R1 através de *dot plot* SSC *versus* FL1, sendo adquiridos 500 eventos dentro de R1. Após a seleção da janela de interesse (R1), as células CD14⁺, bem como as outras marcações de superfície (quadro 3) foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para realizar a análise da porcentagem das células CD14⁺ com expressão das moléculas de superfície foi selecionada a janela de interesse (R2) no gráfico FL1 *versus* FL3 ou *versus* FL4 (dependendo da molécula a ser analisada), obtendo gráficos bidimensionais representativos das células triplamente marcadas (Figura 8).

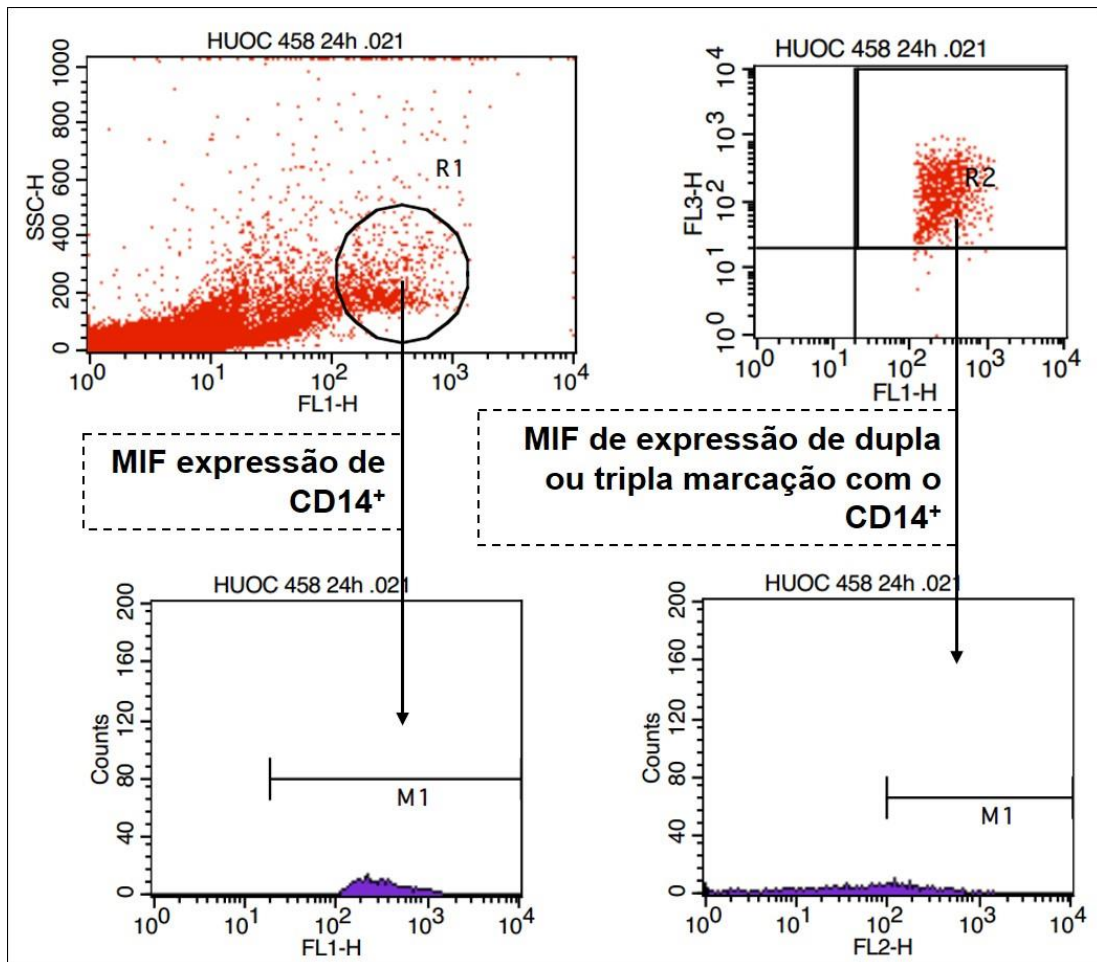
Figura 8 - Exemplo de gráfico dot plot da aquisição das células aderentes no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora a partir de Becton Dickson Immunocytometry Systems™, 2016.
 Legenda: SSC versus FL1, demonstrando a marcação para células CD14⁺; FL1 versus FL3 ou FL4, demonstrando a marcação de CD14⁺ versus CD16a⁺ ou HLA-DR⁺ (para FL3) ou versus CD11b⁺ (para FL4), sendo a partir desse gráfico, selecionadas as células duplo marcadas (R2), para posterior análise com as moléculas de superfície.

Para quantificarmos a intensidade de expressão das moléculas na superfície das células aderentes avaliamos os dados através de histogramas pela Média de Intensidade de Fluorescência (MIF). Selecionamos a MIF para a expressão do CD14⁺ a partir do *gate* R1 através de *dot plot* SSC versus FL1. Para avaliarmos as triplas marcações, obtivemos a MIF da molécula de interesse (FL3, FL2 ou FL4 - dependendo da molécula a ser analisada) através da janela de interesse (R2) no gráfico FL1 versus FL3, FL2 ou FL4 (dependendo da molécula a ser analisada), obtendo histogramas representativos das células triplamente marcadas (Figura 9).

Figura 9 - Exemplo de análise de histograma das células aderentes no citômetro de fluxo.

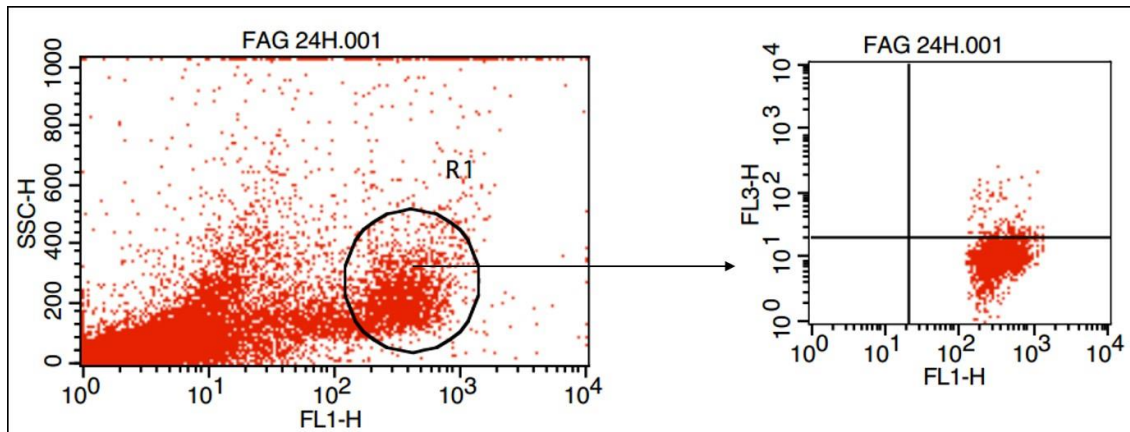


Fonte: A autora a partir de Becton Dickinson Immunocytometry Systems™, 2016.

Legenda: SSC versus FL1, demonstrando a marcação para células CD14⁺; FL1 versus FL3 ou FL4, demonstrando a marcação de CD14⁺ versus CD16a⁺ ou HLA-DR⁺ (para FL3) ou versus CD11b⁺ (para FL4), sendo a partir desse gráfico, selecionadas as células duplo marcadas (R2), para análise por histograma. MIF: Média de intensidade de fluorescência; CN: controle negativo.

Para verificarmos a capacidade fagocítica das células aderentes, foi selecionado um *gate* R1 através de *dot plot* SSC versus FL1, sendo adquiridos 500 eventos dentro de R1. Após a seleção da janela de interesse (R1) dentro da população das células CD14⁺, as *beads* fagocitadas foram analisadas através da obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, FL1 versus FL3 (Figura 10).

Figura 10 - Exemplo de gráfico dot plot da aquisição das células aderentes após fagocitose das *beads* no citômetro de fluxo.



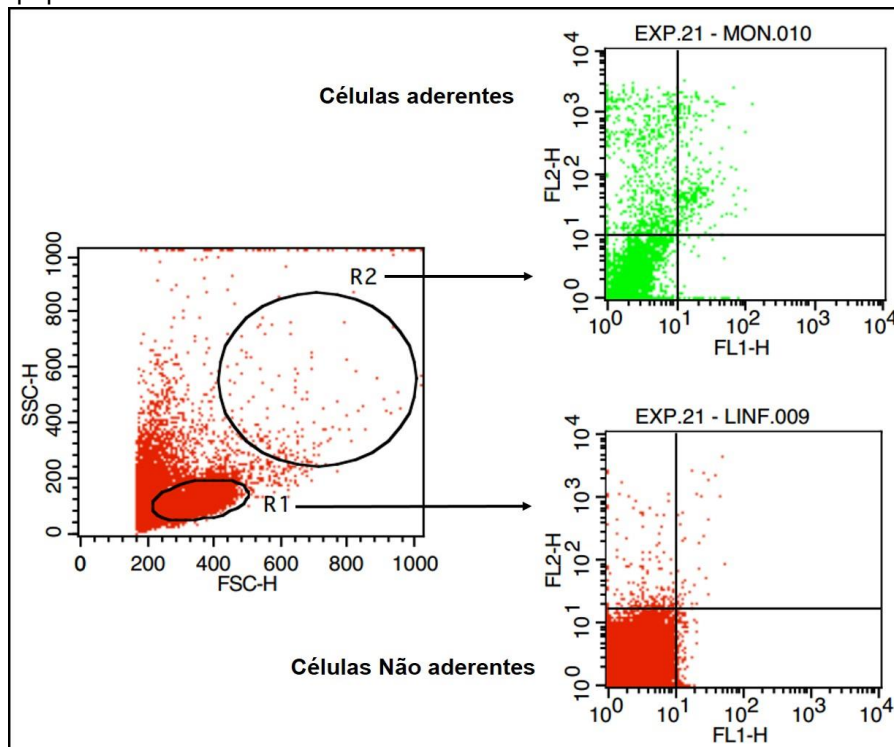
Fonte: A autora a partir de Becton Dickson Immunocytometry Systems™, 2016.

Legenda: SSC versus FL1, demonstrando a marcação para células CD14⁺; FL1 versus FL3, demonstrando a marcação de CD14⁺*beads* (para FL3).

Para avaliarmos o processo de necrose ou apoptose das células estudadas, realizamos as análises através do citômetro de fluxo. Esta técnica é destinada a detecção de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (que está translocada para a camada externa da célula no processo de apoptose) através da ligação com a Anexina V e da necrose através do iodeto de propídio que é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável, ou seja, desde que esteja em um processo de necrose celular.

Para aquisição e análise das amostras, selecionamos dois *gates*, um *gate* R1 através de *dot plot* SSC versus FSC para as células não aderentes sendo adquiridos (10.000 eventos) dentro de R1, e um *gate* R2 também através do *dot plot* SSC versus FSC para as células aderentes (1.000 eventos) dentro de R2. Após a seleção das janelas de interesse (R1 e R2), as células, foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para realizar a análise da presença da Anexina V e/ou do Iodeto de Propídio foi selecionada a janela de interesse (R1 ou R2) no *dot plot* SSC versus FSC para a obtenção do gráfico FL1 versus FL2, obtendo gráficos bidimensionais representativos da presença da Anexina V e/ou do Iodeto de Propídio nas células (Figura 11).

Figura 11 - Exemplo de aquisição e análise para a avaliação de necrose apoptose no citômetro de fluxo.



Fonte: A autora a partir de Becton Dickson Immunocytometry Systems™, 2016.

Legenda: SSC versus FSC, demonstrando a marcação para células de tamanho e granulosidade, respectivamente; FL1 versus FL2, demonstrando a marcação de necrose e apoptose, respectivamente. Sendo R1 a janela de interesse marcando a população de linfócitos ou células não aderentes e R2 a janela de interesse marcando a população de monócitos ou células aderentes.

6.6.9 Detecção dos níveis de citocinas através da técnica de *Cytometric Beads Array*

A técnica de *Cytometric Beads Array* - CBA foi utilizada para mensurar quantitativamente as citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. Essa técnica utiliza esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescências, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal FL-2. Todo o protocolo foi seguido conforme as orientações do fabricante.

6.7 Co-cultivo células/tripomastigotas/Benzonidazol de INFEC e CN

Para alcançarmos o objetivo de avaliar a imunofenotipagem das células aderentes obtidas de portadores crônicos da DC associado ao Bz, cultivamos as células em placas de poliestireno de 48 poços juntamente com os tripomastigotas e

o Bz nas seguintes condições experimentais: poço 1 - contendo apenas as células aderentes e não aderentes; poço 2 - contendo células + tripomastigotas; poço 3 - células + tripomastigotas + Bz e poço 4 - contendo células + Bz. As células foram adicionadas aos poços em uma concentração de 10^6 células/ml em meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF). Para adesão celular, as células foram incubadas por 1 hora, sendo agitadas em intervalos de 30 minutos. Após a incubação, o sobrenadante contendo as células não aderentes foi retirado e depositado em tubos de fundo cônico de polipropileno (BD Falcon™; 15 ml) previamente identificados. Após a retirada do sobrenadante, os tripomastigotas foram adicionados na concentração de 10^5 tripomastigotas/ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF) e incubados por 2 horas. Passada a incubação, os parasitas que permaneceram fora das células foram retirados através da adição de 1 ml de meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF), e desprezados. Após a lavagem dos poços para retirada dos parasitas remanescentes, as células não aderentes foram readicionadas aos poços juntamente com o fármaco Bz na concentração de $1 \mu\text{g/ml}$ e as células foram incubadas por 24 horas e 5 dias.

6.8 Produção de Óxido Nítrico

O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, sendo um potente parasiticida na DC produzido principalmente pelos macrófagos.

A dosagem de NO nos sobrenadantes de cultura foi realizada de forma indireta através da reação de Griess (GREEN et al., 1981), que detecta a presença de um dos produtos estáveis da síntese de NO – o nitrito (NO_2^-). Cem microlitros do sobrenadante de cultura de cada condição, foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços, acrescido de igual volume do reagente de Griess (1% de sulfanilamida a 0,1% com solução de naftilenodiamida a 0,1% ambas em ácido fosfórico 2,5%) e incubadas a T.A. por 10 minutos. A leitura foi realizada a 550 nm em espectrofotômetro e a concentração de nitrito determinada em referência à curva padrão de 0,078 a $10 \mu\text{M}$ de NaNO_2 .

6.9 Imunofenotipagem - Marcações de Superfície

Para realização da imunofenotipagem, 500µl da suspensão celular foi depositado em tubo de poliestireno (BD Systems™, 5ml), seguido de lavagem com adição de 2 ml de PBS-Wash e centrifugação (400 x g por 5 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os anticorpos monoclonais de superfície (Quadro 3) previamente otimizados quanto aos volumes, foram adicionados aos tubos e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.) e ao abrigo da luz. Com o fim do tempo de incubação, foram realizadas mais 2 lavagens sucessivas com a adição de 2ml de PBS-Wash e centrifugação a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram fixadas por 15 minutos com 150 µl da solução Cytotfix (BD™ Systems). Em seguida, as células foram lavadas com 2ml de PBS-Wash e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 300µl de PBS-Wash foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram armazenados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson). As características dos marcadores de superfície foram descritas no Quadro 4.

Quadro 3 - Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Volume (µl)	Fabricante
CD14	FITC	TUK4	1,5	Invitrogen
CD64	PE	10.1	5,0	BD
CD16a	PE-CY7	3G8	1,5	BD
CD11b	APC	D12	1,5	BD
CD32	APC	FLI8.26	10,0	BD
CD35	PE	E11	10,0	BD
HLA-DR	PerCP	Tü36	1,5	Invitrogen
CD80	PE	MEM-233	1,5	Invitrogen
CD86	PE	2331 (FUN-1)	1,5	BD

Fonte: Autora, 2017.

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

Quadro 4 - Função de cada molécula de superfície.

Anticorpos	Função
CD14	<i>Liga complexo de LPS e de proteína ligante de LPS; necessário para ativação de macrófagos induzida por LPS.</i>
CD64	Função na fagocitose, ativação de macrófago.
CD16a	Função na fagocitose e citotoxicidade celular dependente de anticorpo.
CD11b	Regula a adesão de leucócitos e a migração para a mediação da resposta inflamatória; função na fagocitose de partículas revestidas com iC3b.
CD32	Função na fagocitose.
CD35	Função na fagocitose de partículas revestidas com C3b ou C4b e complexos imunológicos; regula a ativação do Sistema Complemento.
HLA-DR	<i>MHC de classe II responsável pela apresentação de antígenos extracelulares em vesículas endocíticas.</i>
CD80	<i>B71/BB1 coestimulador para ativação de linfócito T; ligante para CD28 e CD152.</i>
CD86	<i>B72 coestimulador para ativação de linfócito T; ligante para CD28 e CD152.</i>

Fonte: A autora a partir de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012.

Legenda: CD: *Cluster of differentiation*; HLA-DR: Antígeno leucocitário humano; LPS: Lipopolissacarídeo; MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade.

6.10 Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas

Para avaliarmos a ação do Bz sobre os mecanismos de infecção intracelular de macrófagos pelas formas intracelulares, amastigotas. Foi seguido o protocolo descrito no tópico 6.7, com exceção de adicionarmos lamínulas de 13 mm no fundo dos poços antes de iniciar o cultivo. Após o tempo de incubação de 24h, os macrófagos aderidos nas lamínulas de 13 mm e infectados com formas amastigotas de *T. cruzi* cepa Y foram fixados em metanol por 5 minutos e corados em solução de Giemsa (1:20) em água destilada (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas e montadas em lâminas com entellan. As formas amastigotas foram contadas em triplicatas. Sendo realizada a contagem de 300 macrófagos por lamínula.

6.11 Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes após exposição ao Benzonidazol

Para avaliarmos a capacidade fagocítica das células aderentes nós coletamos o sangue de três indivíduos não infectados e cultivamos como descrito no tópico 6.7 (com algumas alterações), entretanto na presença de microesferas fluorescentes de poliestireno. Expomos as células ao Bz (1µg/ml) por 24h, 48h e 5d. Logo após os tempos de incubação expomos às células à microesferas de poliestireno (*beads*) diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% SBF), na concentração de 6×10^5 *beads*/ml por um período de 1h. A concentração de *beads* adicionadas a cada condição de cultivo, foi calculada segundo Pacheco et al., 2012, que indicava o uso de 25 partículas por célula. Sendo assim, temos $2,5 \times 10^4$ monócitos/ml que multiplicado por 25 *bedas* obtivemos o valor de $6,2 \times 10^5$ *beads*/ml. Após a exposição, as células foram retiradas dos poços e adicionadas aos tubos de poliestireno (BD Systems™, 5ml); foram lavadas com 1ml PBS e centrifugadas à 400 x g. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e adicionamos 300µl de PBS para posterior análise no citômetro de fluxo.

6.12 Avaliação da necrose e/ou apoptose em células aderentes

Para realização da avaliação de morte celular, por necrose ou apoptose, coletamos o sangue de três indivíduos não infectados e realizamos todo o protocolo de co-cultivo celular descrito no item 6.7. Após o período de incubação das células (24h e 5 dias), retiramos as células de cada poço, depositando 1 ml da suspensão celular em tubos de poliestireno (BD Systems™, 5ml), seguido de duas lavagens com adição de 1 ml de PBS e centrifugação (800 x g por 10 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 300µl de PBS. A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson). Para a avaliação utilizamos o *kit AnnexinV-FITC Apoptosis Detection* comercializado pela BD Pharmingen™. No momento da aquisição, adicionamos a cada tudo 2 µl do Iodeto de Propídio (marcador de necrose) e 2 µl da Anexina V (marcador de Apoptose). Incubamos por 15 minutos a

T.A. ao abrigo da luz e por fim, analisamos através da citometria. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

6.13 Aspectos éticos

As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (ANEXO A) (CAEE 07511612.2.0000.5190).

6.14 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados de perfil celular foi realizada através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Para confirmação do pressuposto de homogeneidade foi utilizado o teste de D'Agostino. Para comparar as médias de expressão de moléculas de superfície entre os grupos INFEC e CNP/CN utilizamos o teste para médias Anova seguido do teste de Tukey, quando o pressuposto de homogeneidade foi confirmado. Quando o pressuposto de homogeneidade não foi confirmado, utilizamos o teste de Mann-Whitney para avaliação entre grupos. Os resultados entre as condições experimentais foram avaliados através do teste de Wilcoxon (para amostras pareadas não paramétricas). Todas as conclusões estatísticas foram tomadas a um nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

Devido a necessidade de estabelecermos um protocolo de cultivo para os testes com o Bz e os tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, experimentos foram realizados com a finalidade de padronizarmos e otimizarmos todas as etapas envolvidas no modelo experimental.

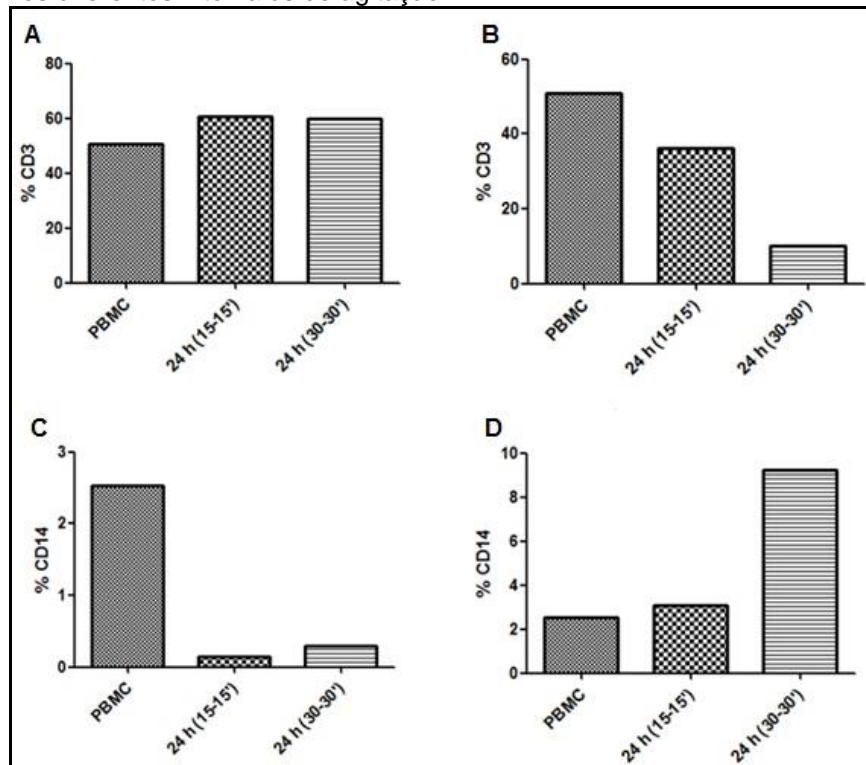
7.1 Otimização dos protocolos de Co-cultivo de PBMC e *T. cruzi* e adição de tratamento com Benzonidazol

7.1.1 Otimização do tempo ideal de agitação das placas de cultura

Para definirmos o melhor método de separação das células aderentes (monócitos) das não aderentes (linfócitos), realizamos a avaliação da presença das células CD3⁺ (células não aderentes) das células CD14⁺ (células aderentes) em PBMC de indivíduos não infectados.

Os resultados mostraram uma menor porcentagem (10,23%) de expressão da molécula de superfície CD3⁺, nas células que ficaram na placa, no tempo de agitação de 30 em 30 minutos em comparação ao tempo de agitação de 15 em 15 minutos (36,55%) (Figura 12B). Além disso, observamos níveis aumentados de CD14⁺ (marcador de monócitos - células aderentes) nas células aderentes no tempo de agitação com intervalos de 30 minutos (9,21%) quando comparado ao tempo de agitação com intervalos de 15 minutos (3,07%) (Figura 12D). Com relação às células não aderentes, não observamos diferenças entre os tempos de agitação quando avaliamos os níveis de células CD3⁺ e CD14⁺ (Figura 13A e C, respectivamente). Desta forma, o tempo de agitação escolhido foi o de 30 em 30 minutos, devido à menor quantidade de células não aderentes (CD3⁺) que se depositaram no fundo do poço e, também, à maior porcentagem de células CD14⁺ na população de células aderentes, em comparação com a agitação de 15 em 15 minutos.

Figura 12 - Comparação entre os níveis de expressão das moléculas de superfície CD3⁺ e CD14⁺ em PBMC, células aderentes e não aderentes nos diferentes intervalos de agitação.



Fonte: Autora, 2015.

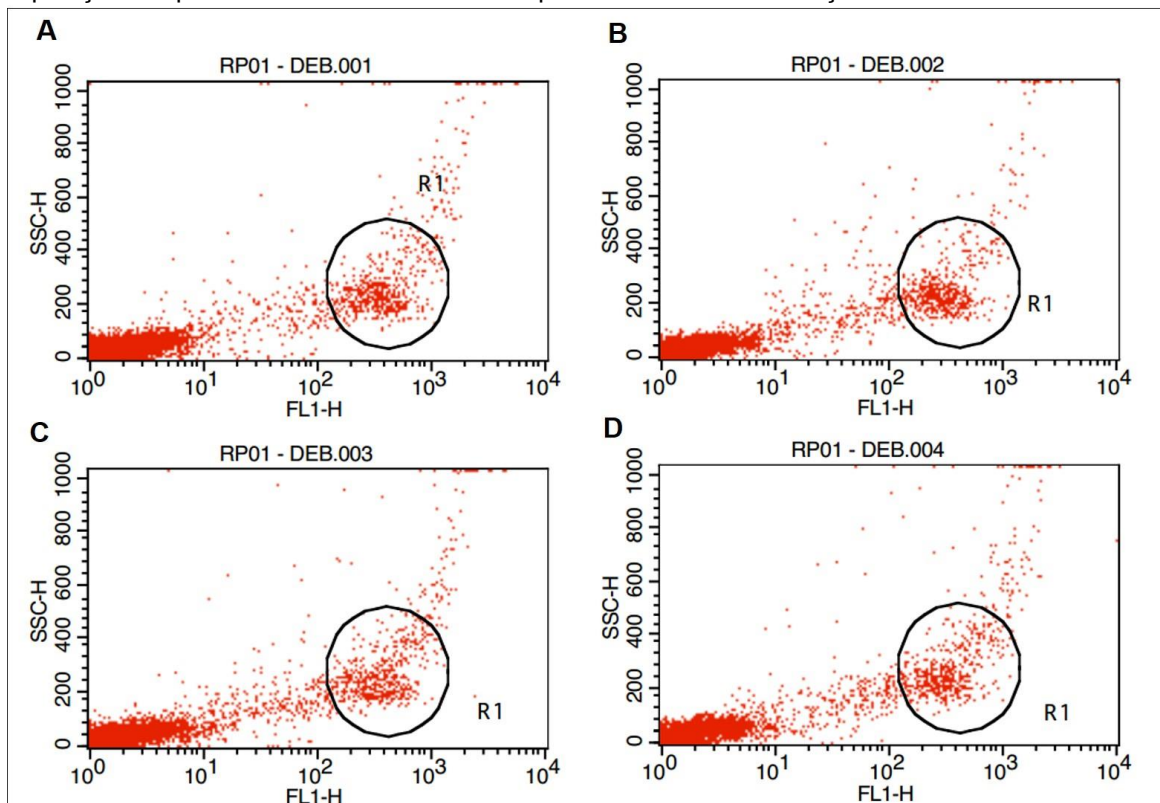
Legenda: (A) Porcentagem da expressão de CD3⁺ no PBMC e em células não aderentes nos diferentes intervalos de agitação; (B) Porcentagem da expressão de CD3⁺ no PBMC e em células aderentes nos diferentes intervalos de agitação; (C) Expressão de CD14⁺ no PBMC e em células não aderentes nos diferentes intervalos de agitação; (D) Expressão de CD14⁺ no PBMC e em células aderentes nos diferentes intervalos de agitação

7.1.2 Otimização do protocolo para a retirada das células da placa após a cultura

Também otimizamos o processo de retirada das células aderentes com o objetivo de não ocasionar danos às células, não afetando assim as análises de imunofenotipagem.

Com relação aos métodos de retiradas das células não aderentes das placas após o cultivo, não verificamos diferenças significativas quanto ao nível de expressão das células CD14⁺ entre os métodos utilizados (Figura 13A, B, C e D). Entretanto, observamos um aumento na população de células CD14⁺ (FL1) quando visualizamos o *dot plot* SSC x FL1 (Figura 13B). Desta forma, o método escolhido para ser usado nos protocolos foi o método 2 (Tripsina/EDTA - 2% - 60 minutos de agitação a 37°C).

Figura 13 - Gráfico dot plot exibindo a expressão da molécula de superfície CD14⁺ após a exposição a tripsina/EDTA em diferentes tempos de retirada e incubação.



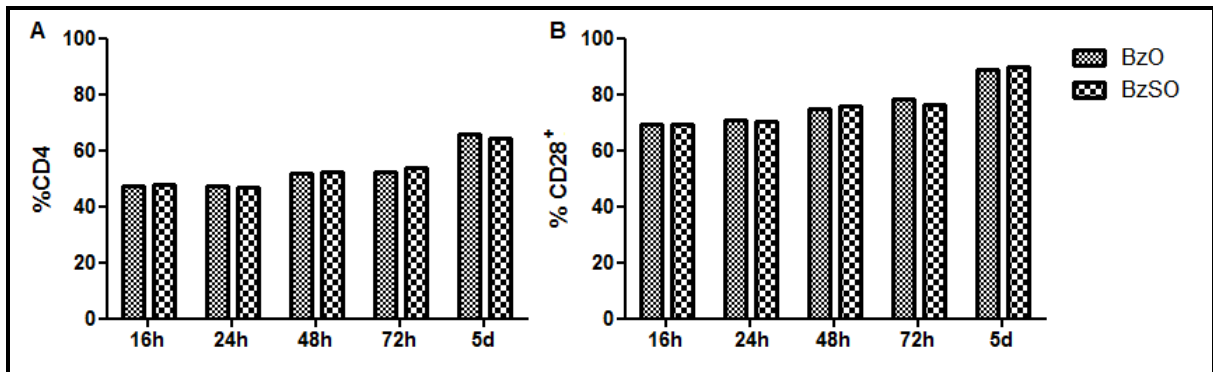
Fonte: A autora a partir de Becton Dickson Immunocytometry Systems™ (2014).

Legenda: SSC (*Side Scatter* - Dispersão lateral) versus FL1 (*Fluorescence 1*), demonstrando a marcação no *gate* R1 para monócitos. (A) Expressão de CD14⁺ (FL1) solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 1 + 30 minutos de agitação no agitador mecânico 37°C; (B) expressão de CD14⁺ (FL1) após exposição solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 1 + 60 minutos de agitação no agitador mecânico a 37°C; (C) expressão de CD14⁺ (FL1) após a exposição a solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 2 + 30 minutos de agitação no agitador mecânico a 37°C; (D) expressão de CD14⁺ (FL1) após a exposição a solução de tripsina/EDTA (2%) tempo 2 + 30 minutos de agitação no agitador mecânico a 37°C.

7.1.3 Otimização da dose de Benzimidazol

Quanto à dose do Bz, não observamos diferenças quando comparamos os níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ entre as duas concentrações utilizadas (BzO e BzSO) na cultura C+T+Bz nos tempos de cultivos avaliados (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação da concentração do Bz através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ presentes no co-cultivo e adição de BzO e BzSO.

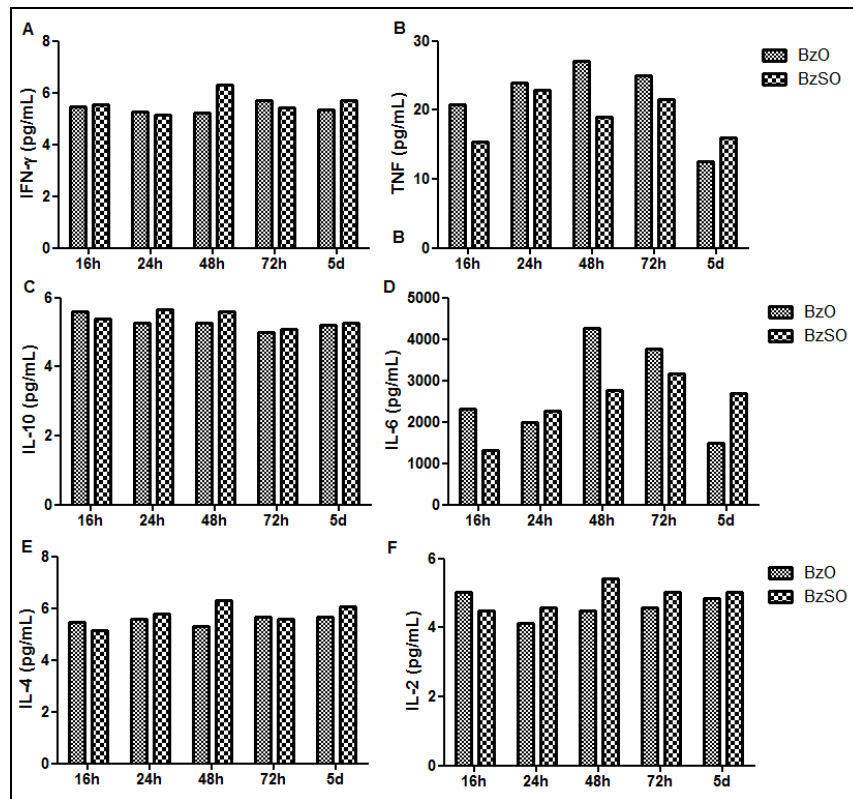


Fonte: Autora, 2014.

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

Também não verificamos diferenças entre as concentrações analisadas quanto à produção de citocinas no sobrenadante de cultura nos tempos de cultivos avaliados (Figura 15). Desta forma, a dose do Bz escolhida foi a de 1 µg/ml, uma vez que essa é a concentração preconizada para o uso desse fármaco em ensaios *in vitro* (ROMANHA et al., 2010).

Figura 15 - Avaliação da concentração do Bz através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo com BzO e BzSO.



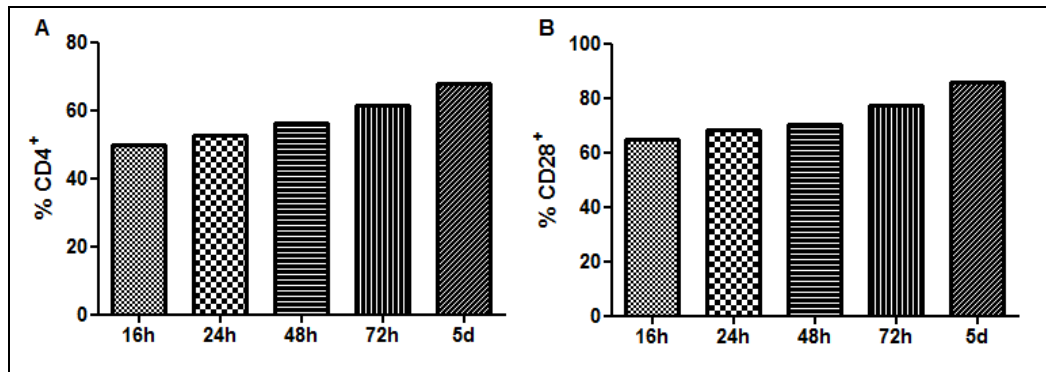
Fonte: Autora, 2014.

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

7.1.4 Otimização da cinética de tempo de Co-cultivo *versus* concentração do Benzimidazol

Com relação à otimização do tempo de cultivo *versus* resposta, avaliamos os níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ presentes no co-cultivo de PBMC, tripomastigotas e Bz e, avaliamos também, a produção de citocinas no sobrenadante desse cultivo. Verificamos que os níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ aumentaram conforme maiores foram os tempos de cultivos (Figura 16A e B, respectivamente).

Figura 16 - Avaliação dos tempos de cultivo *versus* resposta através da detecção dos níveis dos linfócitos T CD4⁺ e CD28⁺ presentes no co-cultivo.

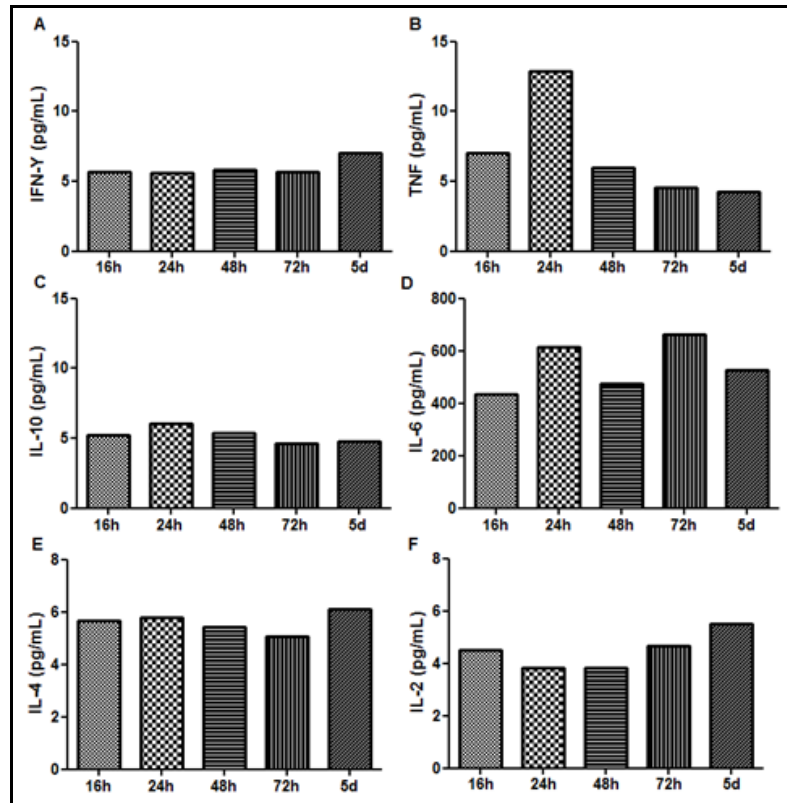


Fonte: Autora, 2014.

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

Com relação à produção de citocinas no sobrenadante de cultura, verificamos que houve maior produção de algumas citocinas no início do (Figura 17B, C e D) cultivo, enquanto outras expressaram um pico de produção após alguns dias de cultivo (Figura 17A, E e F). Sendo assim, em virtude disso, foram escolhidos para nossas avaliações dois tempos de cultivos: 24h e 5d.

Figura 17 - Avaliação dos tempos de cultivo *versus* resposta através da detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 no sobrenadante do co-cultivo.



Fonte: A autora, 2014.

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

7.2 Avaliação do perfil imunológico das células aderentes obtidas de PBMC tratadas com Bz após exposição a tripomastigotas

Para facilitar a interpretação dos dados, identificamos as condições de cultivo celular da seguinte forma: poço 1 - continha apenas células (C); poço 2 - continha células e tripomastigotas (C+T); poço 3 - continha células, tripomastigotas e Bz (C+T+Bz) e por fim o poço 4 - continha células e Bz (C+Bz). Além disso, os cultivos foram realizados em dois tempos diferentes, 24 horas (24h) e 5 dias (5d).

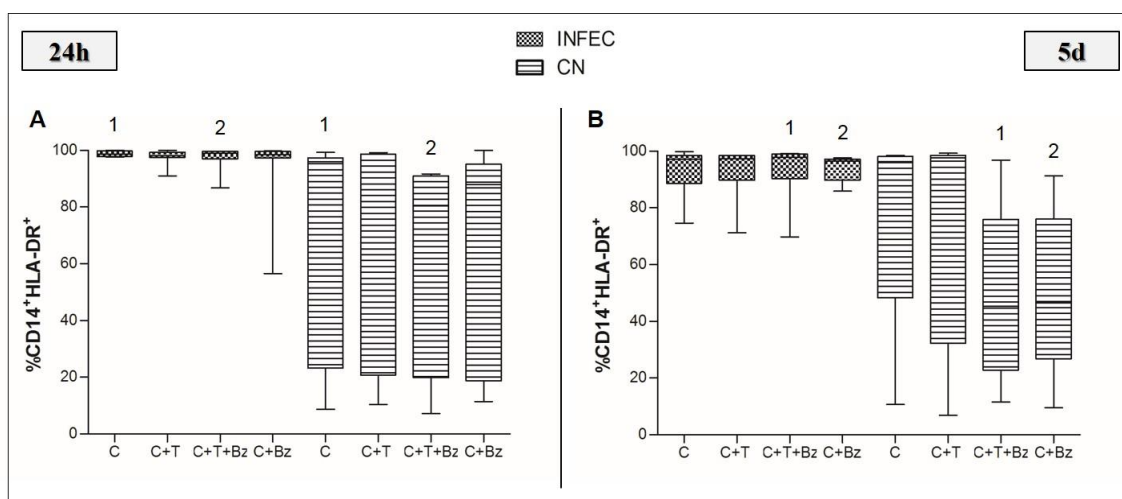
7.2.1 Avaliação do perfil de ativação e apresentação de antígenos das células aderentes CD14⁺

Para avaliarmos o perfil de ativação e apresentação de antígenos das células aderentes CD14⁺, verificamos em sua superfície a expressão das moléculas HLA-DR e das co-estimulatórias CD80 e CD86.

Não observamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺ de INFEC entre as condições de cultivo e entre os dois tempos (Figura 18A e B).

Quando comparamos INFEC com CN, verificamos que houve um aumento na porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺ na condição C+T+Bz em comparação com o grupo CN, no tempo de 24h ($p = 0,0081$) (Figura 18A). O mesmo fenômeno foi observado no tempo de 5d nas condições C+T+Bz ($p = 0,0087$) e C+Bz ($p = 0,0159$) (Figura 18B), confirmando a ação do Bz sobre a porcentagem de células marcadas de INFEC.

Figura 18 - Comparação da porcentagem de células aderentes CD14⁺HLA-DR⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



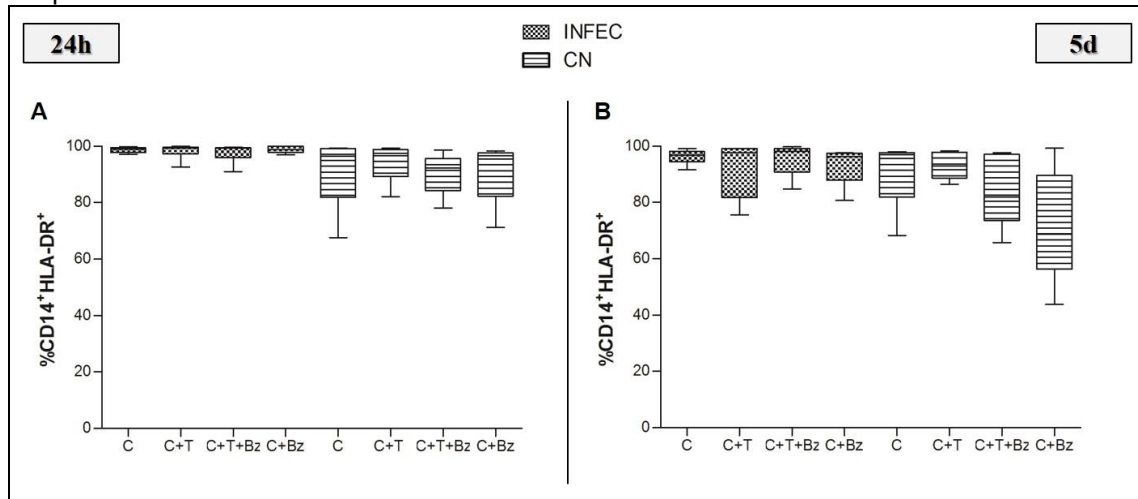
Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes ($n = 7$); CN - indivíduos não infectados ($n = 6$). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) %CD14⁺HLA-DR⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) %CD14⁺HLA-DR⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$.

Quando avaliamos a MIF dos receptores HLA-DR expressos na célula CD14⁺ de INFEC, não observamos diferenças significativas na frequência de distribuição

dessa molécula, entre as condições de cultivo e entre os tempos (Figura 19A e B). Não observamos alteração também quando comparamos INFEC com CN.

Figura 19 - Comparação da MIF da molécula HLA-DR em células CD14⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



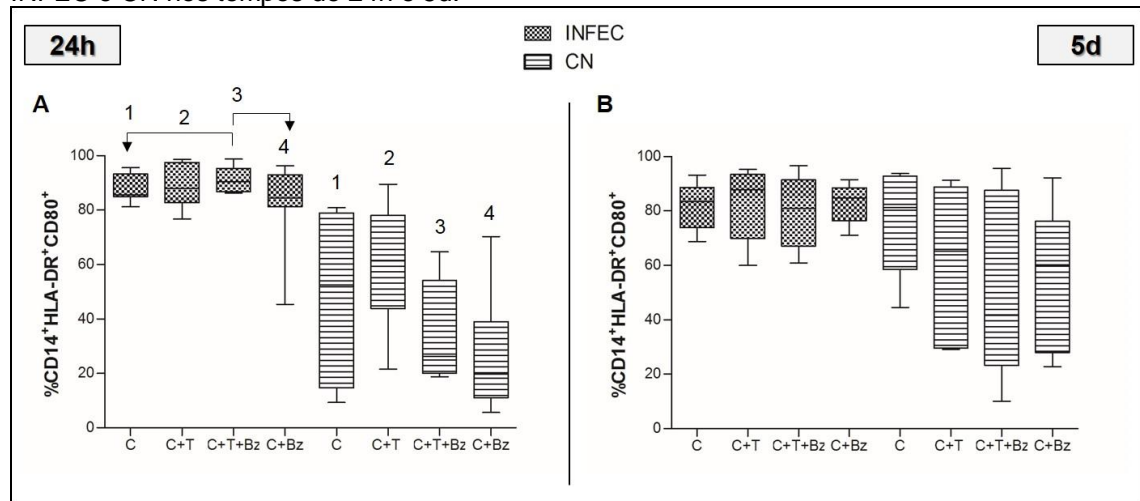
Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) MIF CD14⁺HLA-DR⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) MIF CD14⁺HLA-DR⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior.

Avaliamos a porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺ expressando as moléculas co-estimulatórias de superfície CD80 e CD86 com a finalidade de verificarmos o perfil de ativação dessas células.

Ao avaliarmos a porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺, verificamos um aumento dos níveis dessa célula na condição C+T+Bz em comparação com C (p = 0,0156) e C+Bz (p = 0,0156) no tempo de 24h (Figura 20A). Esse achado sugere que o Bz possa estar modulando negativamente a frequência dessa célula. Quando comparamos INFEC com CN, verificamos diferença estatisticamente significativa, no tempo de 24h, níveis mais elevados dessas células foram encontrados em INFEC quando comparamos todas as condições de cultivo com CN (C/C - p = 0,0012; C+T/C+T - p = 0,0140; C+T+Bz/C+T+Bz - p = 0,012; C+Bz/C+Bz - p = 0,0023) (Figura 20A).

Figura 20 - Comparação da porcentagem de células aderentes CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.

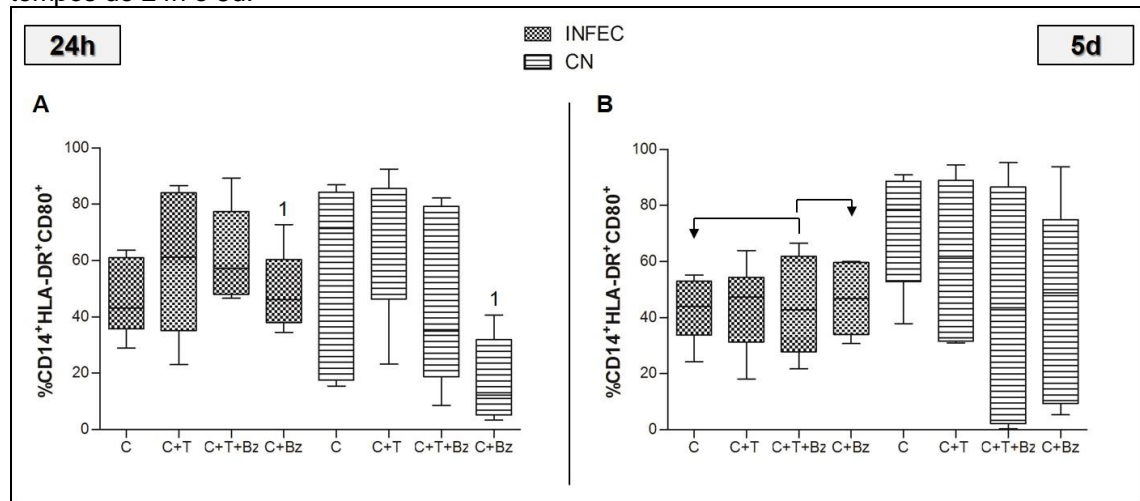


Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) %CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) %CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre INFEC e CN. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

Com relação a MIF da molécula CD80, verificamos padrão semelhante ao encontrado na porcentagem de células marcadas. Observamos que no tempo de 24h, a expressão dessa molécula foi significativamente maior na condição C+Bz ($p = 0,0173$) em INFEC quando comparado com CN. No tempo de 5d, observamos que na condição C+T+Bz de INFEC, a expressão dessa molécula foi maior em comparação com as condições C ($p = 0,0313$) e C+Bz ($p = 0,0313$) (Figura 21B). Esse resultado mostra que a administração do Bz durante o processo de infecção pode estar elevando a expressão dessa molécula regulatória de ativação na superfície celular.

Figura 21 - Comparação da MIF da molécula CD80 em células CD14⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



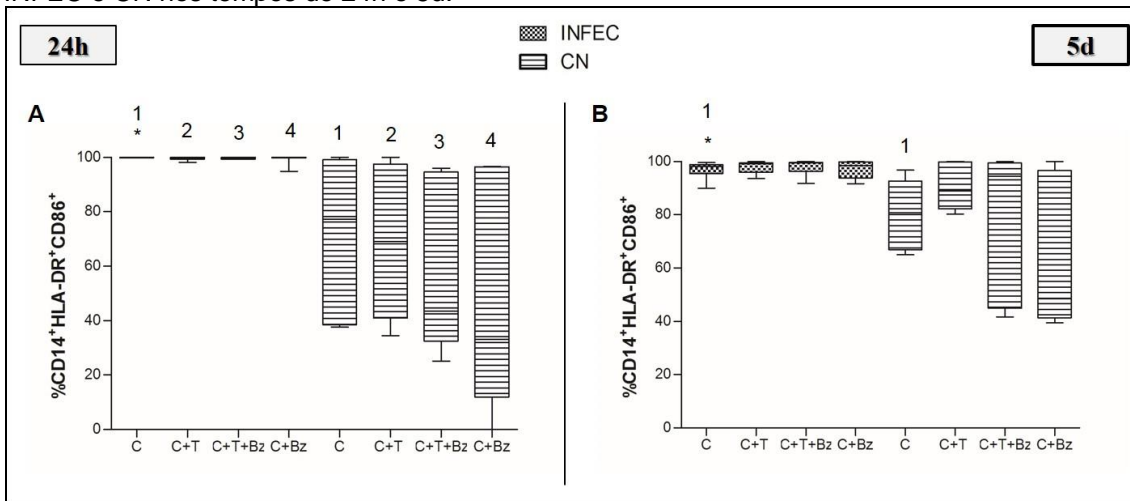
Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ em INFEC e indivíduos CN no tempo de 24h; (B) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre os grupos INFEC e CN. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

Quando avaliamos a porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺CD86⁺ em INFEC, não observamos diferenças estatísticas significativas quando comparamos entre as condições de cultivo e entre os dois tempos (Figura 22A e B).

Ao compararmos a porcentagem dessas células em INFEC *versus* CN, observamos que no tempo de 24h, níveis mais elevados dessa célula foram encontrados no grupo INFEC, em todas as condições de cultivo (C/C - $p = 0,0162$; C+T/C+T - $p = 0,0370$; C+T+BZ/C+T+Bz - $p = 0,0033$; C+Bz/C+Bz - $p = 0,0079$) (Figura 22A). No tempo de 5d, não observamos diferenças significativas entre os dois grupos, com exceção da condição C - C, que esteve significativamente mais elevada em INFEC quando comparado a CN ($p = 0,0087$) (Figura 22B).

Figura 22 - Comparação da porcentagem de células aderentes $CD14^+HLA-DR^+CD86^+$ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.

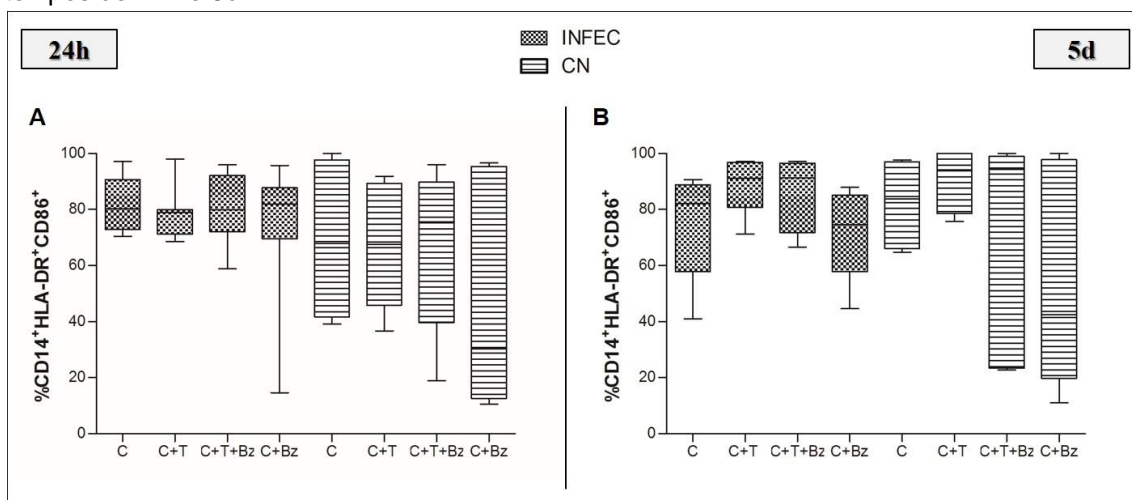


Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) $\%CD14^+HLA-DR^+CD86^+$ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) $\%CD14^+HLA-DR^+CD86^+$ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre os grupos INFEC versus CN. Símbolos (*) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h versus 5d.

Não verificamos diferenças estatísticas significativas na MIF da molécula CD86 (Figura 23A e B).

Figura 23 - Comparação da MIF da molécula CD86 em células $CD14^+$ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) MIF $CD14^+HLA-DR^+CD86^+$ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) MIF $CD14^+HLA-DR^+CD86^+$ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior.

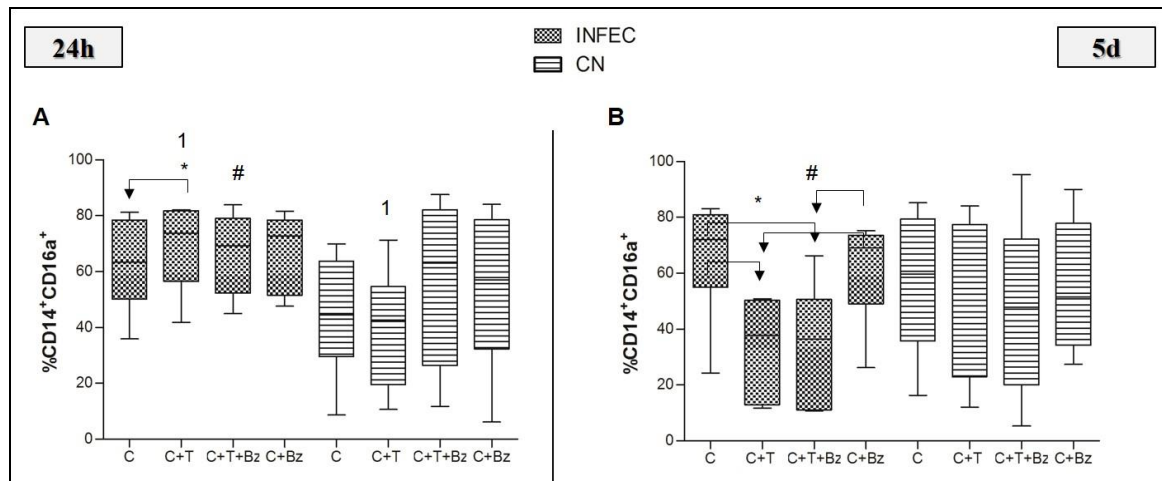
7.2.2 Avaliação do perfil fagocítico e inflamatório das células aderentes CD14⁺CD16a⁺

Para analisarmos o perfil inflamatório, das células CD14⁺ avaliamos a expressão de superfície das moléculas CD16a, CD35, CD11b, CD64 e CD32.

Inicialmente avaliamos a porcentagem de células CD14⁺CD16a⁺ de INFEC e verificamos que o nível dessas células esteve aumentado após exposição ao *T. cruzi* (C+T) no tempo de 24h em comparação com C ($p = 0,0469$) (Figura 24A). Ao compararmos os dois tempos de INFEC, observamos que nas condições que continham *T. cruzi* ocorreu uma diminuição significativa no tempo de 5d (C+T/C+T – $p = 0,0313$; C+T+Bz/C+T+Bz – $p = 0,0313$). Ao compararmos INFEC com CN no tempo de 24h, houve um aumento da porcentagem dessa célula em C+T ($p = 0,0221$) de INFEC quando comparado com a mesma condição em CN.

No tempo de 5d, houve uma reversão do fenômeno. Observamos uma diminuição estatisticamente significativa na porcentagem dessa célula, nas condições que continham tripomastigotas, em comparação com as outras condições no mesmo tempo (C/C+T - $p = 0,0313$; C/C+T+Bz - $p = 0,0313$; C+Bz/C+T - $p = 0,0313$; C+Bz/C+T+Bz - $p = 0,0313$) (Figura 24B). Esse resultado mostra que a presença do *T. cruzi* é um determinante na modulação da frequência dessa célula. Entretanto, concluímos que o Bz não exerce influência nos níveis dessas células.

Figura 24 - Comparação da porcentagem de células aderentes CD14⁺CD16a⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



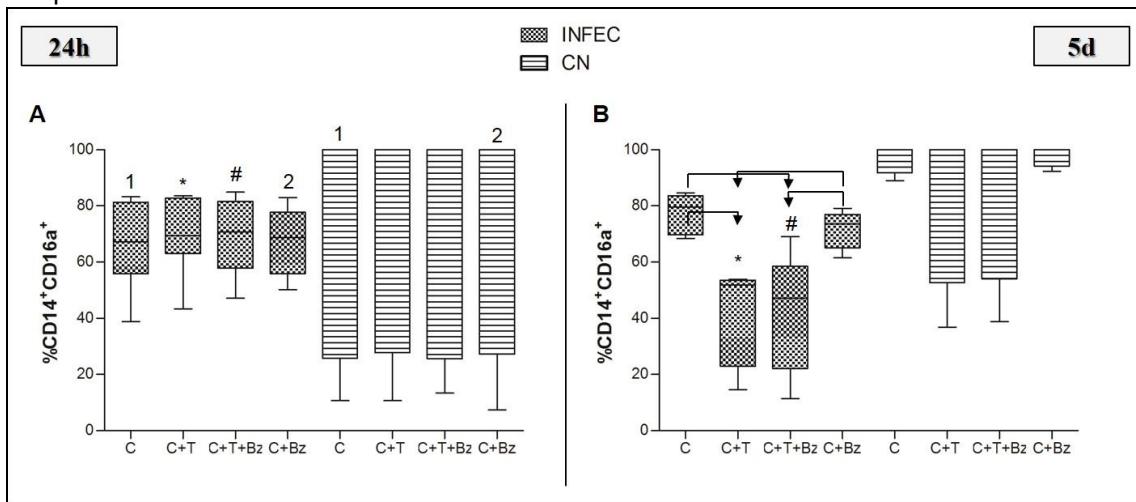
Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) %CD14⁺CD16a⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) %CD14⁺CD16a⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Símbolos (*, #) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h *versus* 5d. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre os grupos INFEC *versus* CN. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

Ao avaliarmos a MIF da expressão de CD16a, observamos uma diminuição da expressão dessa molécula em INFEC, quando comparamos as condições C+T/C+T ($p = 0,0313$) e C+T+Bz/C+T+Bz ($p = 0,0313$) entre os dois tempos de cultivo (Figura 25A e B). Também encontramos no tempo de 24h uma diminuição da distribuição desse receptor na condição C+Bz ($p = 0,0159$) quando comparamos INFEC com CN (Figura 25A).

No tempo de 5d, quando avaliamos o grupo INFEC observamos que nas condições que continham *T. cruzi* a distribuição da expressão dessa molécula esteve diminuída quando comparamos C/C+T ($p = 0,0313$), C/C+T+Bz ($p = 0,0313$), C+T+Bz/C+T ($p = 0,0313$) e C+Bz/C+T+Bz ($p = 0,0313$) (Figura 25B). Esses dados mostram que a presença do *T. cruzi* induz a uma diminuição da distribuição de expressão dessa molécula na superfície das células CD14⁺.

Figura 25 - Comparação da MIF da molécula CD16a em células CD14⁺ entre INFEC e CN nos tempos de 24h e 5d.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) MIF CD14⁺CD16a⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) MIF CD14⁺CD16a⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Símbolos (*) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h versus 5d. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

A porcentagem de células CD14⁺CD16a⁺CD11b⁺ em INFEC apresentou níveis diminuídos na condição de cultivo que continha *T. cruzi* (C+T) em comparação com as condições C ($p = 0,0313$) e C+Bz ($p = 0,0313$), no tempo de 5d (Figura 26A). Não observamos a ação do Bz sobre esta célula (Figura 26A e B). Também verificamos a MIF dessa molécula e observamos que a expressão da molécula CD11b, no tempo de 5d esteve diminuída em INFEC quando comparamos as condições C/C+T ($p = 0,0313$) e C+Bz/C+T ($p = 0,0313$) (Figura 27B). Esse resultado mostra que a exposição ao *T. cruzi* pode modular negativamente tanto a porcentagem de células CD14⁺CD16a⁺CD11b⁺ como a distribuição de expressão dessa molécula na superfície celular. O Bz não exerce nenhuma influência sobre a distribuição de expressão dessa molécula em células CD14⁺CD16a⁺ (Figura 27A e B).

Com relação a porcentagem de células CD14⁺CD16a⁺CD32⁺ de INFEC, verificamos uma diminuição em seus níveis, no tempo de 5d, após exposição ao *T. cruzi* em comparação com a condição C+Bz (C+Bz/C+T - $p = 0,0313$; C+T+Bz/C+Bz - $p = 0,0313$) (Figura 26D). Também verificamos que ao compararmos as culturas de INFEC nos dois tempos, ocorreu uma diminuição significativa da frequência dessa célula no tempo de 5d (C+T/C+T - $p = 0,0313$; C+T+Bz/C+T+Bz - $p = 0,0313$)

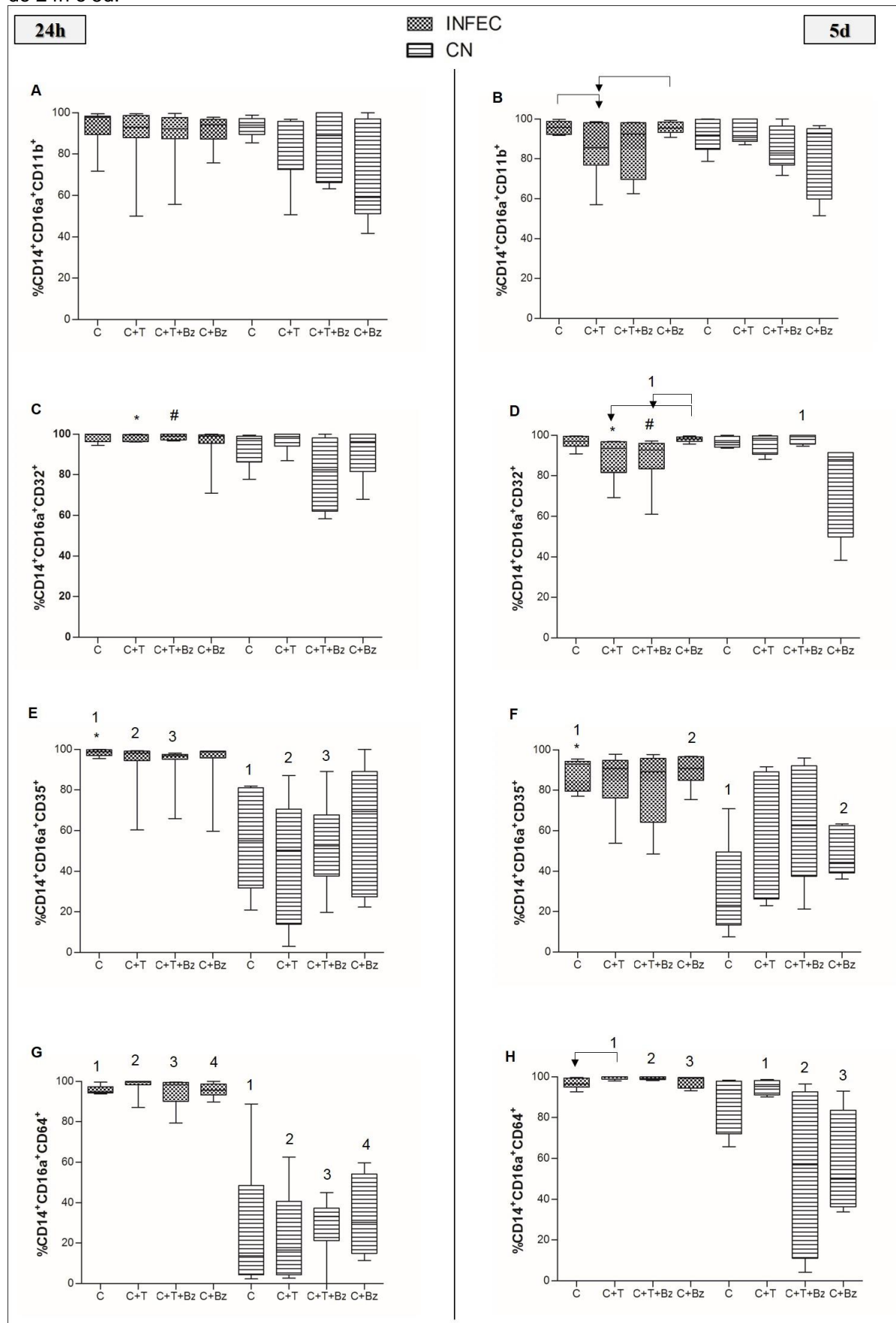
(Figura 26C e D), podendo ser devido a presença do *T. cruzi*. Quando comparamos as células de INFEC com CN, na condição C+T+Bz, verificamos uma diminuição dos níveis dessa célula em INFEC ($p = 0,0381$) no tempo de 5d. Ao avaliarmos a MIF dessa molécula, observamos que no tempo de 24h, essa molécula teve níveis de distribuição aumentados em INFEC na condição C+T+Bz/C+T+Bz ($p = 0,0313$) quando comparamos com o tempo de 5d (Figura 27C e D). Esse dado, em conjunto com os achados da porcentagem de células marcadas, sugere que o *T. cruzi* pode estar interferindo no padrão de distribuição dessa molécula.

Com relação a porcentagem de células CD14⁺CD16a⁺CD35⁺, não observamos diferenças entre as condições de cultivo e/ou entre os tempos em INFEC (Figura 26E e F). No entanto, ao comparamos INFEC com CN, verificamos que no tempo de 24h, as células de INFEC estavam significativamente aumentadas após exposição ao *T. cruzi* (C+T/C+T $p = 0,0047$; C+T+Bz/C+T+Bz - $p = 0,0023$) (Figura 26E). No tempo de 5d observamos um aumento significativo dessa célula em INFEC na condição C+Bz ($p = 0,0043$) quando comparado com CN (Figura 26F), sugerindo uma modulação positiva dessa célula pelo Bz em INFEC. Com relação a MIF, observamos um equilíbrio na expressão dessa molécula entre todas as condições, tempos e grupos, com exceção da condição C+T+Bz de INFEC, 24h, que apresentou uma diminuição da sua distribuição quando comprado com a condição C ($p = 0,0469$) (Figura 27E e F). Esse resultado, em conjunto com o padrão de expressão no tempo de 5d (resultado sem significância estatística), nos leva a crer que quando associamos o Bz ao processo de infecção, há uma diminuição da expressão dessa molécula em células CD14⁺CD16a⁺.

As células CD14⁺CD16a⁺CD64⁺ de INFEC estiveram significativamente mais elevadas na condição C+T em comparação com C ($p = 0,0313$) (Figura 26G), no tempo de 5d, sugerindo que o *T. cruzi* modulou positivamente a expressão dessa célula. Quando comparamos a porcentagem dessas células entre INFEC e CN, observamos que em todas as condições, as células estiveram significativamente mais elevadas em INFEC nos dois tempos (24h: C/C - $p = 0,0012$; C+T/C+T - $p = 0,0034$; C+T+Bz/C+T+Bz - $p = 0,0012$; C+Bz/C+Bz - $p = 0,0012$; 5d: C+T/C+T - $p = 0,0209$; C+T+Bz/C+T+Bz - $p = 0,0139$; C+Bz/C+Bz - $p = 0,0095$) (Figura 27G e H). Ao avaliarmos a MIF, observamos que na condição C+Bz essa molécula esteve aumentada em INFEC quando comparamos com a condição C ($p = 0,0156$) no tempo de 24h (Figura 27G). Também observamos que nesse tempo, a expressão

dessa molécula esteve diminuída na condição C+T+Bz ($p = 0,0313$) quando comparamos com o tempo de 5d (Figura 27G e H). Podendo este aumento na condição C+T+Bz de INFEC no tempo de 5d estar relacionado com a presença do Bz ao processo de infecção.

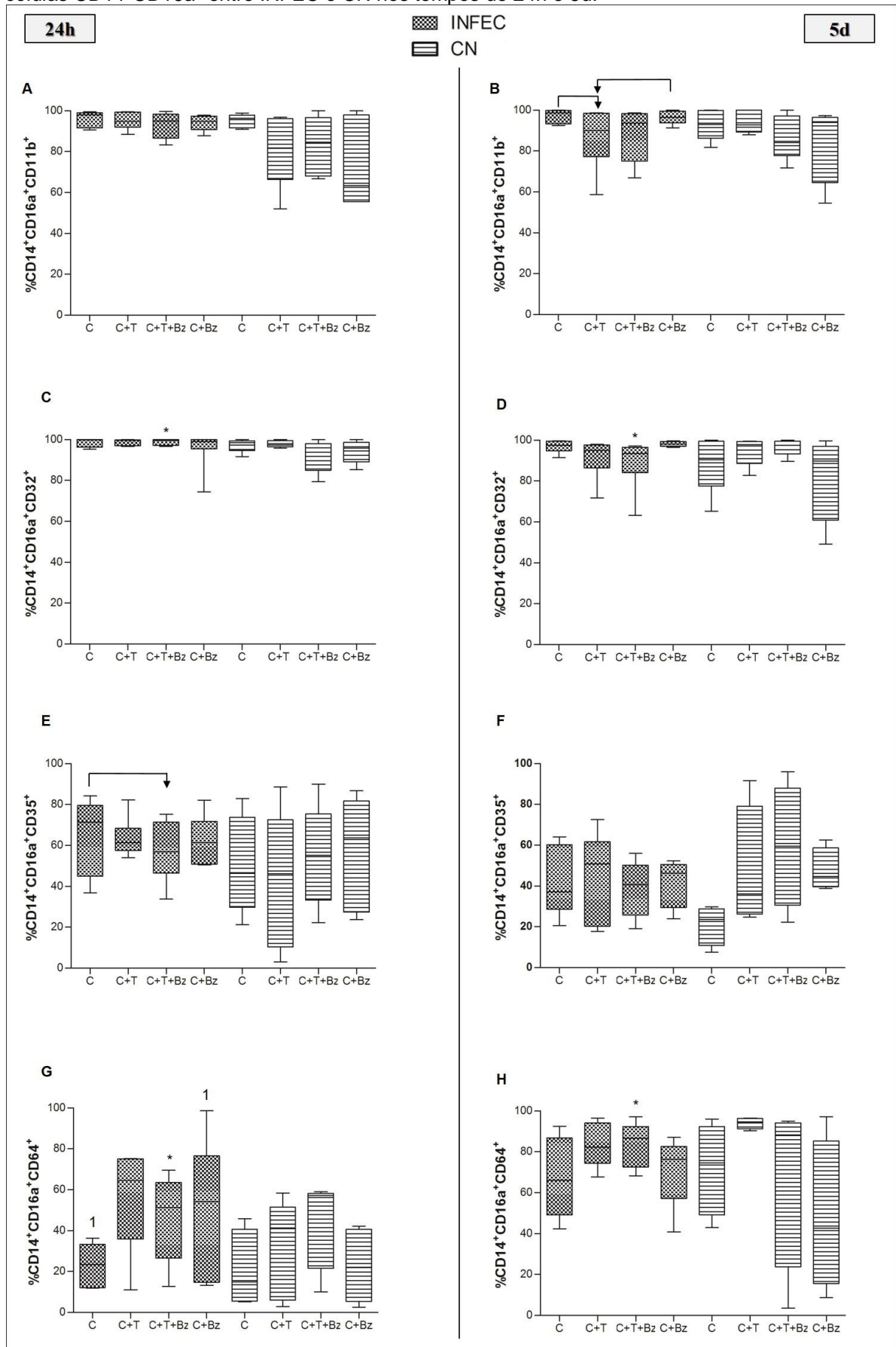
Figura 26 - Comparação da porcentagem de células aderentes CD14⁺CD16a⁺CD11b⁺, CD14⁺CD16a⁺CD32⁺, CD14⁺CD16a⁺CD35⁺ e CD14⁺CD16a⁺CD64⁺ entre INFEÇ e CN nos tempos de 24h e 5d.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) %CD14⁺HLA-DR⁺CD11b⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) %CD14⁺HLA-DR⁺ CD11b⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. (C) %CD14⁺HLA-DR⁺CD32⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (D) %CD14⁺HLA-DR⁺CD32⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d; (E) %CD14⁺HLA-DR⁺CD35⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (F) %CD14⁺HLA-DR⁺CD35⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d; (G) %CD14⁺HLA-DR⁺CD64⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (H) %CD14⁺HLA-DR⁺ CD64⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Símbolos (*) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h *versus* 5d. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

Figura 27 - Comparação da MIF das moléculas CD35, CD11b, CD64 e CD32 na superfície de células CD14⁺CD16a⁺ entre INFEÇ e CN nos tempos de 24h e 5d.



Fonte: A autora, 2016.

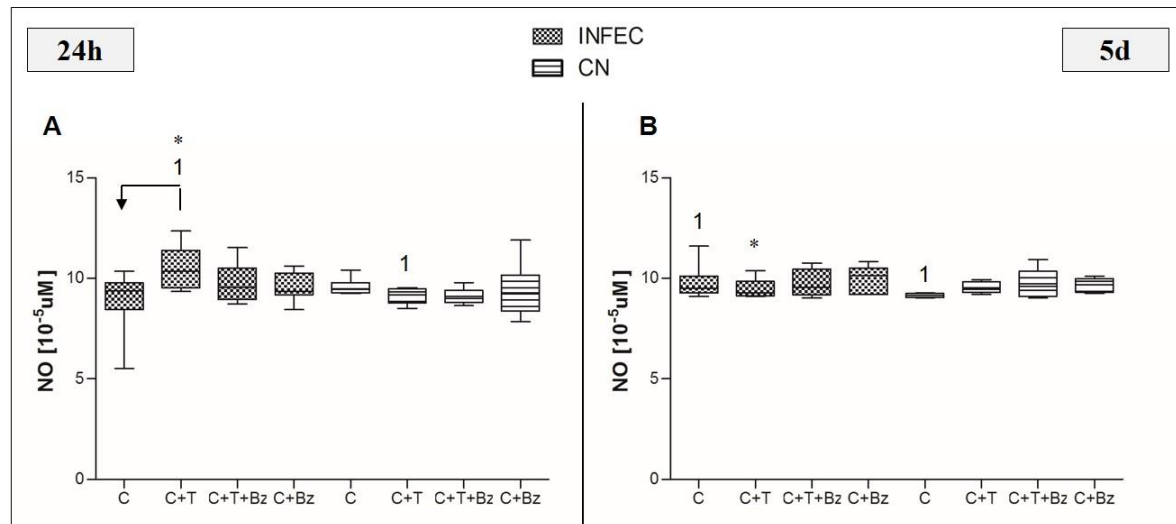
Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. (A) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD11b⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (B) MIF CD14⁺HLA-DR⁺ CD11b⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. (C) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD32⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (D) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD32⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d; (E) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD35⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (F) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD35⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d; (G) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD64⁺ em INFEC e CN no tempo de 24h; (H) MIF CD14⁺HLA-DR⁺CD64⁺ em INFEC e CN no tempo de 5d. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Símbolos (*) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h *versus* 5d. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

7.2.3 Dosagem dos níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*

Para verificarmos o possível efeito imunomodulador do Bz sobre as células aderentes expostas ao *T. cruzi*, avaliamos também a produção de NO através da quantificação da concentração de nitrito nos tempos de 24h e 5d (Figura 28A e B).

Nossos resultados mostram que nos dois tempos o Bz não agiu sobre a produção desse mediador, no entanto, como já era de se esperar, ocorreu um aumento de NO na condição C+T no tempo de 24h em comparação com a condição C no grupo INFEC. Também foi observado um aumento na produção de NO na condição C+T no tempo de 24h em comparação com o tempo de 5d. Quando comparamos a produção desse mediador entre INFEC e CN, observamos também que as células de INFEC na condição C+T produziram mais NO em comparação com as células na mesma condição do grupo CN no tempo de 24h.

Figura 28 - Avaliação da produção de NO através da quantificação de nitrito nos tempos de 24h e 5d.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: INFEC – pacientes (n = 7); CN - indivíduos não infectados (n = 6). C – células; C + T – células e tripomastigotas; C + T + Bz – células, tripomastigotas e Bz; C + Bz - células e Bz. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior. Números idênticos acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre os grupos INFEC versus CN. Símbolos (*, #, &) acima das barras indicam diferença estatística com $p \leq 0,05$, entre condições de INFEC nos tempos de 24h versus 5d. As diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cultivo durante o mesmo tempo em INFEC são indicadas por setas.

7.2.4 Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas

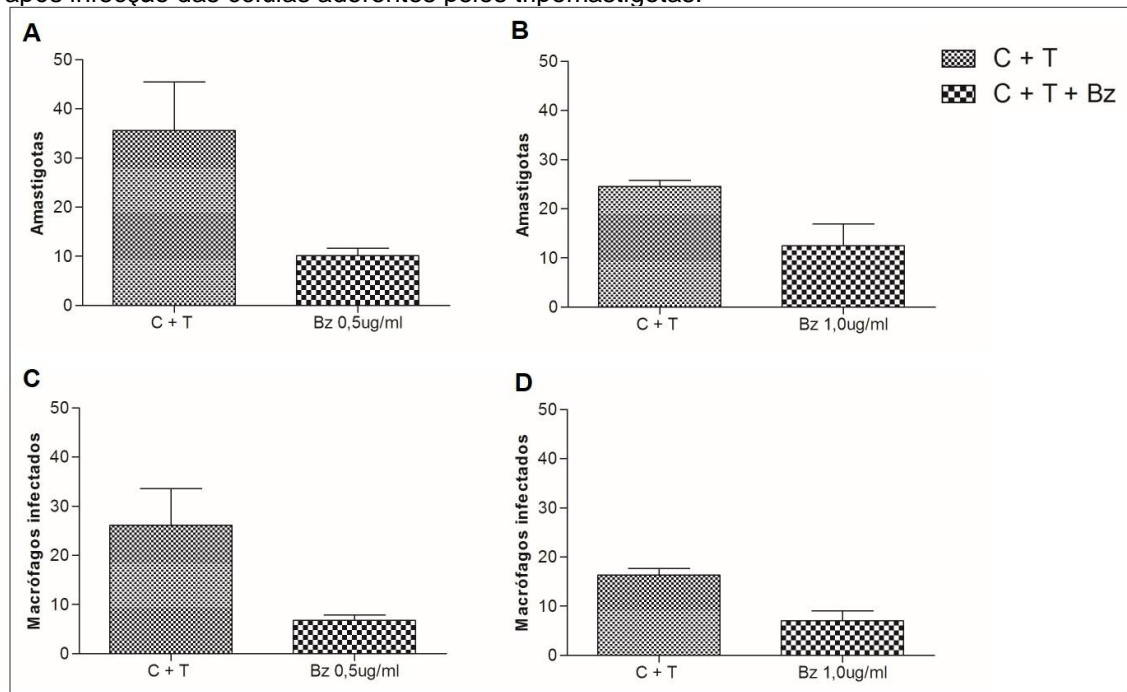
Para verificarmos a ação do Bz (0,5µg/ml e 1,0 µg/ml) sobre a infecção com o *T. cruzi*, realizamos a contagem das amastigotas, como também a contagem de Células aderentes infectadas no tempo de 24h (Figura 29). Não pudemos realizar as respectivas contagens no tempo de 5d, devido a impossibilidade da visualização das Células aderentes nas condições que continham Bz (Figura 30B e D).

Não observamos diferenças estatísticas significativas quando contamos as formas amastigotas intracelulares nas duas concentrações avaliadas comprando-se as células infectadas expostas ao Bz versus células infectadas não expostas ao Bz (Figuras 29A e B). Entretanto, podemos observar uma tendência não significativa a diminuição da quantidade de parasitas nas condições que continham Bz (Figuras 29A e B).

Ao verificarmos a quantidade de células aderentes infectadas, também não observamos diferenças estatísticas significativas quando comparamos as células infectadas expostas ao Bz versus células infectadas não expostas ao Bz (Figuras

29C e D). Apesar da falta de diferença significativa, também observamos uma tendência a diminuição da quantidade dessas células nas condições que continham Bz (Figuras 29C e D).

Figura 29 - Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas.

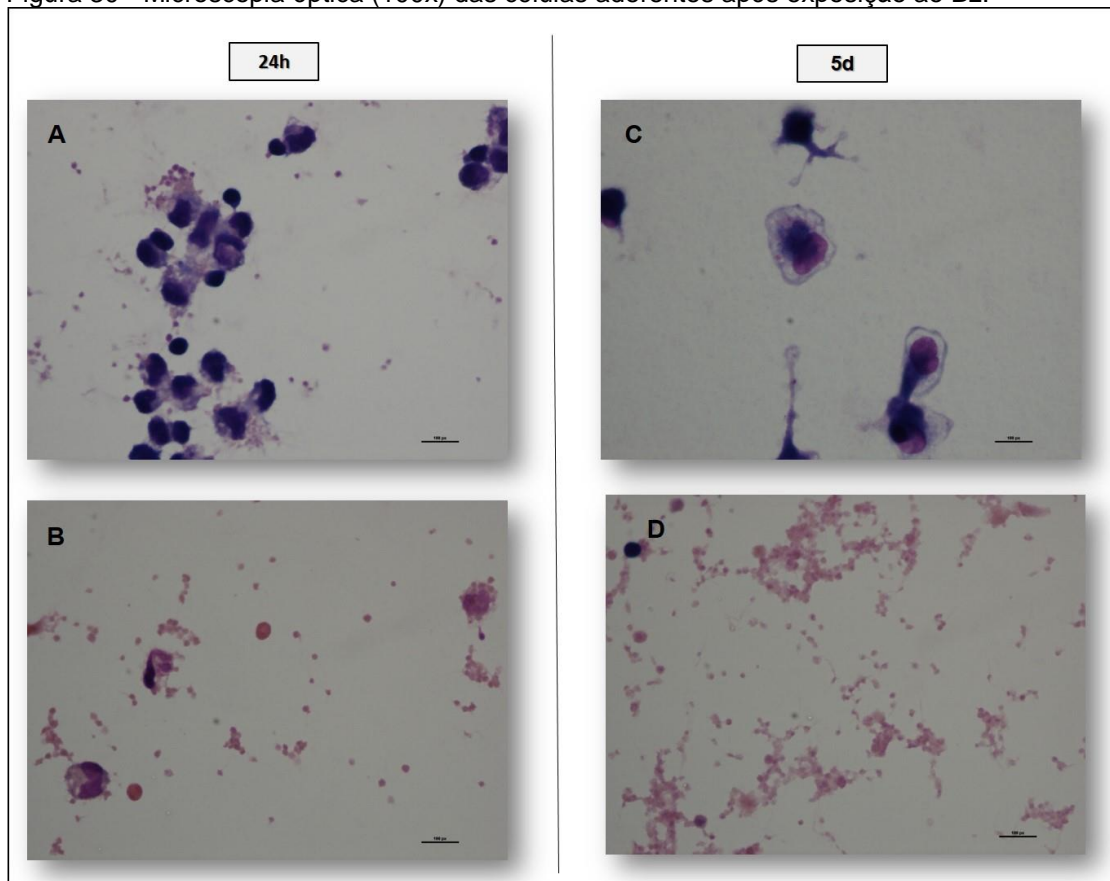


Fonte: Autora, 2016.

Legenda: CN (n = 3). A - Quantidade de amastigotas por células aderentes cultivadas sem Bz e com Bz na concentração de 0,5 µg/ml; B - quantidade de amastigotas por células aderentes cultivadas sem Bz e com Bz na concentração de 1,0 µg/ml; C - quantidade de macrófagos infectados cultivados sem Bz e com Bz na concentração de 0,5 µg/ml; D - quantidade de macrófagos infectados cultivados sem Bz e com Bz na concentração de 1,0 µg/ml. Condições C + T - células e tripomastigotas; C + T + Bz - células, tripomastigotas e Bz. As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior.

Através da microscopia óptica (aumento de 100x) observamos a falta da integridade celular (Figura 30). Ao compararmos as imagens Bz *versus* sem Bz, observamos que nas condições que continham Bz nos tempos de 24h e 5d as células não apresentavam morfologia definida, chegando a não conseguirmos identificá-las (Figura 30B e D). Já nas condições sem Bz, as células foram observadas morfologicamente bem definidas (Figura 30A e C).

Figura 30 - Microscopia óptica (100x) das células aderentes após exposição ao Bz.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: A e C – células cultivadas sem Bz; B e D – Células cultivadas com o Bz. A e B – células cultivadas por 24h e C e D – células cultivadas por 5d. Todas as imagens foram feitas no microscópio Óptico de campo claro com um aumento de 100x.

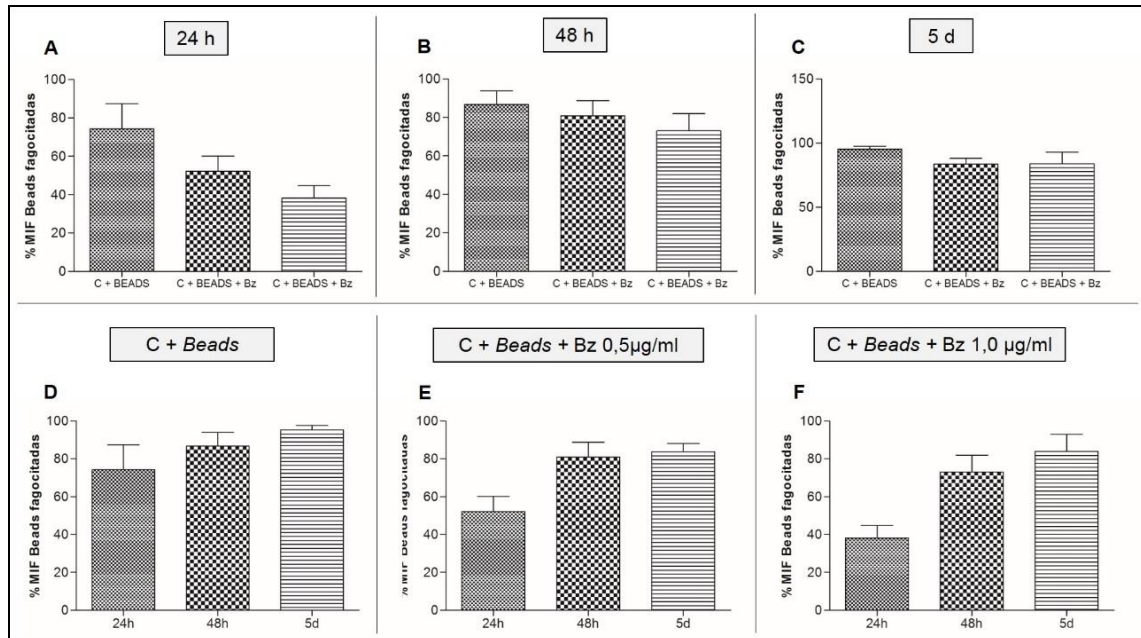
7.2.5 Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes na presença ou ausência de Bz

Após verificarmos uma tendência a diminuição da quantidade de amastigotas intracelulares e das células aderentes infectadas, decidimos avaliar se após a exposição ao Bz as células sofriam alguma alteração quanto a sua função de fagocitose.

Ao verificarmos a MIF das *beads* fagocitadas, não verificamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos entre os tempos de 24h, 48h e 5d as condições Células+*beads*; Células+*beads*+Bz na concentração de 0,5 µg/ml e Células+*beads*+Bz na concentração de 1,0 µg/ml (Figura 31A, B e C). Também não encontramos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a porcentagem da média de intensidade de fluorescência das *beads* fagocitadas das condições Células+*beads* versus Células+*beads*+Bz na concentração de 0,5 µg/ml

versus Células+beads+Bz na concentração de 1,0 µg/ml para cada tempo, 24h, 48h e 5d (Figura 31D, E e F).

Figura 31 - Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes antes e após exposição ao Bz.



Fonte: Autora, 2016.

Legenda: CN (n = 3). A - % da média de intensidade de fluorescência da quantidade de *beads* fagocitadas por células aderentes cultivadas sem Bz comparando entre os tempos de 24h 48h e 5d; B - % da média de intensidade de fluorescência da quantidade de *beads* fagocitadas por células aderentes cultivadas com Bz na concentração de 0,5 µg/ml comparando entre os tempos de 24h 48h e 5d; C - % da média de intensidade de fluorescência da quantidade de *beads* fagocitadas por células aderentes cultivadas com Bz na concentração de 1,0 µg/ml comparando entre os tempos de 24h 48h e 5d; D, E e F - % da média de intensidade de fluorescência da quantidade de *beads* fagocitadas por células aderentes cultivadas sem Bz e com Bz nas concentrações 0,5 µg/ml e 1,0 µg/ml, comparando entre os tempos de 24h 48h e 5d respectivamente. Condições C + *Beads* - células e microesferas; C + *Beads* + Bz - células, tripomastigotas e Bz (0,5 µg/ml e 1,0 µg/ml, respectivamente). As barras horizontais representam a mediana e as verticais o limite inferior e superior.

7.2.6 Avaliação de morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*

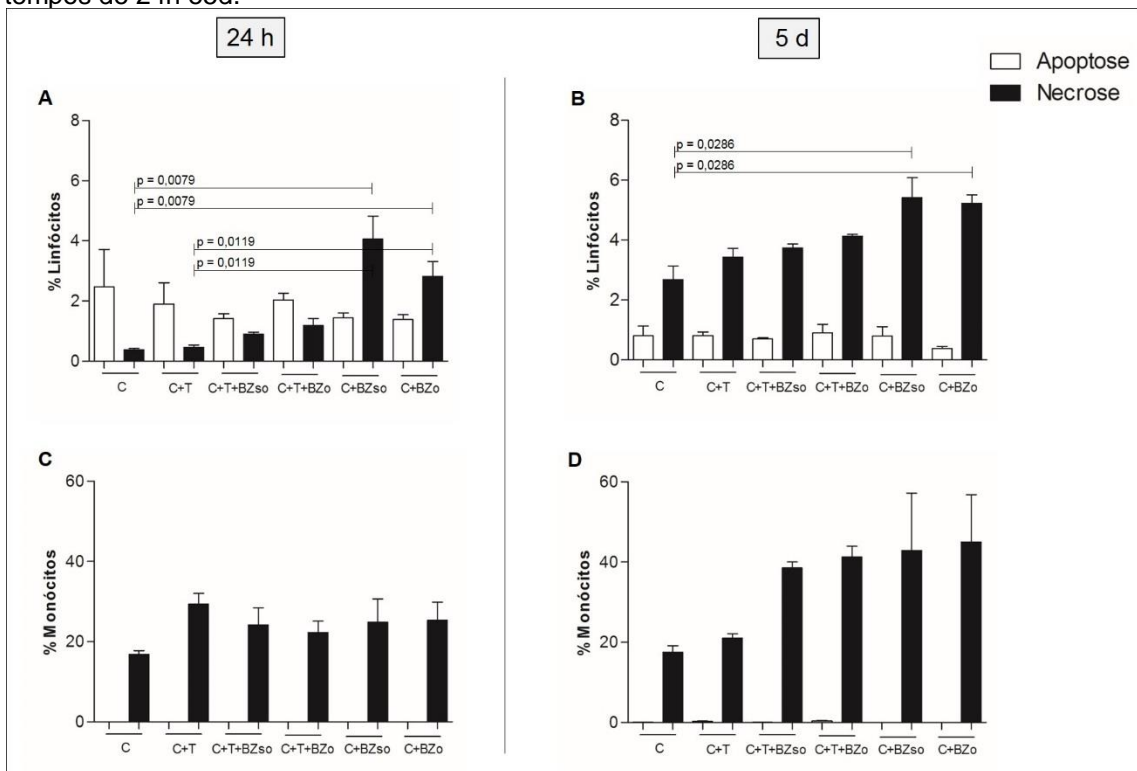
Após a avaliação da infecção das células aderentes, percebemos através da microscopia óptica que as células estavam aparentemente sofrendo algum tipo de dano celular, e sabendo que a perda da integridade da membrana é uma das principais características de morte celular por necrose, decidimos verificar o padrão de morte celular que estava sendo induzido pelo Bz.

Avaliamos o perfil de morte celular das PBMC e observamos que com relação aos linfócitos, as condições C+Bz (nas duas doses) apresentaram um aumento de

necrose estatisticamente significativa quando comparado com as condições C e C+T, no tempo de 24h (Figura 32B). No tempo de 5d, também observamos que nas condições C+Bz (nas doses sub-ótima e ótima) ocorreu um aumento estatisticamente significativo do processo de necrose quando comparado com a condição C (Figura 32B).

Quando investigamos os macrófagos, não encontramos diferenças estatísticas significativas, no entanto, um resultado bastante curioso observado, foi a ausência do processo de apoptose no tempo de 24h e a presença, não significativa, do processo de necrose em todas as condições de cultivo (Figura 32C). Resultado semelhante foi observado no tempo de 5d (Figura 32D). Apesar da presença do processo de necrose fortemente observado nos macrófagos, nenhum resultado estatisticamente significativo foi encontrado. Nossos resultados apontam que o Bz está induzindo necrose em ambas as células avaliadas.

Figura 32 - Avaliação do processo de apoptose e necrose em linfócitos e monócitos nos tempos de 24h e 5d.



8 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho realizamos o co-cultivo de PBMC e *T. cruzi* na presença de Bz, com o objetivo de avaliarmos a ação desse fármaco sobre o perfil imunomodulatório dos monócitos, que neste trabalho temos nos referido como células aderentes. Para conhecermos a ação do Bz no momento da infecção, expusemos as células à infecção pelo *T. cruzi*. Sabe-se que a presença do parasita, associada com a resposta imune desequilibrada pode acarretar danos teciduais que são causados por uma resposta inflamatória exacerbada (DUTRA et al., 2008). Portanto entender qual a atuação do Bz nessa tríade, hospedeiro/parasita/fármaco, é de extrema importância para a evolução do tratamento etiológico existente, como também para a evolução de possíveis novos tratamentos.

8.1 Avaliação do perfil imunofenotípico das células aderentes obtidas de PBMC tratadas com Bz após exposição a tripomastigotas

Como já dito no Referencial Teórico, as células aderentes apresentam padrões diferenciados de resposta. Ou seja, a resposta dessas células dependerá do estímulo recebido. Elas podem apresentar um perfil de expressão de receptores de ativação e apresentação de antígenos (FREEMAN, et al., 1993a; FREEMAN, et al., 1993b), como também um perfil de receptores inflamatórios e fagocíticos (ZIEGLER-HEITBROCK, 1996; BELGE et al., 2002). Para a melhor compreensão dos nossos dados da imunofenotipagem, dividimos a discussão dos resultados com base nesses perfis de expressão dos receptores.

8.1.1 Avaliação do perfil de ativação e apresentação de antígenos das células aderentes CD14⁺

As moléculas CD80 e CD86, expressas na superfície das células aderentes são reconhecidas pelo receptor CD28, que é expresso em quase todas as células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A cascata de sinalização induzida pela ligação de moléculas co-estimulatórias ao receptor CD28 atua em conjunto com o desencadeado pela interação do receptor de células T e co-receptor com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na superfície das APCs (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). A molécula HLA-DR faz parte desse MHC de classe II

(MHC II) e é responsável pelo processamento de antígenos endocitados (TURLEY et al., 2000).

Em nossos resultados, observamos que em INFEC, após exposição ao Bz, a porcentagem de células expressando a molécula HLA-DR foi maior no INFEC do que em CN. Entretanto, a MIF não sofreu alteração. Magalhães et al., (2015), afirmam que o aumento inicial da frequência de expressão da célula CD14⁺HLA-DR⁺ pode ser devido à precoce ativação dessa molécula após estimulação.

Quando avaliamos a porcentagem de células CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ e MIF conseguimos observar que o Bz induziu o aumento da expressão dessa molécula em INFEC. Podemos observar através da MIF que o Bz está modulando a expressão desses receptores ao observarmos a condição C+T+Bz e C+Bz dos INFEC. Na comparação INFEC com CN, observamos também uma modulação da expressão dessa molécula na condição C+Bz de INFEC.

Com relação a molécula CD86, não identificamos influência do Bz sobre a expressão desta molécula, no entanto sua frequência foi significativamente maior em INFEC quando comparado com CN em todas as condições de cultivo.

Magalhães et al. (2015), observaram que monócitos infectados com as cepas Y ou Colombiana do *T. cruzi*, apresentaram um aumento da expressão da molécula HLA-DR em comparação com células não infectadas após cultivo de 15 horas. Em estudo recente do nosso grupo, Soares et al., (2016), mostraram que células CD14⁺HLA-DR⁺CD80⁺ cultivadas por 24h estavam aumentadas após estímulo com antígenos específicos de *T. cruzi*. Entretanto, divergindo dos nossos resultados, observaram que a molécula co-estimulatória CD86, presente na superfície dos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, diminuiu no grupo de portadores da forma CARD.

Souza et al. (2007), em um estudo com humanos, observaram um aumento na expressão da molécula CD80 na superfície de monócitos após a infecção de células aderentes pelo *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstram que a presença do *T. cruzi* ou de seus antígenos são capazes de ativar monócitos sanguíneos *in vitro*. No presente estudo, não observamos ação do *T. cruzi* sobre essas moléculas.

Corroborando com os resultados, dados encontrados por nosso grupo de pesquisa, reforçam a ação do Bz sobre mecanismos de ativação de células da resposta imune. Foi verificado um aumento da expressão da molécula CTLA-4 em linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ de pacientes após exposição ao Bz (NEVES, 2015). A ativação dos linfócitos T requer sinais que são oriundos das APCs. O primeiro sinal é

o reconhecimento dos antígenos peptídicos associados ao MHC, pelo TCR. O segundo sinal é realizado pela interação entre as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, expressas na superfície das APCs, e a molécula CD28 expressa constitutivamente na superfície dos linfócitos T virgens (CARRENO; COLLINS, 2002). A molécula CD28 fornece sinais positivos que promovem e sustentam as respostas de células T, enquanto que a molécula CTLA-4 regula as respostas desses linfócitos (RUDD; TAILOR; SCHNEIDER, 2009). Esse resultado reforça o nosso achado com relação a ação do Bz sobre as moléculas HLA-DR e CD80, como um fator importante para a ativação linfocitária.

Avaliando os resultados obtidos por Neves (2015), em conjunto com os nossos, podemos sugerir que o Bz pode estar regulando a ativação dos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ através do aumento da expressão da molécula CTLA-4 nessas células.

8.1.2 Avaliação do perfil fagocítico e inflamatório das células aderentes CD14⁺CD16a⁺

O sinergismo entre a resposta imune do hospedeiro e o Bz, pode ser crucial na eficácia do tratamento (ALBAREDA; LAUCELLA, 2015; CUTRULLIS et al, 2011; OLIVIERI et al., 2002). No processo de infecção pelo *T. cruzi*, cada fase da doença apresenta uma resposta imunológica específica (KAYAMA e TAKEDA 2010). Conhecer a resposta desencadeada pelo Bz nas células da resposta imune é um grande passo no entendimento de mecanismos de ação desse fármaco.

Alguns autores acreditam que há uma hipótese geral de que o tratamento etiológico contribui para reduzir o parasitismo e reorganizar a resposta imune do hospedeiro, levando a uma resposta inflamatória equilibrada, o que seria crucial para o controle da morbidade da DC (VIOTTI et al 1994; GARCIA et al. 2005; SATHLER-AVELAR et al 2006; SATHLER-AVELAR et al 2008).

Os fagócitos humanos apresentam uma grande capacidade para internalizar partículas através do auxílio de componentes séricos. Isso indica que estas células têm receptores de superfície celular associados com um mecanismo dependente do Sistema Complemento encontrado no soro (CD35) (GOMES et al., 2012). No entanto, essas células também possuem mecanismos de fagocitose independentes

da presença de componentes séricos (Receptores FC- γ : CD16a, CD32, CD64) (GOMES et al., 2012).

O receptor CD16a, está associado com a fagocitose e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Nossos resultados mostram que a célula CD14⁺CD16a⁺ não sofreu alteração na sua expressão após exposição ao Bz. Já a presença do parasita modulou negativamente sua expressão em células de INFEC como observado nas condições C+T e C+T+Bz das avaliações de frequência e de MIF em ambos os tempos de cultivo.

Os dados, sugerem que, a diminuição da expressão dessas moléculas de fagocitose e de resposta inflamatória, após exposição ao *T. cruzi*, poderia ser explicada através de mecanismos de fuga do parasita. O *T. cruzi*, desenvolveu estratégias fascinantes para evitar e/ou subverter o sistema imunitário do hospedeiro mamífero, dando continuidade ao processo de infecção.

Uma das estratégias bastante estudada é através da invasão celular na fase inicial da infecção. Essa invasão pode ocorrer através de duas vias, a primeira pela via dependente de lisossoma, e a segunda pela via de invaginação da membrana plasmática seguida pela fusão intracelular com lisossomas. Então, no momento da infecção o *T. cruzi* libera fatores e mediadores solúveis capazes de induzir respostas diferenciadas nas células e desse modo, progredir com a infecção intracelular. Se assim for, esta inibição pode ser adicionada a uma lista de outros mecanismos de escape utilizados por esse parasita, para reduzir a eficácia da resposta imune do hospedeiro (OVERTVELT et al., 1999; PLANELLES et al., 2003; GOTO; LINDOSO 2004; DOSREIS, 2011; NARDY; FREIRE-DE-LIMA; MORROT, 2014; CARDOSO, et al., 2016).

Com relação ao Bz, os resultados mostram que esse fármaco modulou a expressão de algumas das células de perfil fagocítico estudadas. A expressão de CD14⁺CD16a⁺CD64⁺ esteve significativamente aumentada em todas as condições de cultivo em INFEC quando comparado com o grupo CN, no tempo de 24h. Fenômeno semelhante observamos, aos 5 dias de cultivo. Quando avaliamos a MIF dessa molécula em INFEC, verificamos que o Bz induziu o aumento significativo da expressão dessa molécula em C+Bz quando comparado com C. Além disso, observamos que a presença do Bz no processo de infecção pode estar modulando positivamente a expressão dessa célula, juntamente com o *T. cruzi*.

No caso da célula CD14⁺CD16a⁺CD35⁺, na condição de cultivo C+Bz de INFEC no tempo de 5d, observamos que essas células estão aumentadas significativamente em comparação com o CN, indicando, a partir das condições C+T e C+T+Bz no tempo de 24h, que inicialmente essa célula sofreu a influência do parasita, no entanto, aos 5d de cultivo, o Bz induziu um aumento significativo de sua expressão em INFEC quando comparado com CN.

Quanto à expressão da molécula CD11b, importante receptor da resposta inflamatória, nossos resultados mostram que o Bz não induziu alteração na expressão dessa molécula. Por outro lado, na presença do parasita essa molécula apresenta uma diminuição em sua expressão, quando comparada às demais condições de cultivo.

A interação entre o *T. cruzi* e os fagócitos é um evento importante na regulação da reatividade celular na DC. Tem sido demonstrado que estas células podem influenciar na evolução clínica diferencial e na evolução clínica dos pacientes portadores da DC (MOLINA; KIERSZENBAUM 1989; KIERSZENBAUM; RAMIREZ 1990). Monócitos circulantes de pacientes apresentam diferenças fenotípicas e funcionais com relação aos indivíduos saudáveis (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2007; GOMES et al., 2012). Portanto, apesar de observarmos a ação do *T. cruzi* sobre esses receptores, o Bz pode ser um fator importante para o auxílio da manutenção de uma resposta fagocítica equilibrada.

Com relação à resposta inflamatória, em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando a ação do Bz sobre a produção de quimiocinas e a expressão de seus receptores em PBMCs de pacientes, foi verificado que o Bz induziu uma diminuição da produção da quimiocina CCL2 no sobrenadante de cultura de PBMCs experimentalmente expostas ao *T. cruzi* (NASCIMENTO, 2015). As quimiocinas e seus receptores estão relacionados com o recrutamento leucocitário durante o processo inflamatório, além de estarem envolvidos na modulação das respostas Th1 e Th2 (FLOREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ, 2012). Esse resultado corrobora com os nossos resultados, mostrando que o Bz não está envolvido na indução da resposta inflamatória exacerbada, pelo contrário, está auxiliando no equilíbrio/manutenção dessa resposta.

Corroborando com os achados, Campi-Azevedo et al. (2015), em um estudo com pacientes tratados, verificou que o tratamento com Bz restaurou a expressão da molécula CD35 em pacientes portadores da forma IND, para um perfil observado em

indivíduos sem a doença. Também foi investigada a expressão de receptores Fc- γ (CD16, CD64), sendo observado que monócitos de pacientes com a forma CARD tratados apresentaram maior expressão de CD16, CD64 quando comparados com CARD e indivíduos saudáveis. A expressão de CD32 não sofreu alteração após o tratamento.

A associação dos resultados com os estudos citados sugere que o tratamento com o Bz contribui para uma imunomodulação em pacientes portadores da DC, entretanto não induz amplas alterações da resposta imune. Apesar disso, as interações observadas entre a resposta imune e o Bz são compatíveis com uma possível indução de um equilíbrio da resposta imune, sugerindo uma possível proteção imunológica.

8.2 Dosagem dos níveis de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*

Estudos indicam que a produção de NO por células aderentes tem papel essencial na resistência *in vitro* e *in vivo* anti-*T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994; HOLSCHER et al., 1998). No entanto, quantidades excessivas de NO podem ter efeitos nocivos devido à sua atividade pró-inflamatória. Levando em conta essas condições, investigamos se o Bz poderia afetar a produção de NO por células aderentes infectadas com *T. cruzi*.

De acordo com Revelli et al., (1999), o Bz age diminuindo a produção de NO, entretanto, os dados mostraram que esse fármaco não modificou a produção de NO pelas células aderentes. Revelli et al., (1999), mostraram que macrófagos da linhagem RAW 264.7 de camundongos, após exposição ao Bz e cultivados com LPS e/ou IFN- γ por 24h, apresentavam, independentemente de as células serem ou não estimuladas com LPS e/ou IFN- γ , uma redução dos níveis de nitrito em qualquer uma das concentrações de Bz empregadas. Cevey et al., (2016), em um estudo com camundongos, avaliaram cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* (cepa RA) tratados com Bz e estimulados com LPS e observaram que quando as células foram pré-incubadas com Bz e estimuladas com LPS, ocorreu uma inibição significativa tanto da expressão de NOS2 como o NOS2-dependente. É importante salientar que em um estudo com camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, foi

observado que a gravidade do acometimento cardíaco estava correlacionada positivamente com os níveis séricos de NO (PEREIRA et al., 2014). Há uma linha de estudo que considera que um bom fármaco para o tratamento da DC deveria ter como um de seus mecanismos de ação a indução de uma resposta imune através da produção de NO (GUEDES et al., 2010; SILVA et al., 2010).

No nosso estudo, há um aspecto a ser mencionado que nos leva a considerar o fato de que, apesar do Bz não agir aumentando os níveis de NO, ele também não diminui significativamente os níveis desse mediador. O Bz manteve o equilíbrio na produção de NO, evitando que um perfil pró-inflamatório exacerbado fosse desencadeado. Desse modo, a administração do Bz poderia auxiliar na prevenção da progressão da doença, ou pelo menos na estabilização do quadro clínico, já que não só esse mediador, como também outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios têm sua produção diminuída na presença do Bz (GUTIÉRREZ et al., 2009).

Na infecção pelo *T. cruzi* há um aumento da produção do NO com a finalidade de conter a parasitemia (VESPA et al.1994; GUTIÉRREZ et al., 2009). Sendo assim, nossos estudos estão de acordo com a literatura, já que a condição que continha apenas *T. cruzi* apresentou níveis elevados desse mediador em comparação com a condição C. O que já era de se esperar, devido a presença do parasita. Evidências substanciais mostram que o tecido cardíaco, importante alvo do *T. cruzi*, produz quantidades acentuadas de citocinas, quimiocinas e enzimas, incluindo NO-sintetase e metaloproteinases, resultando em inflamação e remodelamento cardíaco em resposta à infecção parasitária (MACHADO et al., 2008; HOVSEPIAN et al., 2011). Na infecção aguda experimental com *T. cruzi*, as citocinas IFN- γ , TNF- α e outros vários mediadores são produzidos, sendo estes importantes na indução de iNOS e na morte do parasita dependente de NO (TALVANI et al., 2002; MACHADO et al., 2005; MACHADO et al., 2010). Há dados experimentais em camundongos, sugerindo um papel benéfico para o NO na infecção pelo *T. cruzi*, mas nenhum dado definitivo em humanos (CHAN; FLYNN, 2004).

8.3 Avaliação do efeito do tratamento com o Bz sobre a forma intracelular amastigota, após infecção das células aderentes pelos tripomastigotas

No combate inicial à DC, a ativação das células aderentes é fundamental na morte das formas intracelulares do *T. cruzi*, as amastigotas (DOS SANTOS et al., 2016). As amastigotas são de grande importância na patogenia da DC uma vez que constituem a forma intracelular do parasita encontrada nas células do hospedeiro vertebrado.

Para avaliarmos a infecção das células aderentes, investigamos o índice de sobrevivência das formas amastigotas. Os nossos resultados nos levam a supor que o Bz, possa estar induzindo diminuição na infecção, por observarmos uma queda (porém sem significância estatística) no número de amastigotas presentes nas células, bem como na contagem de células aderentes infectadas (sem significância estatística).

Em estudo de Murta et al. (1999), camundongos tratados com o Bz foram infectados com cepas diferentes do *T. cruzi*, sendo uma sensível ao Bz e a outra resistente. Após o tempo de incubação, os macrófagos dos camundongos infectados com a cepa sensível ao Bz mostraram claramente um efeito tripanocida seletivo, mostrando um declínio na percentagem de células infectadas após 24h de incubação.

Um dos grandes questionamentos sobre a administração do Bz está no fato desse fármaco não apresentar eficácia confirmada na destruição dos parasitas na fase crônica (BRAGA et al., 2000). No entanto, na fase aguda, com os parasitas circulantes o tratamento com o Bz tem um resultado positivo (BUCKNER, 2008; URBINA, 1999). Em nosso estudo o Bz teve uma ação direta sobre às células infectadas, sem interferentes na sua ação contra o parasita. Além disso, mediadores químicos como NO e citocinas, também estavam presentes, ocorrendo um somatório de ações que podem ter levado a morte do parasita ou diminuição de sua multiplicação. Alguns estudos relatam que a baixa eficácia antiparasitária dos compostos nitro-heterocíclicos, como o Bz, pode estar relacionada com as suas propriedades farmacocinéticas, como tempo de meia-vida curta, solubilidade, limitada penetração tecidual (RAAFLAUB, 1980; WORKMAN et al., 1984; URBINA; DOCAMPO, 2003).

Todos os nossos resultados foram obtidos com o tempo de 24h já que no tempo de 5d não obtivemos células com morfologia conservada o suficiente para a contagem de parasitas. Associamos esse achado à presença do Bz, já que as células que foram cultivadas sem o Bz não apresentaram nenhuma alteração quanto à sua morfologia. A partir desse achado, iniciamos também a investigação da capacidade fagocítica e da avaliação de morte celular por necrose ou apoptose das células expostas a esse fármaco.

8.4 Avaliação da capacidade fagocítica das células aderentes na presença ou ausência de Bz

A fagocitose é um processo imunológico de grande complexidade. Diversos receptores estimulam a internalização das partículas, os elementos do citoesqueleto que medeiam a internalização diferem pelo sistema receptor e a natureza do patógeno que está sendo internalizado, e o resultado pode ser diferente para os microorganismos (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Os macrófagos são as sentinelas da resposta imune inata à espera do patógeno. Sua resposta fagocítica é definida pela ativação de redes de sinalização complexas que são estimuladas por contato microbiano a partir da identificação do patógeno (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Entender a ação do Bz sobre essas células é de extrema importância, já que a diminuição do processo de fagocitose de uma forma geral é muito ruim para o hospedeiro que perderia essa importante função do sistema imune inato, o deixando vulnerável à presença do parasita.

Os resultados mostram que, há uma tênue diminuição do processo de fagocitose na presença do Bz comparado às células sem tratamento, entretanto, não observamos nenhuma diferença estatística significativa. Portanto, diante dos resultados encontrados, em associação com os resultados da imunofenotipagem, não podemos sugerir que o Bz esteja agindo negativamente sobre a capacidade fagocítica dessas células.

8.5 Avaliação de morte celular por necrose ou apoptose em células aderentes tratadas com Bz após exposição à tripomastigotas de *T. cruzi*

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (OKADA; MACK, 2004; CASTEDO et al., 2004). Devido à importância de identificarmos a ação do Bz, de um modo geral, sobre as PBMCs, avaliamos também a presença de dois tipos de morte: apoptose e necrose.

A apoptose também pode ser chamada de morte celular programada. É um processo fisiológico essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para renovação dos tecidos e para a eliminação de células dispensáveis ou defeituosas. Durante esse processo, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, sendo elas: retração celular, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Uma característica fundamental deste processo é que a membrana celular permanece intacta, prevenindo o extravasamento do conteúdo celular e assegurando assim uma resposta não inflamatória (SAVILL et al., 1990; OPFERMAN; KORSMEYER, 2003)

Ao avaliarmos o perfil de morte celular das células aderentes, não observamos diferenças significativas entre as condições de cultivo para os dois tipos de morte celular. Ficou evidente que a morte por apoptose foi mínima ou até mesmo nenhuma, divergindo do processo de morte por necrose, que foi observado em grande quantidade em ambos os tempos e em todas as condições de cultivo.

No caso das células não aderentes, observamos uma mudança no padrão de morte. O processo de apoptose ocorreu em todas as condições de cultivo, mas, sem apresentar diferenças estatísticas significativas. O processo de necrose foi observado, principalmente, nas condições de cultivo que o Bz esteve presente. Os resultados foram estatisticamente significativos nas condições que continham Bz em comparação com as condições C e C+T. A apoptose das células hospedeiras desempenha um importante papel regulador da imunidade em infecções parasitárias (DOSREIS et al., 2009; DOS REIS; LOPES, 2009). Alguns autores concluíram que a infecção com *T. cruzi* leva à apoptose dos linfócitos T e B (MARTINS et al., 1998; ZUNIGA et al. 2002; MEIS et al. 2006), podendo acarretar em alterações na

resposta imune. Apesar disso, não observamos diferenças significativas no processo de apoptose para ambas as células, quando expostas ao *T. cruzi*.

Por se tratar de um processo, na maioria das vezes, fisiológico, podemos sugerir que a apoptose observada entre as células não aderentes, é resultante de outros processos de indução, e não apenas pela ação do Bz e/ou do *T. cruzi*. Apesar de utilizar outras linhagens celulares, os resultados de Calvo et al. (2013), corroboram com os resultados encontrados concluindo que o Bz não induziu diferenças significativas na apoptose entre as linhagens celulares leucêmicas THP-1 e OCI/AML3, tratadas e controles.

A necrose é um tipo de morte celular patológica ou “acidental” na qual as células sofrem um estímulo que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas, pois, a liberação desse conteúdo gera substâncias que atraem células do sistema imune, causando intensa reação inflamatória: alguns leucócitos (em especial neutrófilos e macrófagos) convergem para o tecido em necrose ingerindo as células mortas (ZIEGLER; GROSCURTH; 2004). A morte é patológica ou "acidental" quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos, lesões por microorganismos e falta de oxigênio. A inflamação, típica da necrose, é importante para limitar infecções e remover restos de células, mas a atividade e as secreções dos leucócitos podem também atingir tecidos normais vizinhos, às vezes de maneira devastadora.

No presente estudo observamos que o Bz induziu a morte celular das PBMCs através de necrose. Esse resultado fica claro quando verificamos diferenças estatísticas significativas ao compararmos a necrose observada em células não aderentes nos dois tempos de cultivo. Em ambos os tempos, observamos que as condições que continham Bz estavam significativamente elevadas em comparação com as condições controle. Além disso, observamos alto percentual de necrose, também entre as células aderentes, entretanto, não observamos diferenças estatísticas significativas entre as condições de cultivo.

Esse dado é de grande relevância, pois, a indução de morte celular por necrose pode causar intensa reação inflamatória (ZIEGLER; GROSCURTH; 2004), o

que seria ruim para os portadores das formas clínicas crônicas mais graves. Apesar desse importante achado, devemos destacar que com relação aos resultados de imunofenotipagem, o Bz não influenciou na expressão de receptores de superfície relacionados com a resposta inflamatória.

9 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o tratamento com o Bz pode ser benéfico aos pacientes, demonstrando um impacto relevante na resposta específica ao *T. cruzi*. O uso desse fármaco não desencadeou um perfil fagocítico e/ou inflamatório exacerbado, aparentemente, agindo sobre o parasita, diminuindo assim a sua proliferação. O Bz induziu a regulação positiva da molécula de ativação CD80 e de apresentação de antígenos HLA-DR, bem como dos receptores de fagocitose (CD64, CD35). Além disso, induziu morte por necrose das PBMCs. Entretanto, não exerceu influência sobre a resposta inflamatória dos portadores crônicos da doença de Chagas, não alterando a produção de NO, além de não agir sobre o processo de fagocitose.

Diante dos achados, acreditamos que a administração do Bz aos portadores crônicos da DC pode ser benéfica, visto que o fármaco não promoveu um perfil inflamatório exacerbado. Assim, os resultados do presente estudo, em conjunto com os achados na literatura, podem fortalecer a hipótese de que o Bz possa prevenir e/ou retardar a progressão para formas mais graves da DC, uma vez que a resposta imune do hospedeiro pode influenciar diretamente na evolução clínica dos portadores da doença. Por fim, estudos prospectivos que avaliem a carga parasitária após a adição do Bz, juntamente com avaliação da ação desse fármaco sobre células da resposta imune, são necessários para o entendimento dos mecanismos envolvidos na tríade resposta imune/*T. cruzi*/Bz.

REFERÊNCIAS

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

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macro-phages. Annual Review Immunology, Palo Alto, v. 17, p. 593–623, 1999.

AGUIAR, C. et al. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with Benzonidazole. Tropical Medicine and Internacional health, Oxford, v. 17, n. 3, p. 368-373, 2011.

AKIRA S., TAKEDA K., KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Immunology, New York, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, Leioa, v. 124, p. 783-801, 2006.

ALBAREDA M. C.; LAUCELLA S. A. Modulation of *Trypanosoma cruzi*-specific T-cell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 414-421, 2015.

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

ANDRADE, J. P. et al. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, São Paulo, v. 96, n. 6, p.434-442, 2011.

BAHIA, M. T. et al. Fexinidazole: A potential new drug candidate for Chagas disease. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 11, p. 1870, 2012.

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

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of Immunology, Baltimore, v. 177, n. 6, p. 3515-3592, 2006.

- BARRET, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and Leishmaniasis. British Medical Bulletin, London, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- 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.
- BELGE, K. U. et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. Journal of Immunology, New York, v. 168, n. 7, p. 3536-3542, 2002.
- BERGERON, M.; OLIVIER, M. Trypanosoma cruzi-Mediated IFN- γ -Inducible Nitric Oxide output in macrophages Is regulated by iNOS mRNA stability. Journal of Immunology, New York, v. 177, P. 6271-6280, 2006.
- BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. The journal of the American Medical Association, Chicago, v. 298, n.18, p. 2171-2181, 2007.
- BRAGA, M.S. et al. Persistent infection in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, n. 42, p. 157-161, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 38, supl. 3, p. 29, 2005.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Boletim Epidemiológico de São Paulo, São Paulo, v. 46, s. 21, p. 1-9, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 25, supl. 3, p. 7-86, 2016.
- BRODSKYN, C. et al. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. Infection Immunity, Washington, v. 70, n. 7, p. 3736-3743, 2002.
- BUCKNER, F. S. Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. Advances Experimental Medicine and Biology, New York, v. 625, p. 61-80, 2008.
- CALVO, K. L. et al. Benznidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells. Immunopharmacology and Immunotoxicology, New York, v. 35, n. 4, p. 478-486, 2013.

- CÁMARA, M. M. et al. Laboratory techniques to obtain different forms of *Trypanosoma cruzi*: applications to wild-type and genetically modified parasites. Folia Parasitologica, Praha, v. 60, n.15, p. 406-410, 2013.
- CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. Immunobiology, Stuttgart, v. 220, p. 564-574, 2015.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. Frontiers in Immunology, Boston, v. 6, n 659, p.3-15, 2016.
- CARRENO, B. M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 20, p. 29-53, 2002.
- CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene, Basingstoke, v. 23, p. 2825-2837, 2004.
- CEVEY, A. C. et al. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, Amsterdam, v. 6, n. 1, p.12-22, 2016.
- COURA, J. R. et al. Estudo Comparativo Controlado com Emprego de Benznidazole, Nifurtimox e Placebo, na Forma Crônica da Doença de Chagas, em uma Área de Campo com Transmissão Interrompida. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 30, p 139-144, 1997.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v, 97, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 31-40, 2009.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery, A systemic review. Acta Tropica, Netherlands, v. 113, p. 5-13, 2010.
- COURA, J. R.; VINÃS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature outlook, London, v. 465, p. 6-7, 2010.

CUTRULLIS, R. A. et al. Benznidazole Therapy Modulates Interferon- γ and M2 Muscarinic Receptor Autoantibody Responses in *Trypanosoma cruzi*-Infected Children. PLoS ONE, San Francisco, v. 6, n. 10, p. 1-5, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205037/>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

DA COSTA, T. A.; SILVA, M. V.; MENDES, M. T. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting Tc1 and Tc2 populations. Journal of Immunology, New York, v. 2014, p. 1-12, 2014.

DAYYANI, F. et al. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. Journal Leukocyte Biology, Wiston-Salen, v. 74, n.1, p.33-39, 2003.

DE AVALOS, S. V. et al., Immediate/Early Response to *Trypanosoma cruzi* Infection Involves Minimal Modulation of Host Cell Transcription. The Journal of Biological Chemistry, New York, v. 277, n. 1, p. 639-644, 2002.

DE MEIS J. et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways. Microbes and Infection, Paris, v. 8, p. 221-231, 2006.

DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. Parasitology today, Cambridge, v. 3, p. 336-341, 1987.

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

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

DOS-SANTOS, A. L. A. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. Experimental Parasitology, New York, v. 167, p. 67-75, 2016.

DOSREIS, G.A.; LOPES, M.F. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, s. 1, p. 259-262, 2009.

DUFFY, T. et al. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. PLoS Neglected Tropical Disease, San Francisco, v.3, n. 4, p. e419, 2009. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2667272/>>. Acesso em: 20 set. 2016.

- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- DUTRA, W. O. et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* infection. Scandinavian Journal of Immunology, Oslo, v. 45, n.1, p. 74-80, 1997.
- DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases, London, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008.
- FLÓREZ, O.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, C. L. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. Human Immunology, New York, v. 73, n. 8, p. 852-858, 2012.
- FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benznidazol. Arquivos brasileiros de cardiologia, São Paulo, v. 65, supl. 1, p.71, 1995.
- FREEMAN, G. J. et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. Science, Washington, v. 262, p. 909-911, 1993a.
- FREEMAN, G. J. et al. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. Journal of Experimental Medicine, New York, v. 178, p. 2185-2192, 1993b.
- GALLERANO, R. H.; SOSA, R. R. Resultados de estudio a largo plazo con drogas antiparasitarias em infectados chagásicos crônicos. Revista da Federação Argentina de Cardiologia, Buenos Aires, v. 30, p. 289-296, 2001
- GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations in mice. Antimicrobial agents and chemotherapy, Washington, v. 49, p. 1521-1528, 2005.
- GAZZINELLI, R. T. et al. The micro-bicidal activity of interferon-g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-b. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 22, p. 2501-2506, 1992.
- GOMES, J. A. S. et al. Impaired phagocytic capacity driven by down regulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. Immunobiology, Stuttgart, v. 217, p. 1005-1016, 2012.

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, Washington, v. 71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

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

GREEN, L. C. TANNENBAUM, S. R., GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science, Washington, v. 212, p. 56-58, 1981.

GUEDES, P. M. M. et al. Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. Tropical Medicine International Health, Oxford, v.17, n. 9, p. 1057-1065, 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUTIERREZ, F.R. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunology, Oxford, v. 31, p. 673-685, 2009.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, v. 56, n. 1, p.115-123, 2011.

HOTEZ P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HOLSCHER, C. et al. Defective nitric oxide effect or functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. Infection and Immunity, Washington, v. 66, p.1208–1215, 1998.

HOTEZ, P. J. et al. Chagas disease: 'the new HIV/AIDS of the Americas'. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1498, 2012. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001498>>. Acesso em: 20 set. 2016.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. Microbes and Infection, Paris, v. 16, s. 8, p. 601-606, 2014.

HOVSEPIAN, E. et al. Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy- Δ 12,14 prostaglandin J (2) in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. International Journal of Parasitology, Oxford, v. 41, p. 553–562, 2011.

ISHII, K. J. et al. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. Cell Host & Microbe, Cambridge, v. 3, p. 352-363, 2008.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes and Infection, Paris, v. 12, n. 5, p. 511-517, 2010.

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

KIERSZENBAUM, F.; RAMIREZ, M. A. Modulation of sensitivity of blood forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated, complement-dependent lysis. Infection and Immunity, Washington, v. 58, p. 119–123, 1990.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. International Review Immunology, Los Angeles, v. 30, s. 1, p. 16-34, 2011.

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

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

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

LEGUIZAMÓN, M. S. et al. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. Journal Infection Disease, Thailand, v. 180, n. 4, p.1398–1402, 1999.

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

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

MACHADO, F. S. et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Journal Infection Disease, Oxford, v. 191, p. 627–636, 2005.

- MACHADO, F. S. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. Microbes and Infection, Paris, v. 10, p. 1558–1566, 2008.
- MACHADO F. S.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA M. M. New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. British Journal of Pharmacology, London, v. 160, p. 258-259, 2010.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 3816, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003816>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- MARAÑÓN, C. et al. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. International Immunology, Oxford, v. 12, n. 12, p.1685–1693, 2000.
- MARIN-NETO, J. A. et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). American Health Journal, California, v. 156, n.1, p. 37-43, 2008.
- MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, supl. 1, p. 319-324, 2009.
- MARTES, A. C. B.; FALEIROS, S. M. Acesso dos imigrantes bolivianos aos serviços públicos de saúde na cidade de São Paulo. Saúde e Sociedade, São Paulo, v. 22, supl. 2, p. 351-364, 2013.
- MARTINS, G. A. et al. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunology Letters, Amsterdam, v. 63, p. 113-120, 1998.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Acta Tropica, Basel, v. 130, p.167-174, 2014.
- MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biology Research, Santiago, v. 43, n. 3, p. 323-331, 2010.
- MAYENCEA, A. et al. Bis(oxyphenylene)benzimidazoles: A novel class of anti-*Plasmodium falciparum* agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry, Oxford, v. 19, n. 24, p. 7493-7500, 2011.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Revista Brasileira de Reumatologia, Campinas, v. 50, n. 11, p. 552–580, 2010.

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

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

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes by stander cardiac cell damage. Immunology, Edinburgh, v. 66, p. 289–295, 1989.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. The New England Journal of Medicine, London, v. 373, n. 14, 2015.

MURCIA, L. Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR result. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Berlin, v. 35, n. 11, p. 1819-1827, 2016.

MOLINA, I. et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. New England Journal of Medicine, Boston, v. 370, n. 20, p.1899-1908, 2014.

MOREIRA, O. C. et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. Acta Tropica, Basel, v. 125, n. 1, p. 23-31, 2012.

MURTA, S. M. F. et al., In-vivo treatment with benzonidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. Parasite Immunology, Oxford, v. 21, p. 535-544, 1999.

NASCIMENTO, A. V. Avaliação das quimiocinas e da expressão de seus receptores em células mononucleares de pacientes portadores da doença de Chagas submetidas à infecção in vitro com *Trypanosoma cruzi* e tratamento com Benzonidazol. 2015. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociência e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, 2015.

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

NARDY, A. F.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Immunology Research, Baltimore, v. 2015, p. 1-7, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512591/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

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

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nature Review Cancer, London, v. 4, p. 592-603, 2004.

OLIVIERI, B. P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAUJO-JORGE, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. Antimicrobial Agents Chemotherapeutic, Oxford, v. 46, p. 3790-3796, 2002.

OPFERMAN, J. T.; KORSMEYER, S. J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. Nature Immunology, London, v. 4, p. 410-415, 2003.

OVERTVELT, et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and co-stimulatory molecules. Infection and Immunity, Washington, v. 67, p. 4033–4040, 1999.

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

PEREIRA, I.R. et al. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 109, p. 289-298, 2014.

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

- RAAFLAUB, J. The bioavailability of orally administered drugs with special regard to the liver as a filter for foreign matter. Schweizerische Medizinische Wochenschrift, Basel, v. 110, p. 354-362, 1980.
- RASSI, Jr. A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. Lancet, London, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN γ induces macrophage activation and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *T. cruzi* infection. The Journal of Immunology, New York, v. 140, p. 4342-4347, 1988.
- REINER, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. Immunology Today, Cambridge, v. 15, p. 374-381, 1994.
- REVELLI, S. et al. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. Clinical Experimental Immunology, Oxford, v. 118, p. 271-277, 1999.
- REY, L. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.
- ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.
- RIBEIRO, V. Ciclo de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Disponível em: <<http://chaguismo.blogspot.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- RUDD, C. E.; TAYLOR, A.; SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunological Review, Copenhagen, v. 229, n. 1, p. 12-26, 2009.
- RUSSO, D. M. et al. Human T cell responses in Leishmania infection. Progress and Clinical Parasitology, Boca Raton, v. 3, p. 119-144, 1993.
- SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. Infection and Immunity, Washington, v. 69, p. 2252-2259, 2001.
- SAHA, B. et al. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 25, p. 2492-2498, 1995.

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

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

SAVILL, J. S. et al. Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature, London, v. 343, p. 170-173, 1990.

SCHMUNIS, G. A.; YADON Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Tropica, Basel, v. 115, n. 2, p. 14-21, 2010.

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

SILVA, J. S. et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 3, n. 1, p. 111-115, 1998.

SILVA, G. K. et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. The Journal of Immunology, New York, v. 184, n. 3, p. 1148–1152, 2010.

SILVEIRA, C. et al. Living conditions and access to health services by Bolivian immigrants in the city of São Paulo, Brazil. Caderno de Saúde Pública, São Paulo, v. 29, s. 10, p. 2017-2027, 2013.

SOARES, A. K. A. Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 is altered in CD14+HLA-DR+ monocytes from patients with Chagas disease following induction by *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 49, n. 5, p. 632-636, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo, v. 97, n. 2, supl.3, p. 1-48, 2011.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R., SEGURA, E. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, p. 167–180, 2009.

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

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

SZAFLARSKA, A., et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. Experimental Hematology, Amsterdam, v. 32, n. 8, p. 748-755, 2004.

TALVANI, A. et al. Leukotriene B (4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infection and Immunity, Washington, v. 70; p. 4247–4253, 2002.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Current Opin. Immunology, Edinburgh, v. 19, n. 4, p. 430e434, 2007.

TATAKIHARA, V. L. et al. Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia. Chemico-Biological Interactions, Amsterdam, v. 227, p. 104-111, 2015.

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

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

TURLEY, S. J. et al. Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. Science, Washington, v. 288, p. 522-527, 2000.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 20, p. 825–852, 2002.

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

URBINA, J. A.; DO CAMPO, R. Specific chemoterapic of chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitology, Oxford, v. 19, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Tropica, Basel, v. 115, n. 1, p. 55-68, 2009.

VAZQUEZ, A.; RUIZ-ROSADO, J. D.; TERRAZAS, L. I. Mouse macrophage galactose-type lectin (mMGL) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. International Journal of Biological Sciences, Lake Haven, v. 10, n. 8, p. 909-920, 2014.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infection and Immunity, Washington, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with Benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. American Heart Journal, St. Louis, v. 127, n. 1, p. 151-162, 1994.

YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins sans Frontières. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 3, n. 7, p. e488, 2009. Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2700957/>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. Trends Parasitology, Oxford, v. 18, n. 6, p. 272-278, 2002.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. Immunology Today, Cambridge, v. 17, n. 9, p. 424-428, 1996.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. News in Physiological Science, Mariland, v. 19, p. 124-128, 2004.

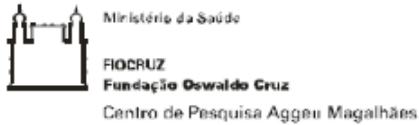
ZUÑIGA, E. et al. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. Journal of Immunology, Baltimore, v. 168, p. 3965-3973, 2002.

WORKMAN, P. et al. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. British Journal of Cancer, London, v. 50, p. 291-303, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Geneva, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>> Acesso em: 30 jul. 2015.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Paciente



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Portador da doença de Chagas

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

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

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

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

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

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

Consentimento Pós-Informação

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

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

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

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia Maria Barros de Lorena
CPqAM/Fiocruz
Pesquisadora Responsável

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário Controle



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Não Portador da doença de Chagas

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

Sua participação é necessária, pois, como não portador da doença de Chagas, o seu sangue será utilizado como controle negativo, fazendo uma comparação com o sangue de um paciente que é portador da doença. Sua participação é voluntária e se dará através de dois itens: (1) coleta de até 9 (nove) colheres de chá de sangue (45 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). O sangue será utilizado para: **obtenção de soro** (parte líquida) para confirmação da infecção, para realização do **cultivo das células do sangue** quando em contato com o parasito e com o remédio com o objetivo de: (i) verificar produção de citocinas e quimiocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), (ii) analisar a presença de marcadores de superfície celular (que identifica quais células são e se houve aumento ou diminuição da população de células), (iii) dosar a quantidade de óxido nítrico (que também está envolvido na defesa contra as doenças). (2) Será preenchido um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida serão analisados.

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

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

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

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

Consentimento Pós-Informação

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

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

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

Data: ___ / ___ / ____

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena

CPqAM/Fiocruz

Pesquisadora Responsável

APÊNDICE C

Artigo publicado



Rev Soc Bras Med Trop 49(5): September-October, 2016
doi:10.1590/S0037-8682-0149-2016

Short Communication

Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 is altered in CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes from patients with Chagas disease following induction by *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens

Ana Karline de Araújo Soares^[1], Patrícia Areias Feitosa Neves^[1],
Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti^[2,3], Sílvia Martins Morinho^[2,3],
Wilson de Oliveira Júnior^[2,3], Joelma Rodrigues de Souza^[4],
Virginia Maria Barros de Lorena^[1,3] and Yara de Miranda Gomes^[1,3]

[1]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil. [2]. Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPS) - Universidade de Pernambuco, Recife Pernambuco, Brasil. [3]. Programa Integrado de Doença de Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. [4]. Universidade Federal de Paraíba, Departamento de Fisiologia e Patologia, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Abstract

Introduction: The relationships between monocytes and lymphocytes through MHC class II molecules and costimulatory, are of utmost importance for the production of an efficient immune response. In this work, we assessed the expression of surface molecules CD80 and CD86 on CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes from patients with Chagas disease. **Methods:** The study population consisted of 31 patients with chronic clinical forms of Chagas disease. Patient blood samples were cultured in the presence of recombinant cytoplasmic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA). **Results:** We found considerable differences in the expression profile of surface molecules involved in antigen presentation. **Conclusions:** CRA and FRA may contribute to host immune response evasion by *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: Chagas disease, Immune response, Recombinant antigens.

Chagas disease (CD) remains one of the most important infectious and parasitic diseases in Latin America that is still related to poverty^[1]. The chronic phase of this disease manifests in three main clinical forms: indeterminate (IND), cardiac (CARD), and digestive^[2]. CARD is considered to be responsible for the high morbidity and mortality in infected people, occurring in most symptomatic patients^[3]. It is believed that the pathological manifestations of the disease are a consequence of multifactorial mechanisms involving both parasite and the patient^[4]. Several studies have reported the importance of the host immune response in combating the parasite and its role in the clinical evolution of the disease^[5]. Accordingly, activation of the immune system is responsible for controlling parasitemia in the acute phase and the inflammatory reaction in specific organs^[6]. Not surprisingly, some organisms have evolved mechanisms to escape the host immune system, such as decreasing the modulatory response of antigen-presenting cells (APCs) and expressing co-stimulatory molecules^[7].

The human leukocyte antigen-antigen D related (HLA-DR) receptor found on the surface of APCs stimulates the adaptive immune response by presenting peptides to cluster of differentiation 4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes^[8]. Co-stimulatory molecules CD80 and CD86 play an important role in promoting activation and differentiation of T lymphocytes^[9]. These molecules are recognized by the CD28 receptor, which is expressed on almost all T cells^[10]. The signaling cascade elicited by the binding of co-stimulatory molecules to CD28 acts in conjunction with the one triggered by the interaction of the T-cell receptor and co-receptor with the peptide-major histocompatibility complex (MHC) on the surface of APCs^[11].

Most studies on the immune response of patients with CD have used soluble parasite antigen preparations. This may prevent the detection of a specific immune response as these preparations include a complex mixture of antigens. Therefore, the use of defined parasite reagents such as recombinant antigens becomes an important requirement for the identification of molecules critical for parasite-host interactions and in studies of the immunopathology of CD^[12]. Cytoplasmic repetitive antigen (CRA) and flagellar repetitive antigen (FRA)^[13] have been used by our group to study the development of immunological markers for the prognosis of chronic clinical forms of CD.

Corresponding author: Dra. Yara de Miranda Gomes.
e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br
Received 2 May 2016
Accepted 22 July 2016

We believe that in chronic human infection, the development/maintenance of immunological memory is determined primarily by CRA rather than by FRA, which is present in the flagellum of trypomastigotes. Here, we evaluated the antigen-presenting ability of CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes obtained from peripheral blood of patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. To do so, we assessed the expression of CD80 and CD86 before and after *in vitro* stimulation with *T. cruzi* CRA and FRA.

The study population consisted of 31 patients with chronic clinical forms of CD recruited at the Emergency room Cardiology of Pernambuco (PROCAPE), University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco. The population represented a convenience non-probabilistic sample and was recruited between January 2011 and January 2012. Inclusion criteria were: positive serology for Chagas infection in two tests with different methodological principles; clinical examination for proper characterization of the clinical form; lack of previous etiological treatment; no digestive complaints, such as dysphagia and constipation; no reported changes in leukocyte count; and no blood transfusion or organ transplantation. Additionally, based on their medical records and survey forms, patients did not report any other diseases. The patients included in the CARD2 group (n = 14, 24 to 71 years old, four men and ten women) had dilatation of the cardiac area, with an ejection fraction < 40%, and/or augmented left ventricular area. Characterization of the cardiac dilatation was performed through posteroanterior chest radiography and the ejection fraction was estimated by the Teichholz method using an echo-Doppler cardiogram, following guidelines by the American Society of Echocardiography. Patients included in the CARD1 group (n = 10, 41 to 70 years old, three men and seven women) presented electrocardiogram alterations and no dilatation of the cardiac area, with an ejection fraction > 55% in the echo-Doppler cardiogram. Patients included in the IND group (n = 7, 38 to 63 years old, four men and three women) did not show any cardiac and digestive alterations. The control group (NI) consisted of individuals (n = 7, 36 to 60 years old, three men and four women) not infected by *T. cruzi* and selected according to the following criteria: they had not lived at any time in an area endemic for CD; they had never received a blood transfusion; the serological test for CD was negative; and they did not present alterations in leukocyte blood count.

CRA and FRA were obtained as described by Krigger et al.¹⁹, and were prepared at the Department of Diagnostic Reagents of Bio-Manguinhos before being sent to the Immunoparasitology Laboratory at Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). They were further evaluated for any contamination with bacterial proteins and carbohydrates, as described by Pereira et al.²⁰

Heparinized peripheral blood was cultured for about 24h and diluted 1:1 in 14mL polypropylene tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) containing RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine, 1% antibiotics (stock solution of 10,000U penicillin and 10,000U streptomycin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). Blood was stimulated as described by Lenets et al.²¹

After *in vitro* incubation, cells were treated with 20mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich),

washed with phosphate-buffered saline (PBS)-Wash (containing 0.5% bovine serum albumin and 1% sodium azide; Sigma-Aldrich), and centrifuged at 400 × g for 10 min at 22-25°C. The supernatant was discarded leaving a final volume of 1mL in which the pellet was resuspended. Aliquots (100µL) of the cell suspension were placed in polystyrene tubes (5mL; BD Biosciences) containing fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD14 (Cat #: MA 1-82074; 5µL), PerCP-conjugated anti-HLA-DR (Cat #: MHLDR31; 2.5µL), phycoerythrin-conjugated anti-CD80 (Cat #: MA1-10288; 2.5µL), or allophycocyanin-conjugated anti-CD86 (Cat #: MA1-10294 or MHC8605; 2.5µL; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) monoclonal antibodies and incubated for 30 min at room temperature. After incubation, erythrocytes were lysed by the addition of 2mL lysing solution (2.8% sodium citrate, 30% diethylene glycol, 54% formaldehyde 37%, 0.04% heparin - United States Pharmacopoeia - USP 100,600). Next, cells were washed with PBS-Wash and fixed with 200µL BD Cytotfix™ (BD Biosciences). Samples were stored at 4°C until further analysis by flow cytometry.

Sample acquisition and analysis were performed on a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems). The population of CD14⁺ cells was selected by side scatter (SSC) versus FL1 dot plot; a total of 1,000 events were acquired within the R1 window. After selecting the window of interest (R1), CD14⁺ monocytes presenting the surface HLA-DR receptor were analyzed by plotting two-dimensional graphs of point fluorescence distributions, from which the percentage of labeled cells was derived. To analyze the expression of surface molecules on CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes, a window of interest (R2) was selected in the FL1 versus FL3/FL4 two-dimensional graphs, allowing triple-labeled cells to be detected.

Statistical analysis of cell profile data was performed using PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). To confirm the assumption of homogeneity, the Bartlett test was used. To compare values of surface molecule expression *ex vivo* and *in vitro*, the Wilcoxon test for paired samples was used. All conclusions were based on a 5% significance level.

First, we assessed the expression of CD80 on CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes before and after antigen stimulation. We observed that after stimulation with CRA and FRA, expression of CD80 *in vitro* increased significantly in all groups compared to *ex vivo* samples (Figure 1A-E). Only in IND patients treated with FRA, statistical difference could not be found (Figure 1E). Analysis of CD86 expression on CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes (Figure 2) revealed a significant decrease in individuals with the CARD form of CD, i.e., CARD1 and CARD2, following stimulation with CRA (Figure 2A – Figure 2D) compared to *ex vivo* samples (Figure 2B – Figure 2C). Again, no statistical difference was observed in the IND group (Figure 2A). When stimulated with FRA (Figure 2E – Figure 2H), we found that only the CARD1 group showed a statistically significant decrease of CD86 compared to *ex vivo* samples (Figure 2F).

The induction of an effective immune response depends directly on activation of APCs, since stimulation of T cells requires interaction between their receptors and the

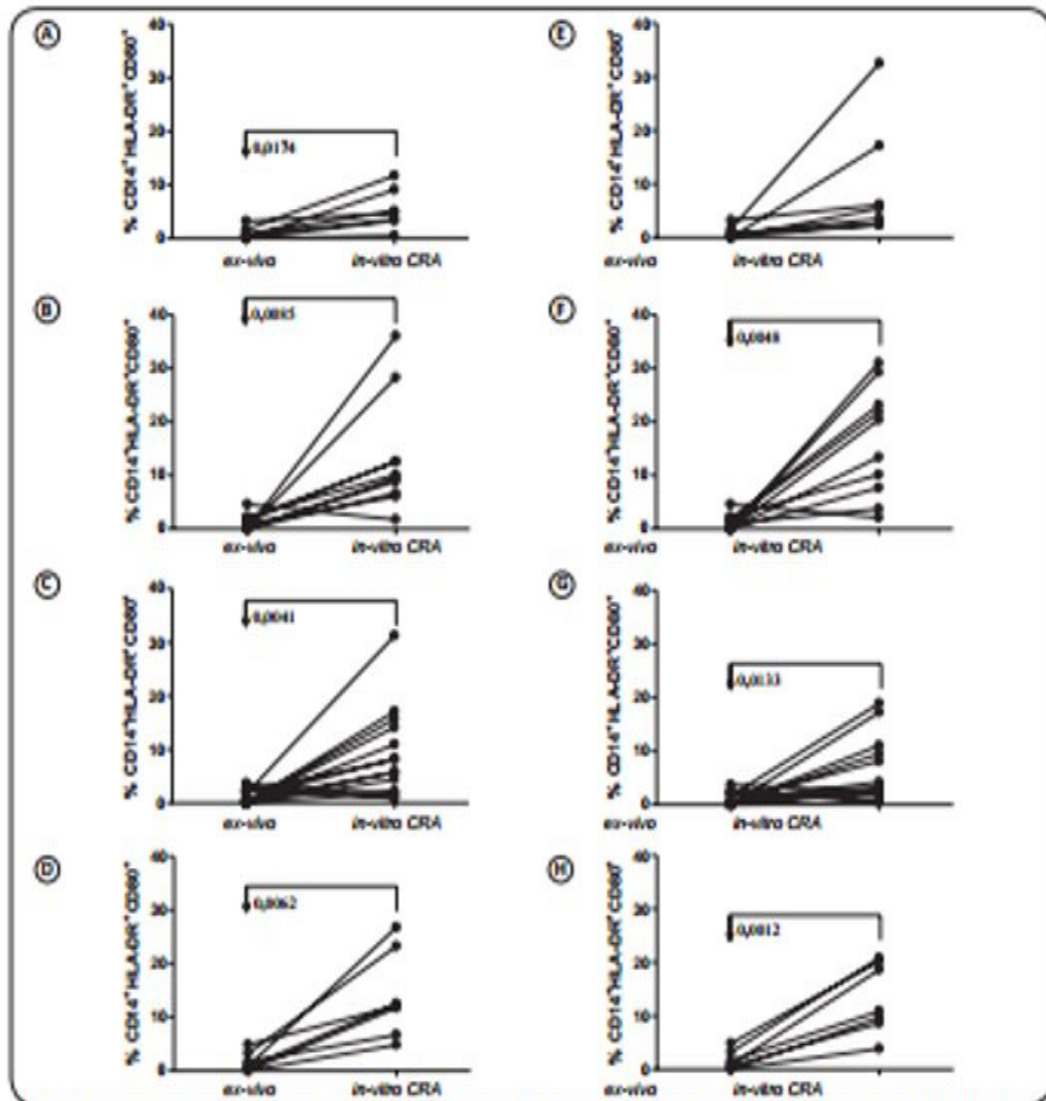


FIGURE 1. Expression of CD80 on the surface of CD14⁺HLA-DR⁺ peripheral blood cells from patients with CD after stimulation with CRA or FRA. Patients were grouped according to the clinic form of CD: (A and E) IND (n = 7); (B and F) CARD1 (n = 10); (C and G) CARD2 (n = 14); and (D and H) NI individuals, (n = 7). Statistically different values with $p < 0.05$ are indicated. CD: cluster of differentiation; HLA-DR: human leukocyte antigen-DR; CD: Chagas disease; CRA: cytoplasmic repetitive antigen; FRA: flagellar repetitive antigen; IND: indeterminate; CARD: cardiac; NI: non-infected individuals.

peptide-MHC³⁸. Next, we carried out functional studies of CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes by monitoring the expression of co-stimulatory molecules involved in immunopathological processes of CD.

During antigen processing and presentation, APCs need stimuli to express co-stimulatory molecules, such as CD80 and CD86, which are important to promote the activation and differentiation of T lymphocytes^{39,40}. CD86 is constitutively

expressed and, therefore, it is more abundant on the surface of monocytes than CD80, which is expressed only following stimulation^{39,40}.

When we evaluated the expression of these molecules on the surface of CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes stimulated with CRA or FRA, we observed that expression of CD80 was higher in all groups (except for the IND group after stimulation with FRA), compared to *ex vivo* readings. Our results are in agreement

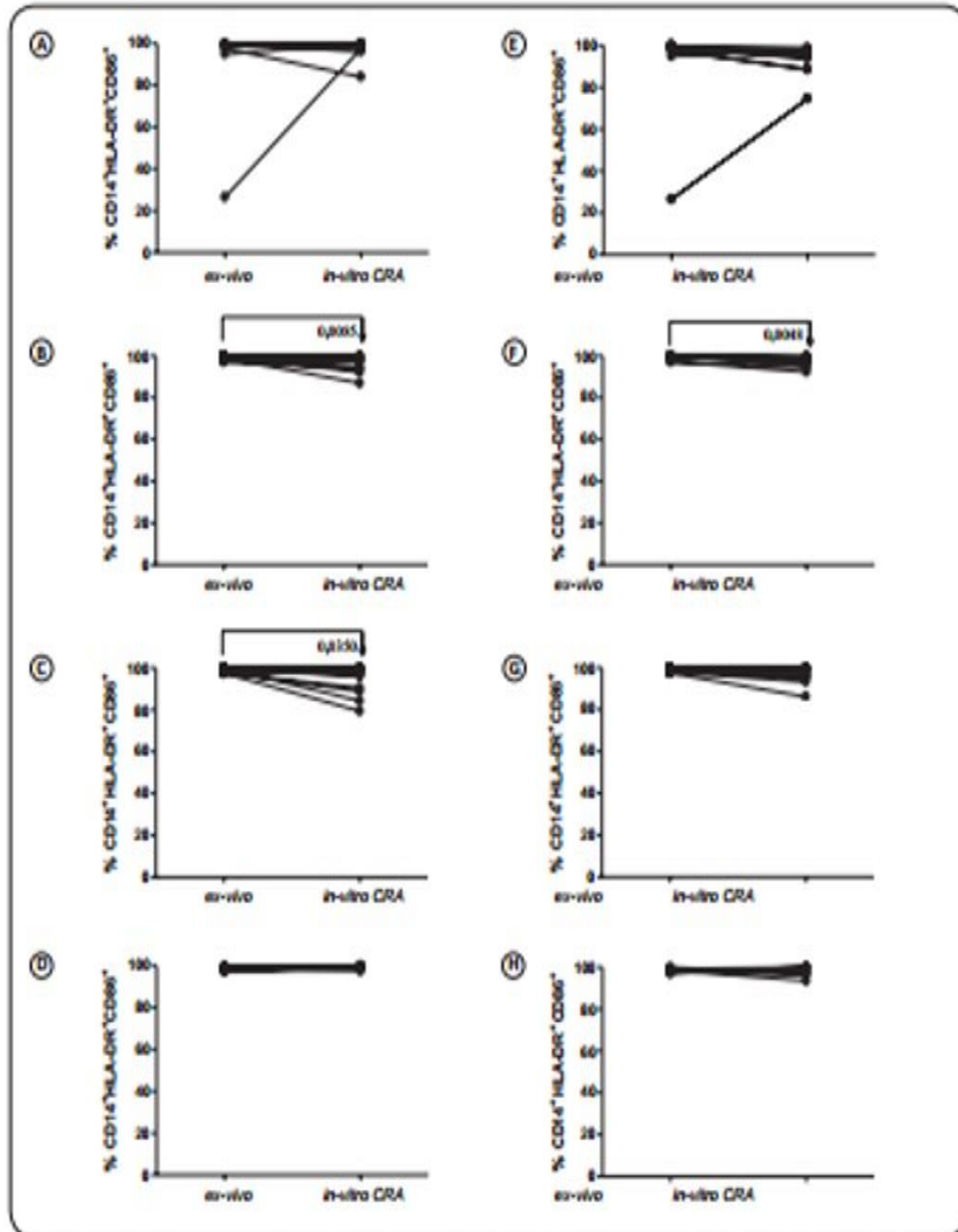


FIGURE 2. Expression of CD86 on the surface of CD14⁺HLA-DR⁺ peripheral blood cells from patients with CD after stimulation with CRA and FRA. (A and E) IND (n = 7), (B and F) CARD1 (n = 10), (C and G) CARD 2 (n = 14), and (D and H) NI (n = 7). CD8: cluster of differentiation; HLA-DR: human leukocyte antigen-DR; CD: Chagas disease; CRA: cytoplasmic repetitive antigen; FRA: flagellar repetitive antigen; IND: indeterminate; CARD: cardiac; NI: non-infected individuals. Statistically different values with $p < 0.05$ are indicated.

with those of Souza et al.¹⁰⁹, who also reported an increased expression of CD86 on the surface of monocytes following *T. cruzi* infection of adherent cells. Our results showed a significant increase in the percentage of CD86-expressing CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes after stimulation with both antigens in patients with CARD. This finding suggests that increased expression of CD86 favors T cell stimulation, leading to a possible biased Th1 profile¹⁰⁹.

When evaluating the expression of the co-stimulatory molecule CD86 on the surface of CD14⁺HLA-DR⁺ monocytes, we found it was lower in patients with cardiac clinical forms (CARD1 and CARD2) stimulated with either CRA or FRA. These findings are in agreement with the results reported by Souza et al.¹⁰⁹, in which a decrease in the expression of CD86 was observed in monocytes of patients with CARD forms. Our data, together with findings reported by other authors, suggest that alterations in the expression of co-stimulatory molecules are an important step in the development of a cellular immune response against *T. cruzi*. The latter may release soluble immunosuppressive factors to disrupt the immune system and provide an escape mechanism to evade the host immune response^{109,110,116}. Further studies evaluating the effect of co-stimulatory and inhibitory molecules on T cell activation will be required to fully elucidate the host evasion mechanisms developed by *T. cruzi*.

In summary, here we show that during the course of chronic CD, there are important differences in the expression profile of surface molecules involved in antigen presentation. Thus, prospective studies linking the expression of stimulatory (CD28) and inhibitory (CTLA-4) T cell proteins, and of co-stimulatory molecules CD80 and CD86, may be important to assess the evolution of CD immunopathology.

Ethical considerations

The recruitment of individuals and the experimental protocols were approved by the Research Ethics Committee of CPqAM/Fiocruz (CAEE: 0155.0.095.000-08). All patients included in this study signed an informed consent form.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial Support

The study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Univemal Edital nº 478572/2009-7 and CNPq/Papes V/Fundação Oswaldo Cruz Edital nº 40776/2012-8). Y.M. Gomes is a research fellow of CNPq (No. 308896/2009-8). During the study, AKA Soares received a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE MSc scholarship.

REFERENCES

1. World Health Organization. Chagas Disease: Fact Sheet and Poster. Research and Training in Tropical Diseases. Geneva: World Health

Organization; 2015. Accessed February 25, 2016. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

2. Andrade LO, Machado CR, Chiari F, Pena SD, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* 2002; 100:269-278.

3. Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisoni MG, Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitemia, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun* 1999; 67:308-318.

4. Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CAS, Chaves ACL, Gollob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 2004; 72:5283-5291.

5. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2005. 580p.

6. Lafaille JJ, Linsé J, Krüger MA, Souto-Padrão T, de Souza W, Goldenberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35:127-136.

7. Krüger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krüger H, et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:427-434.

8. Pereira VRA, Lorenz VMB, Nakazawa M, Silva APG, Montarroyos U, Correa-Oliveira R, 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* 2003; 36:435-440.

9. Lorenz VMB, Lorenz EMB, Itaxá SCM, Melo AS, Melo MPAD, Melo MGAC, et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after *in vitro* stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 2010; 72:529-538.

10. Souza PEA, Rocha MOC, Menezes CAS, Cedhe JS, Chaves ACL, Gollob KJ, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun* 2007; 75:1886-1894.

11. Lanzhou DJ, Sperling AI, Cooke MP, Freeman G, Rhee L, Decker DC, et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994; 153:1990-1997.

12. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003; 71: 1185-1193.

13. La Flamme AC, Kahn SJ, Rudensky AY, Van Voorhis WC. *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Eur J Immunol* 1997; 27:3085-3094.

14. Van Oortvelt L, Vanderheydt N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* 1999; 67: 4033-4040.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM



Comitê de Ética
em Pesquisa

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

Pesquisador responsável: Virginia Maria Barros de Lorena.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 10/09/12

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 29/12

Registro no CAAE: 07511612.2.0000.5190

PARECER Nº 26/2013

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 05 de junho de 2016. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 05 de junho de 2013.

Coordenadora do CEP/CPqAM

Observação:

Anexos:

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

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

