

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO,  
IMUNORREGULAÇÃO E MORBIDADE NA DOENÇA DE  
CHAGAS**

**ANDRÉIA MARIA MOLICA**

BELO HORIZONTE  
2007

ANDREIA MARIA MOLICA

**Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na  
doença de Chagas**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.**

ORIENTADOR: Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

CO-ORIENTADORES: Dra. Juliana de Assis G. Estanislau

Dra. Maria José Ferreira Morato

BELO HORIZONTE

2007

Molica, Andréia Maria  
M 721a Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas/Andréia Maria  
Molica. Belo Horizonte, 2007.  
vii,83f.,  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.  
Área de concentração: Medicina Tropical - Infectologia  
Orientador: Manoel Otávio da Costa Rocha  
Co-orientadores: Juliana de Assis G. Estanislau, Maria José Ferreira Morato  
1.Doença de Chagas/imunologia 2.Linfócitos B/imunologia  
3.Macrófagos/imunologia 4.Sistema imune/parasitologia 5.In vitro  
6.Trypanosoma cruzi/imunologia I.Título

NLM: WC 705  
CDU: 616.937.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Reitor**

Ronaldo Tadeu Pena

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Jaime Arturo Ramirez

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Carlos Alberto Pereira Tavares

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor**

Prof. Francisco José Penna

**Chefe do Departamento de clínica médica**

Prof. Dirceu Bartolomeu Greco

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA  
E MEDICINA TROPICAL.**

**Coordenador**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Sub-Coordenador**

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Junior

**Colegiado**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Carlos Maurício Figueiredo Antunes

Prof. José Roberto Lambertucci

Fátima Lúcia Guedes Silva (Representante Discente)

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, Belo Horizonte.

### **COLABORADORES**

Dr. Rodrigo Correa Oliveira

Ms. Ana Thereza Chaves

Vladimir Martins Pinheiro

Dr<sup>a</sup> Glenda Meira Cardoso

**ÓRGÃOS FINANCIADORES:** CNPq,  
CPqRR e FIOCRUZ

Dedico este trabalho à minha filha, minha mãe,  
minha irmã, minha sobrinha e ao Ricardo que sempre  
estiveram presentes em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha filha Sofia, por representar o amor mais sincero e puro da minha vida.

À minha mãe Manoela, por estar presente em todos os momentos da minha vida, em especial, neste momento, no qual seu apoio e carinho foram fundamentais para execução deste trabalho.

Ao Ricardo, pelo carinho, paciência, compreensão, apoio e incentivo, mesmo distante sempre esteve presente.

À minha irmã Regina, minha sobrinha Bianca meu cunhado Luciano e a Naiana, pelo carinho, incentivo.

À Tia Linda e meus primos Késsia, Sandra Anderson, Cristiano e Kátia pelo carinho e incentivo.

Ao Dr. Manoel Otávio, pela preciosa orientação na minha formação profissional. Pelo carinho e paciência em ensinar ciência. Pelo exemplo profissional ético, dedicado e competente.

Ao Dr. Rodrigo por ter me recebido em seu laboratório e por ter confiado em meu trabalho. Obrigada, pela orientação extra oficial neste trabalho, pela oportunidade de aprendizado tanto profissional quanto pessoal.

À Dr<sup>a</sup>. Maria José agradeço pela disponibilidade, entusiasmo, e pelo exemplo de profissional e cientista. Obrigada pela paciência, por todos os ensinamentos e pelos conselhos que me ajudaram a crescer.

À Dr<sup>a</sup> Juliana pela confiança, disponibilidade, compreensão e entusiasmo. Obrigada pelos ensinamentos que enriqueceram este trabalho.

Aos grandes amigos Ana Thereza e Vladimir, pelos bons momentos e pelas longas horas de conversa, pela convivência doce, pelos ensinamentos e pelo carinho. Agradeço também pela ajuda valiosa na execução da parte prática deste trabalho.

À amiga e irmã Pollyanna pelo apoio e incentivo num momento importante da minha vida. Obrigada pela amizade sincera, pelo carinho e pela ajuda na parte escrita deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Andréa Teixeira, pelos esclarecimentos na parte de citometria de fluxo.

Ao Dr. Ricardo Fujiwara pela ajuda no processamento de parte dos dados deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Eveline Gomes, pelo incentivo e ensinamentos na iniciação científica, pela especial contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR: Solange, Luanda, Denise, Rodolfo, Matheus, Tiza, Iramaya, Isabela, Felipe, Ramon, Amanda, Alex, Luciana Maria, Haroldo, Wesley, Glenda, Leila, Carol, Simone, Paulinha, Diana, Flávio, Anne, Guilherme, Vanessa, Stefan, Roberta.

Aos colegas do grupo chagas: Glenda, Jaqueline, Fernanda, Rafaele.

A todos os funcionários do laboratório de imunologia, pela disponibilidade e competência na realização de procedimentos que facilitam nosso trabalho em especial, Ana Pacheco, Rita e Sérgio pela disposição e simpatia em ajudar.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisas René Rachou.

Aos colegas da Faculdade de Medicina, agradeço pelos bons momentos pela companhia que tornaram estes momentos mais alegres.

A Elen e Débora, secretárias do curso de pós-graduação em Ciências da Saude, obrigada pela disponibilidade e ajuda na resolução dos processos burocráticos.

Aos professores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos que contribuíram intensamente para minha formação.

Aos amigos de Juiz de Fora: Fabrícia, Nobuiki, Maria Imaculada, Diana, Michela, Priscila, Beatriz, Idálio, Waguinho, Deise, por torcerem por mim.

Aos amigos da UAI, pelo carinho e compreensão.

Aos pacientes pela disposição em doar o sangue voluntariamente para execução deste trabalho. Obrigada pela preciosa contribuição.

Quem, de três milênios, não é capaz de se dar conta, vive na ignorância, na sombra, à mercê dos dias, do tempo.

**Goethë**

## ÍNDICE

Lista de Tabelas .....	I
Lista de Figuras .....	II
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	IV
Resumo .....	VI
Abstract .....	VII
1.0 – Introdução .....	1
2.0 – Objetivos .....	13
2.1 - Objetivo Geral .....	13
2.2 - Objetivos Específicos.....	13
3.0 - População Estudada .....	14
4.0 - Material e Métodos .....	16
4.1 - Obtenção do antígeno solúvel do parasito da forma epimastigota do T.cruzi .....	16
4.2 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico .....	16
4.3 – Remoção de células aderentes .....	17
4.4 - Ensaio de proliferação celular .....	19
4.5 - Obtenção de sobrenadantes de cultura para detecção dos níveis de prostaglandina E2 e de citocinas .....	20
4.6 – Análise do fenótipo celular de leucócitos do sangue periférico .....	25
4.7 - Avaliação do padrão de citocinas nos sobrenadante de cultura de PBMC e células NA após estimulação in vitro .....	31
4.8 - Quantificação dos níveis de Prostaglandina E2 nos sobrenadantes de cultura.....	27
4.9. Análise estatística .....	28
5.0. Resultados.....	

5.1 Ensaio de proliferação de PBMC e de células NA, estimuladas com antígeno de T.cruzi .....	30
5.2 Ensaio de proliferação de PBMC, estimuladas com antígeno de T.cruzi, na presença de indometacina.....	32
5.3 Avaliação da expressão de HLA-DR nas populações de monócitos em cultura de PBMC e células NA.....	34
5.4 Avaliação da expressão das moléculas CD80 e CD86 na população de monócitos em cultura de PBMC e NA.....	35
5.5 - Dosagem de PGE2 em sobrenadantes de culturas de PBMC e de células NA.....	37
5.6 - Avaliação da expressão de HLA-DR na população de linfócitos B CD19+ em cultura de PBMC e células NA.....	38
5.7 Avaliação da expressão de moléculas CD80 e CD86 na população de linfócitos CD19+, em culturas de PBMC e de células NA.....	40
5.8 Avaliação do padrão de citocinas produzidas nos sobrenadantes das culturas de PBMC e de células NA .....	42
5.9 – Resumo dos resultados .....	47
6.0. Discussão.....	48
7.0. Conclusão.....	59
8.0. Referências Bibliográficas.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: População Estudada.....	15
Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados para análise do fenótipo de leucócitos de sangue periférico.....	24

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Análise do percentual de monócitos obtidos antes e após remoção de células aderentes.....	18
FIGURA 2: Análise de linfócitos do sangue periférico após estimulação <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i> .....	23
FIGURA 3 : Análise de monócitos do sangue periférico após estimulação <i>in vitro</i> com antígenos do <i>T. cruzi</i> .....	24
FIGURA 4: Análise quantitativa de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	27
FIGURA 5. Proliferação celular de PBMC e células não aderentes.....	31
FIGURA 6. Proliferação celular de PBMC após adição de indometacina.....	33
FIGURA 7. Expressão de HLA-DR na população de monócitos em cultura de PBMC e células NA.....	35
FIGURA 8. Expressão de CD80 na população de monócitos em cultura de PBMC e células não aderentes.....	36
FIGURA 9. Expressão de CD86 na população de monócitos em cultura de PBMC e células não aderentes.....	36
FIGURA 10. Dosagem de PGE2 em sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	38
FIGURA 11. Expressão de HLA-DR na população de linfócitos B em cultura de PBMC e células não aderentes.....	39
FIGURA 12. Expressão de CD80 na população de linfócitos B em cultura de PBMC e células NA.....	41
FIGURA 13. Expressão de CD86 na população de linfócitos B em cultura de PBMC e células não aderentes.....	41
FIGURA 14 Dosagem de IL-2 em sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	43
	44

FIGURA 15. Dosagem de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	
FIGURA 16. Dosagem de IFN- $\gamma$ em sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	45
FIGURA 17. Dosagem de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC e células não aderentes.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
AR	Altos respondedores
BR	Baixos respondedores
C	Cultura controle
CARD	Pacientes portadores da forma clínica cardíaca
CD	Pacientes portadores da forma clínica cardiodigestiva
CD	Grupos de diferenciação (cluster of differentiation)
CPM	Contagem por minuto
CTLA-4	Proteína 4 associada ao Linfócito T citotóxico (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
DIG	Pacientes portadores da forma clínica digestiva
ECG	Eletrocardiográfico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Receptores prostanóides
EPI	Antígeno de epimastigota
FACS	Separação de células ativadas por fluorescência – citômetro de fluxo (Fluorescence activated cell sorter)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	Dispersão frontal (forward scatter)
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICAM	Molécula de adesão intercelular

IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Imunidade mediada por células
IND	Pacientes portadores da forma clínica indeterminada
INDO	Indometacina
LFA	Antígeno funcional de leucócitos
LPS	Lipopolissacárides
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NA	Células não aderentes
NI	Grupo não infectado
NK	Célula natural killer
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS-W	Tampão fosfato salínico de lavagem
PE	Ficoeritrina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RPMI	Meio de cultivo celular
SSC	Dispersão lateral (side scatter)
Th1	Células T CD4 <sup>+</sup> secretoras de padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 <sup>+</sup> secretoras de padrão 2 de citocinas
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	Organização mundial da saúde

## RESUMO

Trabalhos anteriores mostraram que células da imunidade inata produzem prostaglandinas que atuam como moléculas reguladoras da resposta imune a vários agentes etiológicos, incluindo o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel de monócitos/macrófagos como célula reguladora, através da produção de PGE<sub>2</sub> e de citocinas, bem como o de célula apresentadora de antígeno em indivíduos não infectados (NI) e portadores da doença de Chagas, com as formas clínicas indeterminada ou cardíaca.

Células mononucleares totais (PBMC) e não aderentes (NA) do sangue periférico foram isoladas. Parte destas células foi submetida ao ensaio de proliferação celular, durante seis dias, na presença e ausência de antígenos do *T. cruzi*, a outra parte foi cultivada durante dezoito horas, após este período coletou-se o sobrenadante para dosagem de PGE<sub>2</sub> e de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ . As células foram utilizadas para análise fenotípica dos marcadores CD14, CD19, HLADR, CD80 e CD86.

A resposta proliferativa a antígenos do *T. cruzi* mostrou-se aumentada nos indivíduos dos grupos IND e CARD quando comparados ao grupo NI. Porém após remoção das células aderentes houve aumento da resposta proliferativa nos indivíduos NI. A adição de bloqueador (indometacina) de PGE<sub>2</sub> as culturas de PBMC evidencia a formação de dois subgrupos dentro do grupo IND: altos respondedores (AR) e baixos respondedores (BR), mostrando que o bloqueio de PGE<sub>2</sub> pode influenciar a resposta proliferativa nos indivíduos do grupo IND. A dosagem de PGE<sub>2</sub> apresentou níveis semelhantes entre os grupos IND e CARD quando comparados ao grupo NI sugerindo um papel de molécula reguladora de PGE<sub>2</sub> na tentativa de retorno a homeostasia do sistema imune. Por outro lado a dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , mostraram níveis aumentados em quase todas as culturas estimuladas quando comparada as culturas sem estímulo.

O estudo do fenótipo de células mononucleares totais e células não aderentes mostraram que células CD14<sup>+</sup> expressam moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 com intensidade semelhante nas culturas estimuladas ou não com *T. cruzi*, porém, apesar de não haver significância, é possível observar no grupo IND uma expressão menor de moléculas HLA-DR e CD 80. Já as células CD19<sup>+</sup> expressam moléculas HLA-DR e CD80 com intensidade significativamente maior nas culturas NA estimuladas quando comparadas às culturas sem estímulo. Demonstrando que linfócitos B em culturas empobrecidas de macrófagos intensificam sua função de APC.

Os dados em conjunto sugerem que linfócitos B têm sua função de APC regulada por macrófagos frente estimulação antigênica pelo *T. cruzi* independente da resposta secundária, uma vez que células de indivíduos NI apresentam o mesmo perfil fenotípico dos pacientes estudados.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, macrófagos, linfócito B, APC, resposta imune.

## Abstract

It has been demonstrated that cells from innate immune response secreted prostaglandins that act as regulators of the immune response against some infectious agents as the pathogen of Chagas disease, the *Trypanosoma cruzi*.

In this work we evaluated the monocytes/macrophages activity as regulatory cells, by the production of PGE<sub>2</sub> and cytokines, and as antigen presenting cells (APC) in non infected individuals (NI) and patients with the indeterminate(IND) or cardiac (CARD) clinical forms of Chagas disease.

We isolated peripheral blood mononuclear cells (total and not adherent) and performed cellular proliferative assays in the presence or not of *T. cruzi* antigens. After eighteen hours of culture, the supernatants were assayed for the presence of PGE<sub>2</sub>, IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$ . Expression of CD14, CD19, HLA-DR, CD80 and CD86 markers were performed in the culture cells.

Our data showed a high proliferative response of IND and CARD patients when compared to the NI group, in the presence of antigen. After removal of the adherent cells we observed an increase in the proliferative response of cells from the NI group. In the presence of Indomethacin, a PGE<sub>2</sub> blocker, we observed that the proliferative response of cells from IND patients could be subdivided into high (AR) and down (BR) responders. These results demonstrate that the PGE<sub>2</sub> inhibition influences the cellularproliferate response of IND patients. It interesting to note, that IND and CARD patients presented similar levels of PGE<sub>2</sub> in comparison to NI group. These data evidence that PGE<sub>2</sub> has an important role as an immune regulatory molecule. Our results also showed higher levels of IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  cytokines in antigen stimulated cultures when comparied to non the stimulated.

Phenotypical analyses of PBMC and NA populations demonstrated that CD14<sup>+</sup> cells have similar expression of HLA-DR, CD80 and CD86 in cultures stimulated or not with *T. cruzi* antigen. IND patient's cells presented lower HLA-DR and CD80 expression although not significant. Analyses of CD19<sup>+</sup> cells in NA stimulated cultures showed higher expression of HLA-DR and CD80 molecules when compared with non stimulated cultures. These results demonstrated that in the absence of macrophages, B-lymphocytes may function as antigen presenting cells.

These data suggest that in presence of *T. cruzi*, APC function of B-lymphocytes is regulated by macrophages, independent of the secondary response, since NI cells presented the same phenotypical profile by the patients with Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, macrophages, B-lymphocytes, APC, immune response.

## **1.0 - INTRODUÇÃO**

A doença de Chagas, infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, encontra-se desde o norte do México até o sul da Argentina, e atinge cerca de 16 a 18 milhões de indivíduos (Organização Mundial da Saúde, 2002).

A incidência da doença é a maior em áreas rurais onde condições precárias de vida facilitam o contato com os insetos triatomíneos (Bogitsh *et al.*1999). Os insetos são conhecidos como “barbeiros”, onde o *T. cruzi*, na forma epimastigota, vive no interior do intestino, não invadindo outras partes do corpo, e multiplica-se por fissão binária. No intestino posterior – reto e ampola retal – do barbeiro, essa forma adere pelo flagelo às células da parede do intestino e se diferencia para a forma tripomastigota metacíclica, altamente infectante para vertebrados. Os “barbeiros” adquirem o *T. cruzi* ao ingerir sangue de animais infectados e os transmite para o homem e outros vertebrados pelas fezes, geralmente após se alimentar de sangue. Quando o inseto faz seu repasto, através da pele de um vertebrado, há um grande aumento de líquido em seu organismo e, em consequência, ele rapidamente excreta parte desse líquido na urina ou nas fezes, liberando junto as formas tripomastigotas metacíclicas. Incapazes de atravessar a pele íntegra, essas formas morrem assim que os dejetos do inseto secam, mas, antes disso, podem invadir o organismo e iniciar a infecção se entrarem em contato com mucosas ou com alguma área lesada da pele do hospedeiro. As formas tripomastigotas metacíclicas não se multiplicam no sangue do hospedeiro vertebrado, mas invadem seus tecidos. Após penetrarem nas células, as formas tripomastigotas escapam do vacúolo fagocítico e se estabelecem no citoplasma celular, onde se transformam nas formas amastigotas e passam a se dividir. Após cinco dias, dezenas ou centenas de amastigotas sofrem um processo de alongamento e se transformam em formas tripomastigotas, as quais, por sua

grande motilidade, provocam o rompimento da célula e os parasitos livres invadem outras células próximas ou alcançam a corrente sangüínea disseminando a infecção para diferentes órgãos e sistemas. Esse ciclo leva a um crescimento exponencial das populações parasitárias intracelulares e conseqüentemente ao aumento da parasitemia (Brener, Andrade e Barral-Neto; 2000).

No Brasil, desde a década de 1970, diretrizes de combate a doença foram direcionadas no sentido de interromper, o mais rapidamente possível, a transmissão vetorial através do emprego de inseticidas eficientes, bem como melhorias das habitações rurais, com adequada higiene e limpeza das mesmas na tentativa de se evitar a presença do vetor nas residências. Concomitantemente, sabendo-se que transmissão sanguínea é o segundo modo de transmissão de importância epidemiológica, principalmente nos grandes centros urbanos, foram adotadas medidas preventivas que permitiram controlar, também, a transmissão por meio das transfusões de sangue e derivados. Assim sendo, foram estancados os dois mananciais mais importantes que, anualmente, aumentava em cerca de 100.000 novos casos da doença no Brasil (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005)

Com o êxito inicial representado pela eliminação dos triatomíneos de hábitos essencialmente domésticos, em especial o *Triatoma infestans*, os esforços se concentram atualmente no sentido de manter os resultados obtidos, consolidar o controle de focos residuais e impedir o estabelecimento de novos focos de transmissão vetorial (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005).

O *T. cruzi* pode induzir uma fase aguda de curta duração (8-12 semanas), caracterizada por elevada parasitemia, facilmente detectada em exames de sangue à fresco. As principais manifestações clínicas nessa fase são os sinais de porta de

entrada para o parasito, febre, linfadenopatia, esplenomegalia e miocardite. Essas manifestações são normalmente detectadas em crianças, entretanto a maioria dos indivíduos infectados, a fase aguda muitas vezes passa despercebida (Prata, 2001). A primeira reação ao *T. cruzi* durante a fase aguda implica na migração de células mononucleares para o foco da lesão onde há ruptura das células parasitadas (Andrade, 1991) liberando, então, citocinas que desencadeiam o processo inflamatório. As lesões tendem a ser difusas e mais graves no coração. A destruição de células parasitadas ou não, durante a fase aguda, parece ser importante na patogenicidade da doença, especialmente para indução de disfunções cardíacas e digestivas que podem ocorrer tardiamente (Andrade, 1983; Andrade, 1994). Na maioria dos casos agudos, os sintomas clínicos são seguidos por uma aparente recuperação completa da miocardite. A queda da parasitemia ocorre em decorrência da resposta imune efetora do hospedeiro, dando início à fase crônica. Nessa fase, os tripomastigotas sanguíneos são detectados apenas por métodos parasitológicos indiretos como xenodiagnóstico, hemocultura, ELISA e PCR (Minter-Goedbloed *et al.*, 1978; Cedilhos *et al.*, 1982, Bronfen *et al.*, 1989; Chiari *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1993; Degraive *et al.*, 1994, Zarate-Blates, 2007). Esses métodos são altamente específicos, porém menos sensíveis e eficazes para o diagnóstico de rotina.

Do ponto de vista clínico, os indivíduos nessa fase podem ser classificados como pertencentes às formas clínicas: indeterminada (IND), cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardio-digestiva (CD). Os pacientes portadores da forma clínica indeterminada correspondem cerca de 60-70% dos indivíduos infectados, apresentam testes sorológicos e/ou parasitológicos positivos para o *T. cruzi*, e os exames clínicos, eletrocardiográficos (ECG) e radiológicos (área do tórax, esôfago e cólon) sem qualquer alteração (Rocha *et al.*, 2003). No entanto, exames adicionais e

mais sofisticados podem demonstrar nesses pacientes algumas alterações e anormalidades, geralmente discretas, que podem significar tanto um processo evolutivo em marcha como apenas resquícios de processo agudo ou crônico inicial já cicatrizado e sem progressão clínica ou anatômica (Dias, 2000; Rocha *et al.*, 2003). Acredita-se que cerca de 2 a 5% dos pacientes apresentando a forma clínica IND irão desenvolver a forma clínica CARD a cada ano, enquanto um menor percentual irá apresentar a forma clínica DIG (megacólon e/ou megaesôfago) (Dias, 1989). Aproximadamente 30% dos pacientes podem apresentar a forma clínica CARD que se caracteriza por distúrbios de condução e de contractilidade do coração, levando ao surgimento de arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (Rocha *et al.*, 2003). A infecção chagásica pode, ainda, gerar em 5 a 10% dos pacientes, alterações anatômicas e funcionais do trato gastrointestinal, como denervação da musculatura lisa que reveste a parede do tubo digestório, dificuldades na deglutição e defecação, além de processos de dilatação de estruturas esofagianas e intestinais (megas), caracterizando a forma clínica DIG (Koberle, 1968; Macedo, 1982; De Rezende, 1988). Finalmente, à forma clínica CD, sendo a menos comum, e nela se associam alterações de órgãos dos sistemas digestório e cardiovascular.

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença de Chagas e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. Acredita-se que estas manifestações são conseqüências de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo), ao homem (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) ou ao ambiente (Dias, 2000; Vago, 2000; Macedo, 2004).

A escassez de parasitos contraposta à intensidade e extensão das lesões, assim como o prolongado período de latência que precede essas lesões, tem levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns autores apontam para a existência de reação cruzada entre os componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (Kierszenbaum, 1986; Al-Sabbagh *et al.*, 1998; Cunha-Neto *et al.*, 1995, Cunha-Neto *et al.*, 1996; Levitus *et al.*, 1991; Van Voorhis & Eisen, 1989; Acosta & Santos-Buch, 1985; Wood *et al.*, 1982; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000, Montran *et al.*, 2000). Além disso, outros autores têm discutido que a resposta autoimune contra antígenos presentes no tecido cardíaco pode favorecer o desenvolvimento da forma mais severa da cardiopatia chagásica. Anticorpos contra receptores adrenérgicos e colinérgicos estão entre os anticorpos mais bem descritos na doença de Chagas (Borda *et al.*, 1984; Borda e Sterin-Borda, 1996; Sterin-Borda, *et al.*, 1999). Talvani e colaboradores em 2006, mostraram que indivíduos com cardiopatia chagásica crônica (CCC) tem elevados níveis de anticorpos anti peptídeos de receptores adrenérgicos e colinérgicos quando comparados a indivíduos não infectados.

Embora um grande volume de evidências indique que os parasitos intracelulares *per se* exerçam papel insignificante na patogênese da doença de Chagas (Brener, 1987), trabalhos recentes sugerem que o parasitismo intracelular pode ser mais freqüente do que previamente demonstrado por microscopia óptica, sugerindo haver, na doença de Chagas, uma participação direta da reatividade imune contra células parasitadas (Añez *et al.*, 1999, Higuchi *et al.*, 1993, 1997, Vago *et al.*, 1996; Palomino *et al.*, 2000).

Entretanto, outros fatores além dos parasitos, têm importância na patogênese da miocardite chagásica, como a própria resposta imune assim como alterações nos

mecanismos de regulação. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes.

Baseado nos aspectos imunológicos, a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode ser caracterizada pelo balanço entre o acúmulo de uma eficiente resposta imune (inata e adaptativa) e a presença de poucos parasitos no tecido do hospedeiro. Este balanço pode levar a um longo período assintomático da doença, mas em uma porção significativa dos pacientes, por razões desconhecidas, ocorre um distúrbio nessa regulação favorecendo o aparecimento das manifestações clínicas graves da doença na fase crônica (Jones *et.al* – 1993, Garg e Tarlenton, 2002).

A resposta imune inata não desempenha apenas funções defensivas logo após a infecção, mas também estimula e direciona as respostas imunes adaptativas (Akira *et al*, 2001; Kaisho *et. al.*, 2001). A ativação dos macrófagos representa um evento relevante da imunidade inata na resistência à infecção pelo *T. cruzi*. O processo de fagocitose mediado por macrófagos é capaz de ativar a produção de uma série de citocinas inflamatórias, tais como IL-12 e TNF- $\alpha$ , que contribuem para produção de IFN- $\gamma$  por células NK (Silva *et al.*,1992). A produção de IFN- $\gamma$  leva a redução da parasitemia e a mortalidade de animais infectados, promovendo a estimulação de macrófagos e a produção de metabólitos tóxicos para o parasito (Silva *et al.*,1992; Cardillo *et al.*,1996; Holscher *et al.*,1998; Silva *et al.*,1995; Vespa *et al.*,1994). Além disso, a regulação da expressão de quimiocinas e de INF- $\gamma$  associados ao decréscimo do parasitismo nos tecidos pode ser responsável pela controle da inflamação e imunopatogenia observados nos tecidos cardíacos na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Talvani *et al.*, 2000).

Por outro lado, a produção de IL-10 pelos macrófagos parece ser um mecanismo associado à susceptibilidade dos animais à infecção pelo *T. cruzi* (Silva *et al.*,1992) devido, provavelmente, ao seu papel regulador sobre a ativação de macrófagos induzida pelo IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de metabólitos tóxicos quanto a diferenciação de células com perfil de citocinas do tipo 1 (Reed,1988; Cardillo *et al.*,1996).

Cabe ressaltar que, embora um perfil de resposta imune inflamatório seja relevante para o controle da infecção, uma excessiva estimulação da resposta imune poderia também causar danos ao hospedeiro por estimular respostas inflamatórias exacerbadas (Hunter *et al.*, 1997). Um estudo recente em humanos demonstrou que monócitos derivados de pacientes do grupo IND apresentam características moduladoras como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de IL-10, enquanto monócitos derivados de pacientes do grupo CARD parecem estar comprometidos com intensa resposta inflamatória devido à alta expressão de TNF- $\alpha$  (Souza *et al.*, 2004,). Desta forma, monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas apresentam perfis fenotípico-funcionais distintos, sugerindo uma dicotomia nos mecanismos de controle e desenvolvimento da patologia cardíaca.

Além disso, a imunidade inata fornece sinais importantes para estimular a proliferação e a diferenciação dos linfócitos T e B antígeno-específica. Dentro deste contexto, após internalização de moléculas antigênicas por fagocitose, os macrófagos podem digerí-las e externá-las no contexto de moléculas do complexo principal histocompatibilidade (MHC) de classe II, atuando, assim, como células apresentadoras de antígeno (APC) para os linfócitos T. Desta forma, os linfócitos ao serem ativados secretariam citocinas e outras moléculas mediadoras para a própria

população de linfócitos T, B e, ainda para os macrófagos. Por outro lado, está claro que as APCs estão freqüentemente envolvidas na regulação da resposta de células T. Uma das estratégias usadas por vários microrganismos patogênicos para escapar do sistema imune do hospedeiro é a modulação das funções co-estimuladoras e apresentadoras de antígenos das APCs. Considerando a resposta imune como resultado destas interações celulares, desencadeadas pelo estímulo antigênico, a imunidade mediada por células (IMC) em infecções por patógenos intracelulares tem sido avaliada *in vitro* tanto em população total de leucócitos, como em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos normais sensibilizadas *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*.

Os estudos realizados sobre a resposta imune celular na infecção chagásica têm sido desenvolvidos através da análise da reatividade *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), após a estimulação antigênica específica, bem como por estudos da composição celular de diferentes compartimentos, produção de citocinas, entre outros. A resposta de proliferação de PBMC de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas tem demonstrado que essas células são capazes de proliferar quando estimuladas *in vitro* por antígenos do *T. cruzi* (Mosca et al., 1979, Gusmão et al., 1984; De Titto et al., 1985, Morato et al., 1986; Gomes, 2002; Michailowsky et al., 2003). Entretanto, nenhuma relação foi encontrada entre a resposta de proliferação das PBMC e as formas clínicas CARD e IND. Diferenças na intensidade de resposta de proliferação de PBMC de pacientes aos antígenos do parasito foram demonstradas por Morato et al., 1996; onde dois padrões de resposta foram observados: (1) “baixos respondedores” que correspondiam a 32% dos pacientes, nos quais as PBMCs eram incapazes de responder aos seis diferentes antígenos derivados de clones ou cepas

do parasito e (2) “altos respondedores”, correspondendo a 69% dos pacientes, que apresentavam resposta proliferativa de PBMC a, pelo menos, um antígeno. Esses pesquisadores demonstraram, ainda, aumento da reatividade celular nesses pacientes, após remoção de macrófagos, sugerindo, então, estreita correlação entre o nível da resposta proliferativa de PBMC e a estimulação das células aderentes. Posteriormente, foi verificado que a atividade reguladora dos macrófagos sobre a proliferação dos linfócitos estava relacionada à produção de prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) e IL-10 (Morato, 1994, Pinge-Filho *et al.*, 1999; Barros-Mazon, *et al.* 2004). A proliferação celular decorrente da ativação por mitógenos ou antígenos do parasito é intensificada em culturas tratadas com indometacina, inibidor de cicloxigenase, sugerindo que  $PGE_2$  participa da regulação da resposta linfoproliferativa (Castes *et al.*, 1986). A  $PGE_2$ , sintetizada por macrófagos ativados, é uma molécula moduladora capaz de inibir a síntese de IL-2 por linfócito T, bem como de seu receptor, reduzir a produção de IFN- $\gamma$ , inibir a síntese de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12 por macrófagos e induzir a produção de IL-10 (Rappaport *et al.*, 1982; Kunkel *et al.*, 1986; Strassmann *et al.*, 1994; Van Der Pouw Kraan *et al.*, 1995 Scales, 1989; Michelin *et al.*, 2005), além de alterar a apresentação de antígeno por inibir a expressão de moléculas do MHC de classe II (Snyder, 1982).

Portanto, as  $PGE_2$  teriam papel importante no balanço das respostas Th1 e Th2, uma vez que inibem drasticamente a produção de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-2, direcionando a resposta imune para um perfil Th2 (Walker *et al.*, 1983; Cillari *et al.*, 1986;). A capacidade de  $PGE_2$  em modular a resposta das células T poderia ser extremamente benéfica no contexto da infecção pelo *T. cruzi*, sendo um componente essencial para a proteção do hospedeiro através de sua habilidade de limitar uma resposta imune exagerada (Th1) induzida pelo parasito (Gomes *et al.*, 2003).

Entretanto, a presença destas moléculas pode também ser prejudicial para o hospedeiro uma vez que podem auxiliar na persistência do patógeno suprimindo uma resposta imune eficiente.

As PGE<sub>2</sub> podem também exercer efeito modulador na ativação e diferenciação dos linfócitos B, inibindo a expressão de moléculas de MHC de classe II e de receptores de baixa afinidade para a região Fc da IgE, além de diminuir a produção de IgM. Em contraste, a PGE<sub>2</sub> aumenta a produção de IgE e sinergicamente aumenta a produção de IL-4, potencializando o padrão de resposta imune para o tipo Th2 (Fedyk e Phipps, 1997).

Outra função moduladora das PGE<sub>2</sub> está associada à capacidade de controlar a atividade das APCs profissionais, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (Harizi, *et al.*, 2001). Em macrófagos a PGE<sub>2</sub> inibe fortemente a expressão das moléculas ICAM-1, CD80 e CD86, envolvidas na apresentação de antígenos, através dos receptores prostanoídes (EP) 2 e EP 4, (Morichika *et al.*, 2003).

Durante o processamento e apresentação de antígenos as APCs profissionais necessitam de estímulos para a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) e de adesão (LFA-1), importantes para promover ativação e diferenciação dos linfócitos T, além de favorecer interações entre células B e a produção de anticorpos (Freeman, *et al.*, 1993a, Freeman, *et al.*, 1993b). Embora os linfócitos B careçam de atividade fagocítica, eles têm a capacidade de capturar, processar e apresentar antígenos às células T auxiliares. Eles mostram-se especialmente eficazes na apresentação de antígenos que se ligam especificamente às suas imunoglobulinas de superfície. Em geral, os linfócitos B com especificidade apropriada são muito escassos por ocasião do primeiro contato com o antígeno,

entretanto, tornam-se cada vez mais importantes como APC, à cada exposição. Numerosos estudos têm abordado diferentes aspectos da função de apresentação de antígeno por linfócitos B nas últimas duas décadas, mostrando a importância dessas células como APC na resposta imune primária e secundária (Rodriguez-Pinto, 2005). Dentro desse contexto, os linfócitos B podem induzir tolerância ou gerar resposta imune, dependente do seu estado de ativação (Saoudi, *et al.*, 1995; Yuschenkoff, *et al.*, 1996; Townsend e Goodnow, 1998; Tsitoura, *et al.*, 2002). Linfócitos B expressando receptor de célula B (BCR) com alta afinidade podem induzir proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> após incubação com antígeno solúvel em baixa concentração, mostrando que células B possuem mecanismo altamente eficiente para a concentração de pequenas quantidades de antígeno, o que resulta em uma intensificação de sua apresentação, podendo modular a resposta imune contra o antígeno (Batista e Neuberger, 1998; Guermonprez, *et al.*, 1998). Outros estudos mostram que nas doenças auto-imunes as células B têm um papel central como células apresentadoras de antígenos (Liang e Mamula, 2000). A auto-reatividade de células B e T co-existem num repertório normal, mas sua ativação é dependente de vários fatores genéticos e ambientais. As células B auto-reativas são importantes APCs na iniciação e desenvolvimento da resposta imune por células T CD4<sup>+</sup> a antígenos próprios, pois seu BCR não pode determinar a origem do antígeno (próprio ou estranho). Isto contrasta com as outras APCs, onde a ativação depende do reconhecimento do padrão molecular do antígeno, ou seja, do antígeno patogênico. Portanto, em muitos casos, a auto-imunidade pode surgir quando antígenos que estão seqüestrados tornam-se acessíveis, permitindo que células B reconheçam esses antígenos, e os apresente as células T CD4<sup>+</sup>, amplificando as respostas auto-imunes.

Na doença de Chagas, a ocorrência de auto-imunidade continua sendo um aspecto fundamental na compreensão da patogênese da doença. Estudos demonstraram que pacientes com a forma clínica CARD da doença de Chagas apresentam níveis elevados de células B CD5<sup>+</sup> no sangue periférico e após estimulação *in vitro* com anticorpos específicos contra o parasito (Dutra *et al.*, 2000). Células B CD5<sup>+</sup> têm sido associadas à patologia na doença de Chagas experimental (Minoprio, 1991) e também tem sido observada a presença dessas células em doenças auto-imunes (Becker, 1990; Smith e Olson, 1990).

O desenvolvimento da patologia na doença de Chagas é consequência de uma longa e complexa relação entre persistência do parasito e mecanismos homeostáticos mal adaptados do hospedeiro, levando a alterações patológicas (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003). Desta forma, os estudos propostos neste trabalho buscam um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na homeostasia do hospedeiro através da caracterização do perfil de macrófagos e células B como APCs e a avaliação da produção de citocinas e PGE<sub>2</sub> por células mononucleares do sangue periférico.

## **2.0 - OBJETIVOS**

## 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de monócitos/macrófagos como células apresentadoras de antígeno e como células reguladoras da resposta imune em pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta de proliferação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de células não aderentes (NA) após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar o efeito da adição de indometacina sobre a resposta de proliferação das PBMC e de células NA após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar os níveis de PGE2 nos sobrenadantes de cultura de PBMC e de células NA após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar a produção das citocinas, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , nos sobrenadantes de culturas de PBMC e de células NA após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;
- Avaliar a expressão de moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície de monócitos e de linfócitos B nas populações de PBMC e de células NA após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*;

### **3.0 – POPULAÇÃO ESTUDADA**

### 3. POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo, avaliamos o papel de monócitos/macrófagos como células apresentadoras de antígeno e como células reguladoras da resposta imune em pacientes portadores das formas clínicas indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas, e em indivíduos não infectados pelo *T. cruzi*, saudáveis, que apresentavam testes sorológicos negativos (imunofluorescência indireta, ELISA, hemaglutinação ou Fixação do complemento) bem como ausência de qualquer alteração cardíaca. Os pacientes avaliados neste trabalho apresentavam idade variando entre 24-66 anos(CONFERIR). Esses pacientes eram provenientes do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e foram acompanhados clinicamente pelo Professor Manoel Otávio da Costa Rocha. Os pacientes chagásicos foram classificados considerando-se os aspectos clínicos, radiológicos e eletrocardiográficos, segundo critério sugerido por Rocha et al., 2003. Para definir a forma clínica indeterminada foram realizados, ainda, esofagograma e enema opaco.

O critério de exclusão de pacientes neste estudo incluiu presença de hipertensão arterial, diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, disfunção tireoidiana, insuficiência renal, doenças de obstrução respiratória crônica, distúrbios hidroeletrólíticos, história de obstrução coronariana e doença reumática, alcoolismo, gravidez, anemia e qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados dos métodos propostos.

Os detalhes da população estudada estão resumidos na TAB.1. Os pacientes com doença de Chagas foram classificados da seguinte forma:

Pacientes com doença de Chagas pertencentes à forma clínica Indeterminada (IND n=11):

Pacientes com doença de Chagas assintomáticos, sem miocardiopatia aparente, sem história ou exame físico sugestivo de comprometimento crônico, com apenas evidências sorológicas da infecção, e os exames de ECG (eletrocardiograma), Raios-X de Tórax, Raios-X de Esôfago e Enema opaco normais.

Pacientes com doença de Chagas pertencentes à forma clínica Cardíaca (CARD n=11)

Pacientes cardíacos que apresentavam alterações de ECG graves, com cardiomegalia e/ou sinais de insuficiência cardíaca congestiva.

Todos os indivíduos incluídos nesse estudo foram doadores voluntários. Para isto foi indispensável o consentimento escrito dos mesmos. O protocolo adotado nesse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

**TABELA 1**

GRUPO CLÍNICO	SIGLA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS			MEDIANA DA IDADE/Variação
		Homens	Mulheres	Total	
Não infectados	NI	6	5	11	38 (26-59)
Forma clínica Indeterminada	IND	9	8	17	43 (30-59)
Forma clínica Cardíaca	CARD	11	4	15	42 (24-66)

## **4.0 – MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Obtenção do antígeno solúvel do parasito da forma epimastigota (EPI) do *T.cruzi*

A forma epimastigota do parasito foi cultivada e mantida em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitos da forma epimastigota (EPI), pertencentes à cepa CL, foram lavados três vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação, e a massa úmida gelada e degelada três vezes. A ruptura total dos parasitos se deu por homogeneização em tubos *Potter Elvejen* a 20000 rpm por 60 segundos. Esse procedimento foi repetido cinco vezes com intervalos de 30 segundos em banho de gelo. Subsequentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50000 rpm durante 60 minutos a 4°C com PBS. O sobrenadante foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, filtrado em filtro *Millipore* 0.45µm e mantido em pequenas alíquotas (1mL) a -70°C até o uso.

### 4.2 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

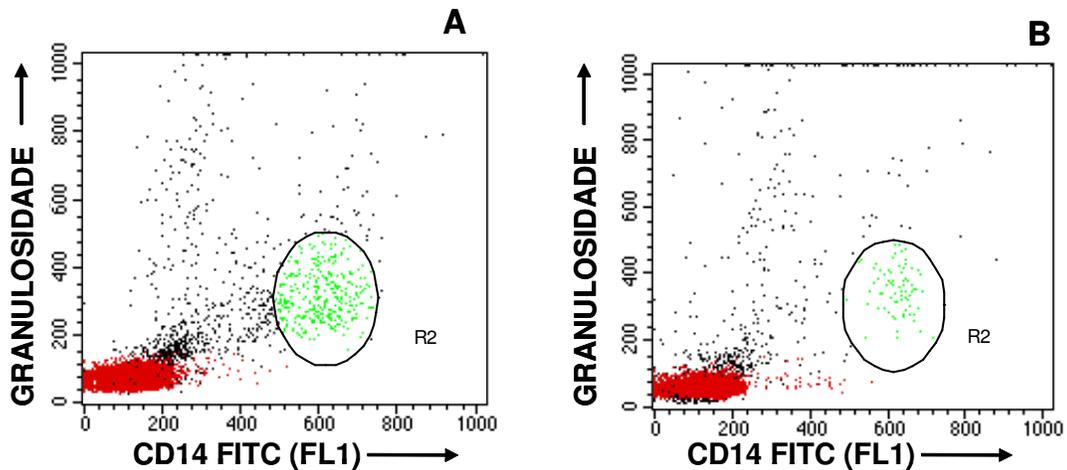
O sangue dos pacientes que participaram deste estudo foi coletado em tubo *Vacutainer* estéril contendo heparina. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma mistura de *Ficoll-Hypaque* (LMS, Litton Biogenetics, Savannah, Georgia, USA), na proporção de 2:1 em tubos de 50 mL e centrifugados a 400g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-6B(Beckman Instruments Inc., Irvine, USA). Ao final da centrifugação obteve-se um anel de PBMC entre a mistura de *Ficoll-Hypaque* e o plasma. O plasma foi retirado, cuidadosamente, e posteriormente utilizado para os testes de sorologia convencional

para a doença de Chagas. As células foram coletadas e transferidas para tubos cônicos de 50 mL onde foram lavadas 3 vezes por centrifugação 400g por 10 minutos a 4°C em meio de cultura MEM (*Minimal Essential Medium*). Finalmente, as células foram ressuspensas em RPMI, contadas em câmara de *Neubauer*, e ajustadas para a concentração desejada de acordo com o ensaio a ser realizado. Toda a manipulação, com exceção da contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar (BBL-*Biological Cabinet, model 60474, Cockeysville, MD* ou Veco, modelo VLFS 12 M, Campinas, São Paulo) com soluções e vidrarias também estéreis previamente siliconizados para evitar aderência de células à parede dos vidros.

#### **4.3 – Remoção de células aderentes**

Partes das células mononucleares obtidas no ensaio acima foram utilizadas para o ensaio de remoção de macrófagos. Cerca de 1 mL da suspensão de células ( $1 \times 10^7$ ) foi distribuída em 3-4 placas de petri contendo 1mL de meio CMBLAST (1,6% de L-glutamina, 3% de um coquetel de antibiótico e antimicótico [penicilina, estreptomicina e anfotericina] e 5% de soro humano normal AB Rh + diluídos em meio RPMI 1640) e incubadas por 50 minutos em estufas com ar úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este tempo, as células foram ressuspensas por movimentos delicados de rotação das placas e transferidos para tubo falcon de 15mL. As placas então eram lavadas três vezes com RPMI a 25°C, juntando os lavados ao sobrenadante no mesmo tubo falcon de 15mL e centrifugados a 400g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas com RPMI e

volume ajustado para concentração de células de  $1 \times 10^7$  células por mL. O percentual de remoção dos monócitos foi monitorado por citometria de fluxo. Os dados do citômetro de fluxo mostraram contaminação entre 15 a 20% de monócitos na população de células não aderentes (NA),(FIG.1)



**FIGURA 1:** Análise do percentual de monócitos obtidos antes e após remoção de células aderentes. A figura representa o perfil de localização de células de acordo com a emissão de fluorescências FL1 (CD14) em função da granulosidade, abordagem utilizada para delimitar a população de monócitos (R2) em PBMC (A) e em células NA, após remoção dos monócitos(B).

#### 4.4 - Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular (blastogênese) foi realizado segundo procedimento descrito por GAZZINELLI *et. al.*(1983). Em resumo, as PBMC foram mantidas em meio de cultura CMBLAST. O cultivo foi feito em placas de fundo chato com 96 poços, onde se acrescentaram a cada poço 150µL de CMBLAST, 25µL de suspensão de células em RPMI, na concentração de  $10^7$  células/mL, 25 µL de preparação antigênica EPI na concentração de 200µg/mL. Paralelamente foi realizado o ensaio de inibição de prostaglandina ( $PGE_2$ ) através da adição de 25 µL de Indometacina ( $10^{-5}M$  e  $10^{-6}M$ ) às culturas de PBMC sem estímulo e com estímulo antigênico. A Indometacina é um inibidor da via da cicloxigenase, enzima responsável pela degradação do ácido araquidônico, precursor de vários metabolitos ecosanóides como as prostaglandinas.

As culturas foram mantidas em incubadora contendo 5% de  $CO_2$  em atmosfera úmida (Forma Scientific, Marietta, OH, USA) a 37% durante 6 dias. No sexto dia de cultivo adicionaram-se a cada poço 25 µL de solução de timidina tritiada (3[H]-timidina) contendo 0,2 µCi, com atividade de 20 Ci/mmol (ICN, Radiochemicals, Irvine, CA, USA), e as placas de cultura foram, novamente, incubadas por mais 6 horas. Finalmente, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro (Whatman 934-AH, Whatman INC., Clifton, N.J., USA), com auxílio de um coletor automático de células (Cell Harvester Brandel, M-24S, USA). O papel de fibra de vidro contendo as células radioativas foi submetido à secagem em estufa e colocado em frascos de cintilação líquida, aos quais acrescentaram-se 3,5 mL de coquetel de cintilação, contendo em cada litro de tolueno: -333mL de Triton X 100

(Sigma), - 5g de PPO ( 2,5-difeniloxazole / Fisher Scientific Company, N. J., USA) – 0,1g de POPOP(1,4-bis 2-[5-feniloxazolil]-benzeno] / Fisher).

A radioatividade incorporada foi, inicialmente, determinada em cintilador Beckman LS6000SC. Cada amostra era contada durante 2 minutos, com os canais de  $^3\text{H}$  e  $^{14}\text{C}$  abertos. Cada experimento era feito em triplicata, acompanhado da cultura controle, onde se adicionava RPMI em substituição à preparação antigênica. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm) e os dados analisados após a diminuição do cpm das células não estimuladas (experimental – controle)  $E-C = \Delta \text{cpm}$ .

#### **4.5 - Obtenção de sobrenadantes de cultura para detecção dos níveis de prostaglandina $E_2$ e de citocinas**

Utilizando-se a mesma metodologia para o ensaio de proliferação celular, as células ( $10^6$  células/poço) foram incubadas em placas de fundo chato de 24 poços, que continham 800  $\mu\text{L}$  CMBLAST e 100  $\mu\text{L}$  de preparação antigênica EPI. Em culturas controle acrescentaram-se 100 $\mu\text{l}$  de RPMI em substituição ao estímulo antigênico. As culturas foram mantidas em incubadoras contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , em atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 18 horas e estocados imediatamente a  $-70^\circ\text{C}$  para posterior utilização para dosagem de prostaglandina  $E_2$  através da técnica de ELISA e para dosagem das citocinas pelo sistema Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA).

#### **4.6 – Análise do fenótipo celular de leucócitos do sangue periférico**

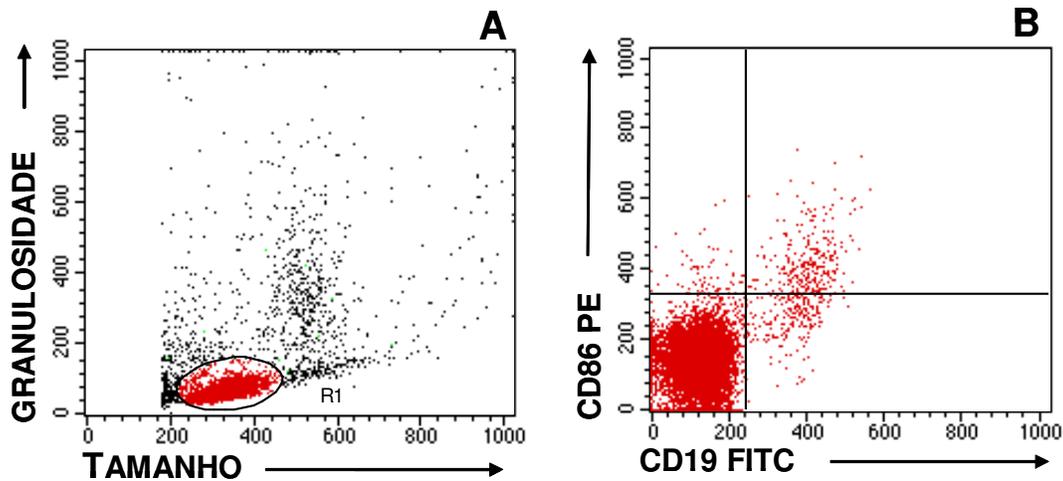
As reações de imunofluorescência para PBMC foram realizadas de acordo com protocolo sugerido pela Becton Dickinson (San Jose, CA,USA) e adaptado para placas de 96 poços. Os anticorpos monoclonais utilizados são marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE) e foram obtidos comercialmente da Becton Dickinson (Tabela 2). Às placas de 96 poços foram adicionados 25µL de solução de anticorpo monoclonal específico para o receptor celular de interesse, marcado com fluorocromo, diluído 1:5 em Tampão FACS (PBS contendo 1% BSA, pH 7.4). Para cada teste, utilizaram-se 250.000 células por poço (PBMC ou NA cultura controle e após estimulação antigênica), que foram incubadas por 20-30 min, ao abrigo da luz, a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com 200µL de PBS 0.015 M pH 7.4 por centrifugação (1300rpm, 7min, 4°C) e o sobrenadante desprezado. As amostras foram então fixadas com 200µL de solução fixadora (10g/l de Paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67g/l de Cloreto de sódio, pH7.2). Após um período de 30 min a 4°C, transferiu-se as amostras para tubos de 500µL e os parâmetros fenotípicos das células foram determinados por citometria de fluxo (FACScan Becton Dickinson).

##### **4.2.6.1 - Aquisição e análise dos dados em Citômetro de Fluxo**

O citômetro de fluxo utilizado neste trabalho é equipado com lâmpada de argônio que permite a avaliação básica de 4 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4).

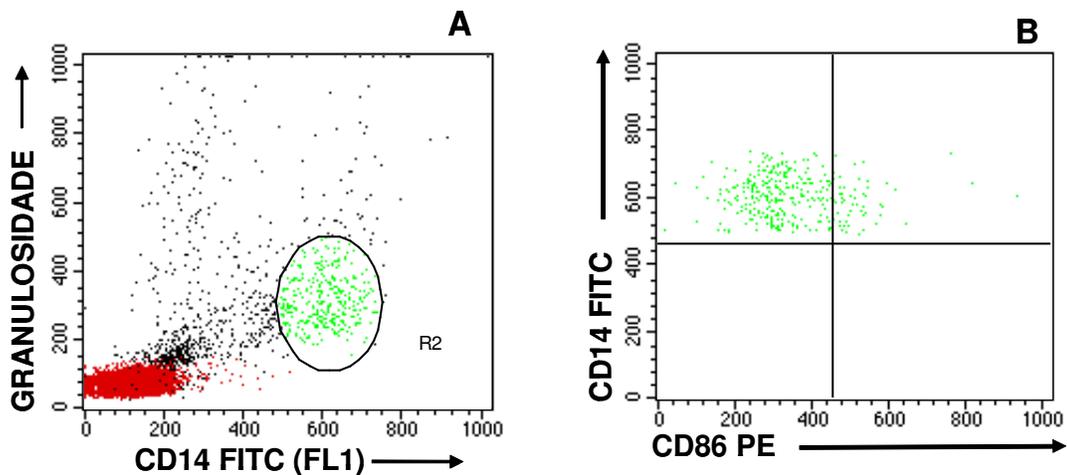
A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e sub-populações, foram feitas através de um sistema de computador e o “*software, Cell Quest*”, acoplado ao citômetro. O “Cell Quest” fornece um perfil de células de acordo com o tamanho e granulosidade. Foram coletados 10.000 eventos para a análise após estimulação *in vitro*.

A FIG. 2 representa, de forma esquemática, a determinação do fenótipo celular. A FIG. 2A mostra a seleção da população de linfócitos baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (Dispersão Frontal - FSC - Forward Scatter) *versus* granulosidade (Dispersão Lateral - SSC - Side Scatter). Após seleção da população de interesse, por meio de uma janela (“gate” R1), a frequência das subpopulações fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência 1 (FITC) *versus* fluorescência 2 (PE). A FIG. 2B ilustra a seleção da subpopulação de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. Os resultados obtidos foram avaliados pelo Canal Médio de Fluorescência (CMF).



**FIGURA 2:** Análise de linfócitos do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruzi*. (A) representa o perfil celular da população de linfócitos selecionada no “Gate” **R1**, em gráfico de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). (B) representa o perfil de análise da população de linfócitos B CD19<sup>+</sup>, expressando CD86 em gráfico de fluorescência 1 (CD19-FITC) *versus* fluorescência 2 (CD86-PE).

Para garantirmos uma seleção segura para a população de monócitos foi construído um gráfico de FL1 para o marcador CD14 em função da granulosidade (FIG.3A). A população analisada apresenta granulosidade intermediária e fortemente positiva para este fenótipo celular, sendo delimitada por um marcador (R2). Através desta abordagem pode-se obter uma população homogênea e bem definida das demais, não só facilitando a seleção da população de interesse, como também garantindo a sua identificação de forma segura e padronizada. Após a seleção da janela de interesse (R2) analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes nesta janela, utilizando-se de gráficos de FL1 *versus* FL2 (FIG.3B).



**FIGURA 3** : Análise de monócitos do sangue periférico após estimulação *in vitro* com antígenos do *T. cruz.* (A) representa o perfil celular da população de monócitos selecionada no “gate” R2,. (B) representa o perfil de análise da população de monócitos CD14<sup>+</sup>expressando CD86, em gráfico de fluorescência 1 (CD14-FITC) versus fluorescência 2 (CD86).

**TABELA 2**

**Relação dos anticorpos utilizados para análise do fenótipo dos leucócitos do sangue periférico**

Marcador*	Clone	Concentração	Atividade <sup>†</sup>
CD19-FITC	4G7	0,5µg	Expresso em linfócitos B; transdução de sinal.
CD14-FITC	M0P9	0,5µg	Identificação de células mielóides como monócitos e macrófagos; receptor para o complexo de LPS e LBP.
HLA-DR-PE	G466	0,5µg	Molécula do Complexo de MHC de classe II expressa na superfície de células humanas.
CD80-PE	L307.4	0,5µg	Co-estímulo para ativação e proliferação de células T.
CD86-PE	2331 FUN-1	0,5µg	Co-estímulo para ativação e proliferação de células T.

\*Anticorpos marca Becton Dickinson (BD), E.U.A.

<sup>†</sup> 8th HLDA International Workshop (2004)

#### 4.7 - Avaliação do padrão de citocinas nos sobrenadante de cultura de PBMC e células NA após estimulação *in vitro*

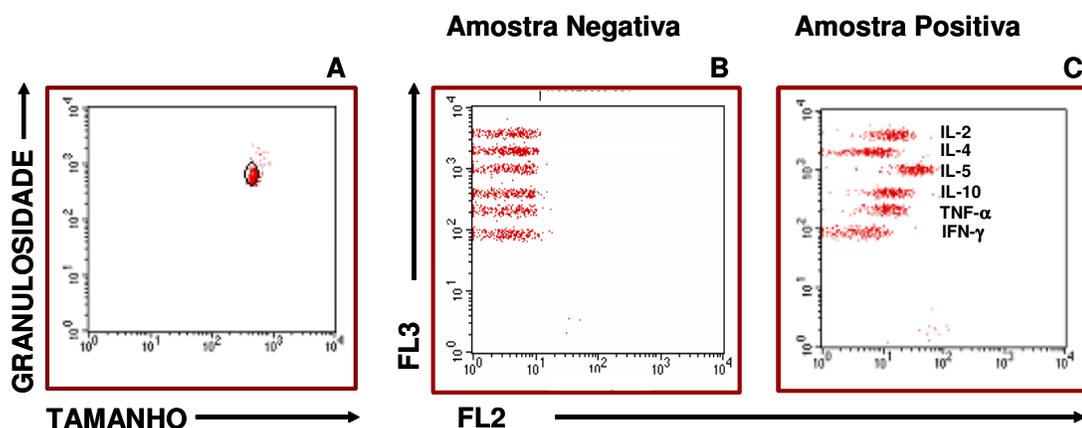
Os níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura estimuladas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), Becton Dickinson, seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante. Esta técnica emprega uma mistura de 6 esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal de FL3. A utilização de uma mistura de esferas permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra.

Desta forma, 50µl da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais anti IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 foram transferidas para tubos de 12x75mm destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 50µL do diluente G e das amostras de sobrenadantes a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos tubos. As misturas foram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 1mL da solução tampão (PBS) e centrifugadas a 200g, por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100µl em cada tubo. As esferas de captura foram então incubadas por 90 minutos, ao abrigo da luz, com um coquetel de anticorpos monoclonais humanos marcados com PE (Human Inflammation PE Detection Reagent). Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas com 1ml de tampão e centrifugadas a 200g por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100µl em cada tubo, onde foram adicionados 300µl de solução tampão para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo.

Para aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado utilizando o BD FACSCComp Software e o BD Calibrate Beads. O objetivo do ajuste do aparelho consiste em definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade. Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade da FL3 para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes

intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada).

A análise do perfil de citocinas do Tipo 1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e do Tipo 2 (IL-10 e IL-4) nos sobrenadantes de cultura foi realizada segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software, com auxílio do Microsoft Excel, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA Analysis Software faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granuloseidade (FIG.4A). Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 *versus* FL3.( FIG 4B e C). A ligação da citocina presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas marcadas com ficoeritrina (PE) pode ser evidenciado através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem amostra (FIG.4 B e C). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina analisada.



**FIGURA 4:** Análise quantitativa de citocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo BD CBA Analyses Software. Inicialmente, o programa promove a seleção automática da população de esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granuloseidade (A). Em seguida, separa as esferas e analisa da intensidade de fluorescência correspondente ao complexo esfera-citocina-anticorpo PE(B e C).

#### **4.8 - Quantificação dos níveis de Prostaglandina E2 nos sobrenadantes de cultura**

A quantificação de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) secretada por macrófagos, após estimulação por antígenos do *T. cruzi* foi realizada empregando-se o KIT de ELISA - Prostaglandin E<sub>2</sub> Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System – RPN22210(Amersham Biosciences). Em microplacas de ELISA de fundo chato (Amersham Biosciences) de 96 poços foram adicionados 50 µL de tampão de ensaio diluído (Amersham Biosciences), 50 µL das amostras de sobrenadante de cultura e 50µL de anticorpo de cabra anti-mouse (Amersham Biosciences). As placas foram incubadas por três horas em geladeira (2-8°C). Em seguida, 50µL de anticorpo anti-PGE<sub>2</sub> conjugado com peroxidase (Amersham Biosciences) foram adicionados e por as placas foram incubadas por 1 hora em geladeira (2-8°C). Após este tempo, os poços foram aspirados e lavados por 4 vezes com tampão de lavagem (Amersham Biosciences) Em seguida adicionaram-se 150µL de substrato Tetramethylbenzidine (TMB) por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de solução de ácido sulfúrico (1M) e a densidade óptica medida em leitor de ELISA automático utilizando-se um filtro de 450nm. A sensibilidade é de 1 – 32pg/poço, ou seja, 20 – 640pg/mL. Os dados obtidos na leitura foram então processados através do programa Soft Max para o cálculo da concentração de PGE<sub>2</sub> em pG/mL nos sobrenadantes testados.

#### 4.9. Análise estatística

A análise estatística dos dados de perfil celular, frequência de marcadores celulares e de produção de citocinas foi realizada através do software GraphPad PRISM 3.03 (E.U.A.).

Para comparação de dois grupos de amostras foi utilizado o Teste t de “Student”, para dados paramétricos, e o teste de Mann-Whitney, para dados não paramétricos.

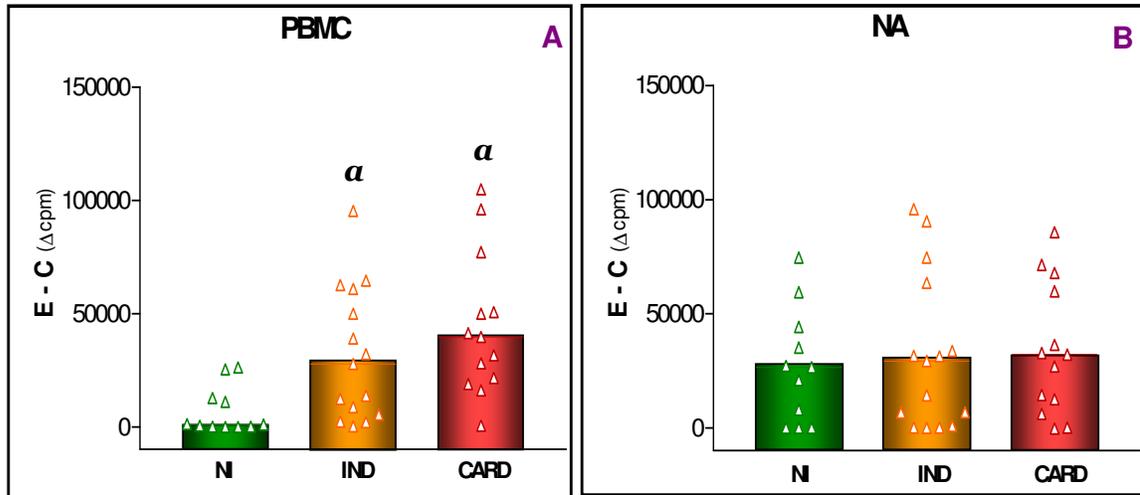
Na comparação entre três grupos, a avaliação para determinação de dados paramétricos ou não paramétricos foi realizada utilizando-se o programa estatístico Making Data Analysis Easier MINITAB 13.20 (E.U.A.). Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad PRISM 3.0 (E.U.A.). A análise de variância (ANOVA), seguida pela análise de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, foi feita para dados paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis, seguido pela análise de comparações múltiplas pelo teste de Dunns foi realizado para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (95% de confiança).

## **5.0 - RESULTADOS**

### 5.1 Ensaio de proliferação de PBMC e de células NA, estimuladas com antígeno de *T.cruzi*

Para avaliar a proliferação de PBMC e de células NA de indivíduos não infectados (NI) pelo *T. cruzi* e de pacientes com as formas IND e CARD da doença de Chagas, essas células foram cultivadas *in vitro* na presença e ausência de homogenato antigênico de formas epimastigotas do *T. cruzi* (EPI).

Observou-se que as PBMC dos pacientes dos grupos IND e CARD apresentaram resposta de proliferação celular significativamente maior ( $p < 0,05$ ), em comparação aos indivíduos do grupo NI. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada na resposta proliferativa entre as células dos pacientes dos grupos IND e CARD (FIG.5A). Já no ensaio de proliferação de células NA observou-se nível mais alto de incorporação de  $^3\text{[H]}$ -Timidina pelas células do grupo NI, fazendo com que não houvesse mais significância dos resultados entre os grupos (FIG.5B). Considerando-se que a molécula reguladora dessa proliferação celular inespecífica pudesse ser a PGE<sub>2</sub>, seguiu-se para o ensaio de inibição da produção deste mediador lipídico.



**FIGURA 5.** Proliferação celular de PBMC e células NA de indivíduos do grupo NI (■) e de pacientes do grupo IND (▲) e CARD (●). Os resultados estão representados por Δ cpm (contagem de células por minuto (cpm) da cultura de células com estímulo (E) menos cultura de células sem estímulo (C). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e mediana (barras). A letra *a* representa as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) relacionadas ao grupo de pacientes NI.

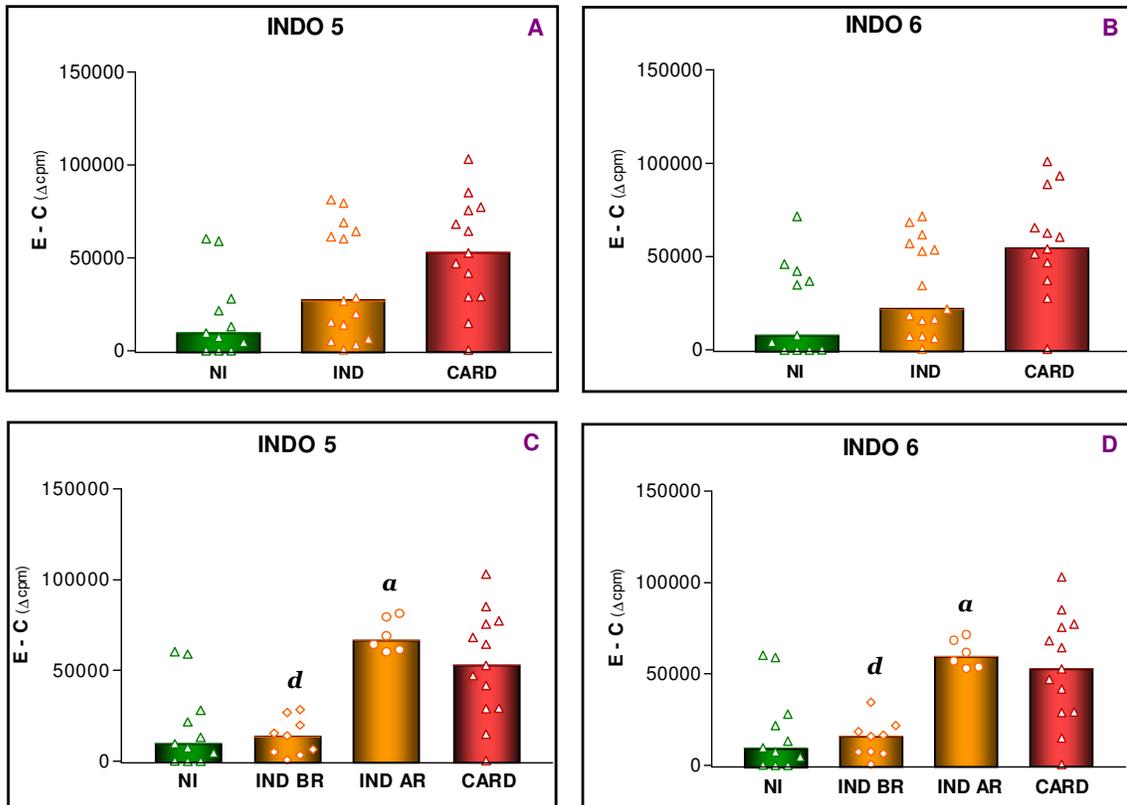
## **5.2 Ensaio de proliferação de PBMC, estimuladas com antígeno de *T.cruzi*, na presença de indometacina**

Procedeu-se então ao ensaio de proliferação de células de indivíduos dos grupos NI, IND e CARD, estimuladas com EPI, na presença e ausência de indometacina, nas concentrações  $10^{-5}$ M e  $10^{-6}$ M (INDO 5 e INDO6, respectivamente), como descrito na metodologia.

Verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre a proliferação celular dos indivíduos dos grupos NI, IND e CARD. Entretanto, no grupo IND, observou-se dois perfis de proliferação: células com baixa capacidade proliferativa ( $< 50000 \Delta$  cpm), oriundas de pacientes denominados baixos respondedores (BR), tanto na cultura com INDO5, quanto na concentração de INDO6, e células com maior capacidade de proliferação ( $> 50000 \Delta$  cpm), oriundas de pacientes, denominados altos respondedores (AR) - (FIG. 6A e 3B).

Os pacientes do grupo IND foram, então, separados em dois subgrupos para uma nova avaliação estatística (Fig 6C e 6D). Neste caso, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do subgrupo IND BR, quando comparado com o grupo CARD, e do subgrupo IND AR, quando comparado com o grupo NI. Os dados foram reprodutíveis nas culturas adicionadas de INDO5 e de INDO6. Mostrou-se, assim, que o bloqueio da produção de PGE2 pôde evidenciar capacidades distintas de proliferação celular de pacientes do grupo IND.

Considerando a resposta de proliferação como consequência da ativação celular, induzida pelo estímulo antigênico, passou-se à análise de moléculas HLA DR, responsáveis pela apresentação de antígeno.

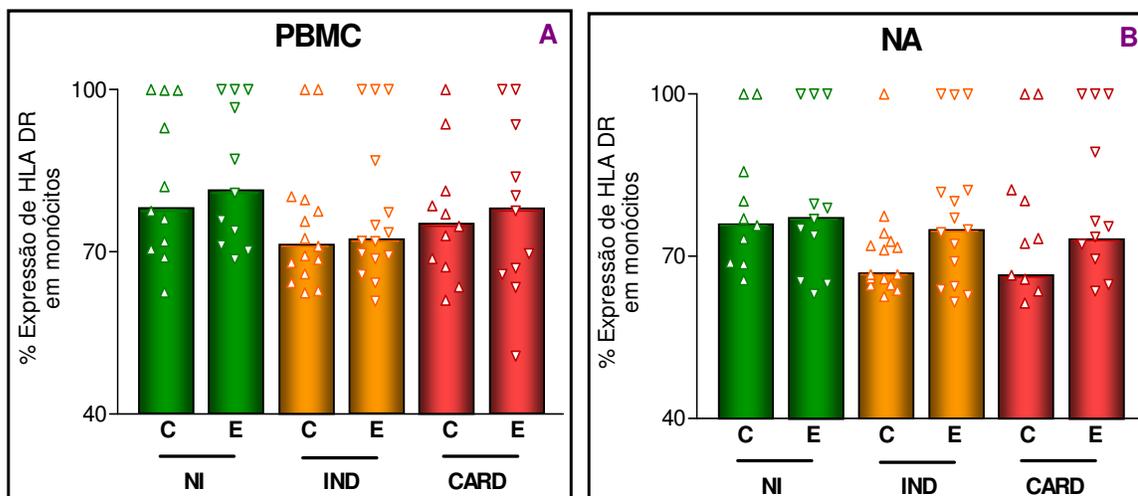


**FIGURA 6.** Proliferação celular de PBMC de indivíduos do grupo NI ( $\Delta$ ) e de pacientes do grupo IND ( $\Delta$ ), subgrupo IND BR ( $\diamond$ ) e IND AR ( $\circ$ ) e do grupo CARD ( $\Delta$ ), na presença de Indometacina. Em 2A e 2B antes de separar o grupo IND em dois perfis e em 2C e 2D após separação do grupo IND em dois perfis. Os resultados estão representados por  $\Delta$  cpm, contagem de células por minuto (cpm) da cultura de células com estímulo (E) menos cultura de células sem estímulo (C). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). As letras *a* e *d* representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) relacionadas ao grupo de pacientes NI e CARD respectivamente.

### **5.3 Avaliação da expressão de HLA-DR nas populações de monócitos em cultura de PBMC e células NA**

Para verificar a ativação de monócitos em PBMC de indivíduos do grupo NI e pacientes dos grupos IND e CARD, as células foram cultivadas na presença e ausência de EPI. Avaliou-se a expressão do marcador HLA-DR em células CD14+, através do canal médio de fluorescência (CMF).

Observou-se que independentemente de os monócitos estarem presentes na população de PBMC ou remanescentes na população de células NA, antigenicamente não estimuladas (C), ou estimuladas por EPI, não houve diferença significativa na expressão de HLA-DR na superfície das células CD14<sup>+</sup>. Esse achado sugere que o estímulo antigênico não foi capaz de aumentar a capacidade de apresentação de antígeno dos monócitos, para interação com LT, na resposta secundária dos pacientes com doença de Chagas dos grupos IND ou CARD, em relação às células dos indivíduos NI (FIG. 7) .

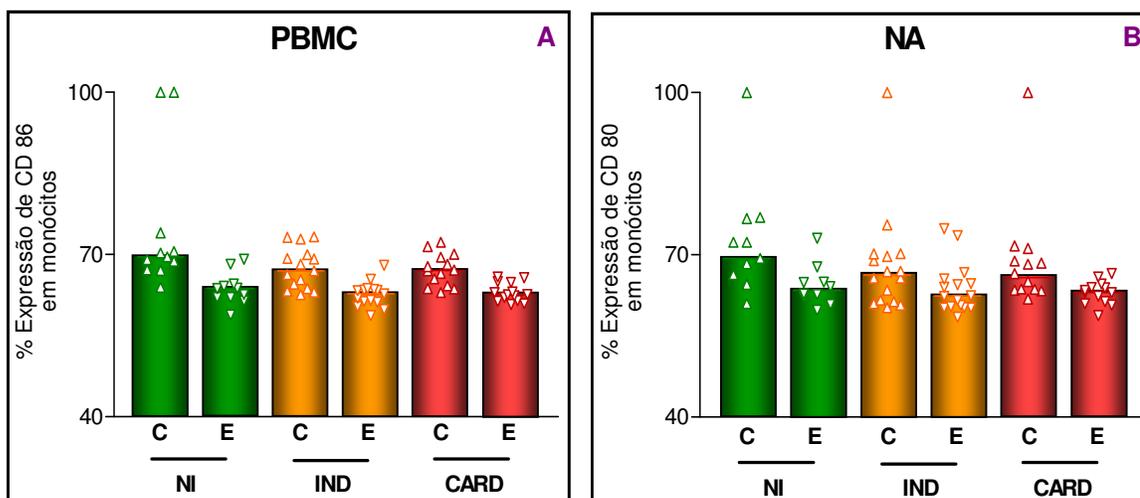
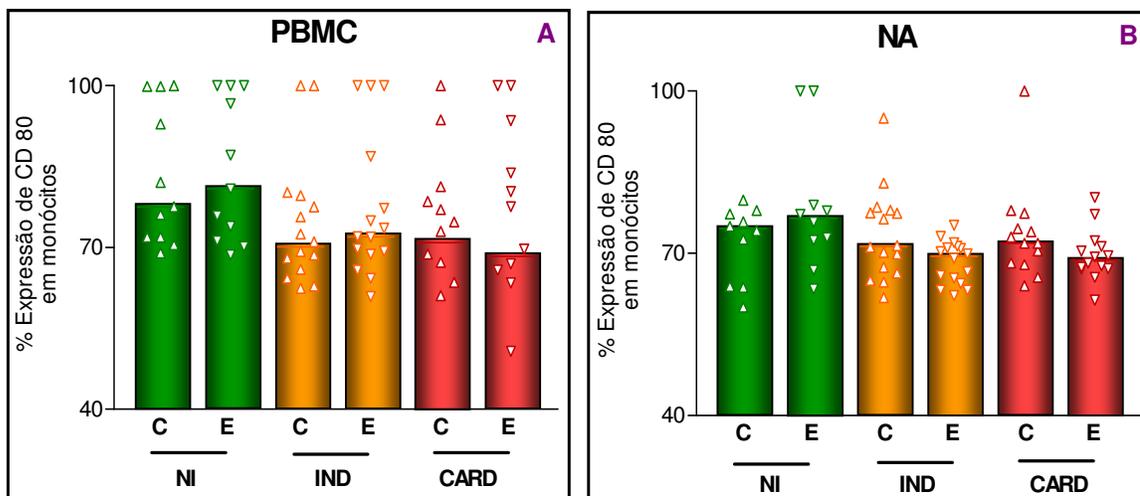


**FIGURA 7.** Expressão de HLA-DR, por CMF, na população de monócitos em culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras).

#### 5.4 Avaliação da expressão das moléculas CD80 e CD86 na população de monócitos em cultura de PBMC e NA

Para confirmar a ausência da ativação de monócitos para a função APC, avaliou-se a expressão do marcador CD80 em culturas de PBMC e NA controle (RPMI) e estimuladas com EPI de indivíduos do grupo NI e pacientes do grupo IND e CARD.

Realizou-se avaliação dos marcadores CD80 e CD86 através de canal médio de fluorescência (CMF). Verificou-se não existir diferença significativa na expressão das moléculas CD80 ou CD86 em monócitos das culturas de PBMC e NA estimuladas ou não com antígenos do *T. cruzi*, quando compararam-se os grupos IND e CARD com os indivíduos do grupo NI (Fig 8 e 9).



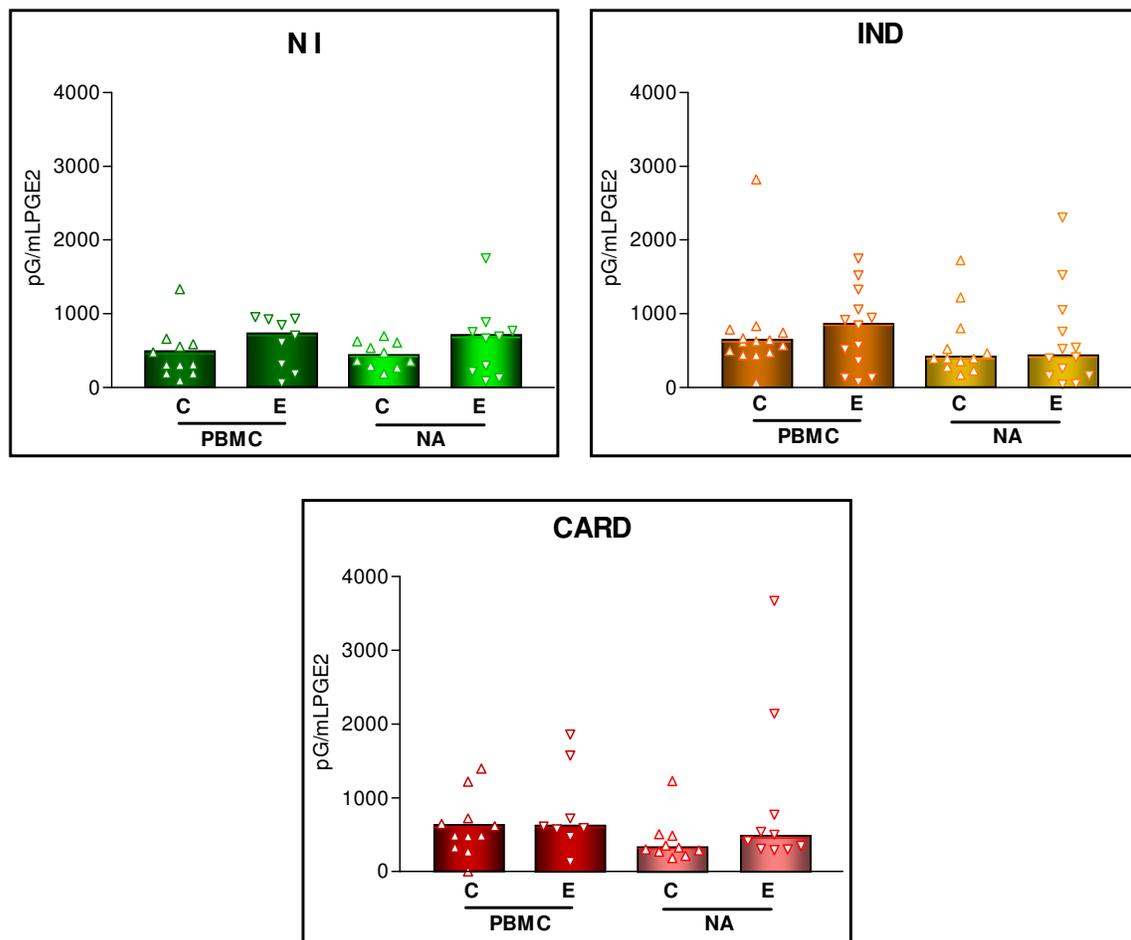
Para confirmar, então, que monócitos/macrófagos funcionam como células reguladoras da resposta proliferativa, e que a PGE2 está presente neste processo, tornou-se necessária a avaliação deste mediador nas culturas.

#### **5.5 - Dosagem de PGE2 em sobrenadantes de culturas de PBMC e de células NA**

Para verificar a quantidade de PGE2 produzida após estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*, utilizou-se a técnica de ELISA, como descrito na metodologia.

Os sobrenadantes de cultura de PBMC e de células NA dos indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD foram removidos após 18 horas da estimulação *in vitro* por antígenos do *T. cruzi*.

Embora se percebesse uma diminuição da produção de PGE2 na população de células NA, não houve diferença estatística entre os níveis de PGE2 nos sobrenadantes das culturas de PBMC ou de células NA, sem estímulo ou estimuladas por EPI nos grupos NI, IND e CARD (FIG. 10). Os dados sugerem que a produção de PGE2 está associada à presença de monócitos na cultura, reforçando o papel desta célula como imunorreguladora.



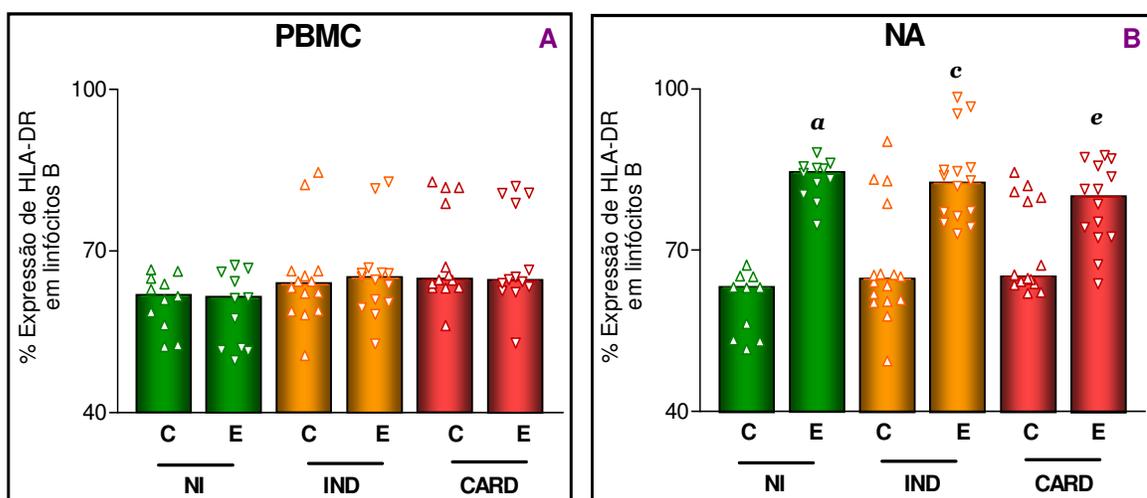
**FIGURA 10.** Dosagem de PGE2 (pg/mL) em sobrenadante de culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras).

### 5.6 - Avaliação da expressão de HLA-DR na população de linfócitos B CD19<sup>+</sup> em cultura de PBMC e células NA

Para verificar a capacidade dos linfócitos B atuarem como APC nas populações de PBMC e de células NA de pacientes dos grupos IND e CARD, comparadas às do grupo NI, as células foram cultivadas *in vitro* na presença e ausência de EPI, avaliando-se a expressão da molécula HLA-DR na superfície dos linfócitos B CD19<sup>+</sup>, através do canal médio de fluorescência (CMF).

Observou-se que nas culturas de PBMC, estimuladas por EPI, não houve diferença significativa da expressão de HLA-DR nos linfócitos B CD19+, quando comparada às culturas sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD (FIG. 11A e B).

No entanto, a expressão de HLA-DR em linfócitos CD19+ nas culturas de células NA, estimuladas por EPI, aumentou significativamente quando comparada às culturas sem estímulo, tanto no grupo NI como nos grupos IND e CARD. (FIG. 11A e B), indicando o aumento da capacidade dos linfócitos B atuarem como APC na ausência de monócitos/macrófagos.

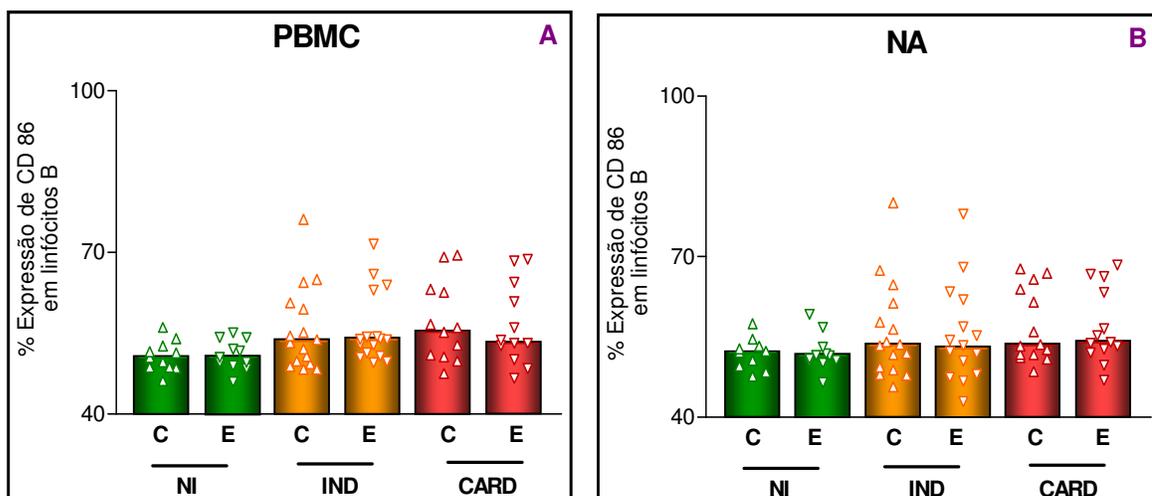
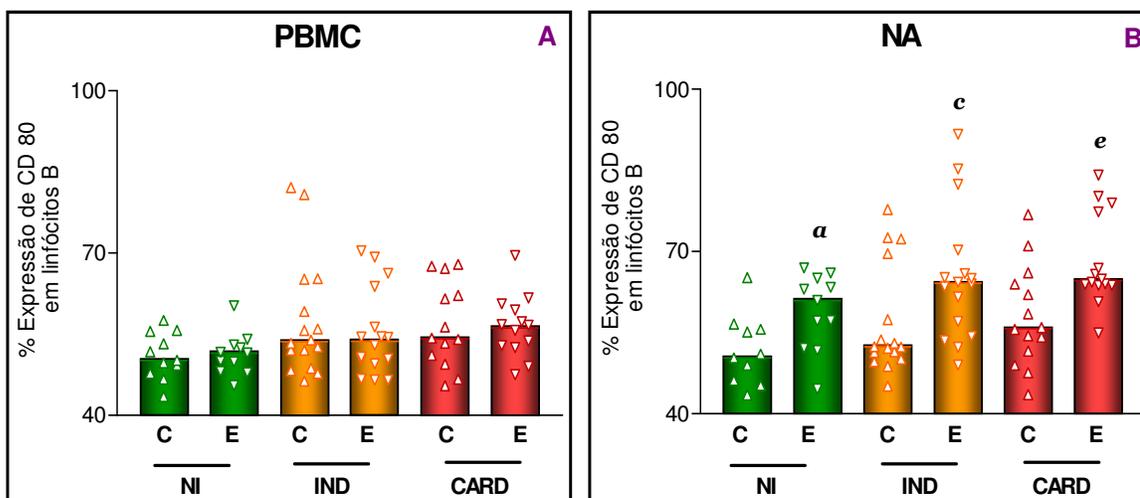


**FIGURA 11.** Expressão de HLA-DR, por CMF, na população de linfócitos B em culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados estão expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). As letras a, c e e representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) da cultura com estímulo em relação a cultura sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD respectivamente.

### **5.7 Avaliação da expressão de moléculas CD80 e CD86 na população de linfócitos CD19+, em culturas de PBMC e de células NA**

Considerando, então, que houve ativação do linfócito B através da verificação do aumento da expressão de HLA-DR na população de células NA, decidiu-se avaliar a expressão das moléculas de co-estimulação CD80 e CD86 em células CD19+, tanto na população de PBMC como na de células NA de indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD, cultivadas *in vitro* na presença e na ausência de EPI. Realizou-se avaliação dos marcadores CD80 e CD86 através de canal médio de fluorescência (CMF).

Não houve diferença significativa na expressão de CD80 nos linfócitos B CD19+ na cultura de PBMC estimulada com EPI, quando comparada aos linfócitos B CD19+ na cultura de PBMC sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD (FIG. 12A). No entanto, observou-se aumento significativo na expressão de CD80 nos linfócitos B CD19+ na cultura de células NA após estímulo *in vitro* por EPI, quando comparada à cultura sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD (FIG. 12B). A análise da expressão da molécula CD86 nos linfócitos B CD19+ mostrou não haver qualquer alteração tanto na população de PBMC (FIG.13A) como na de células NA (FIG.13B).

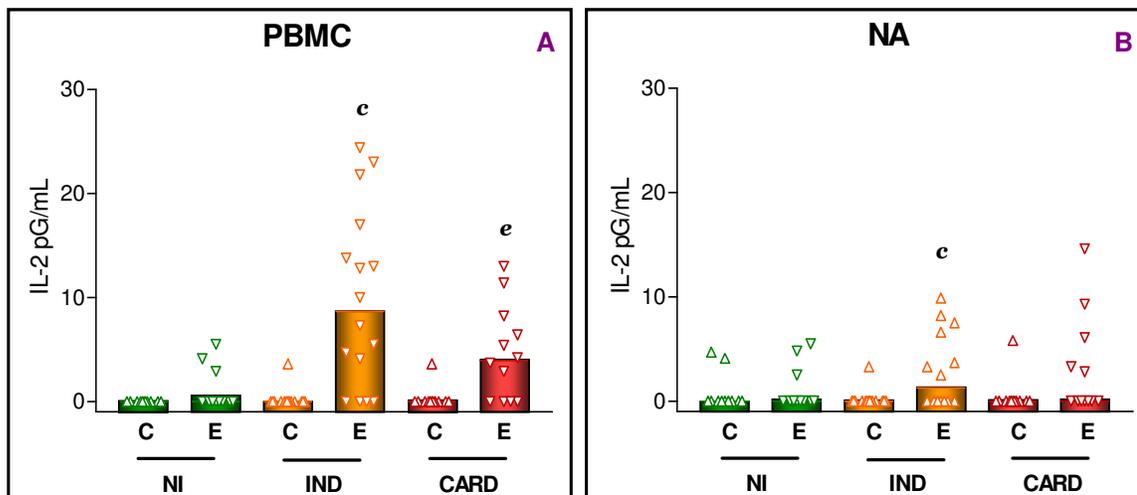


Considerando o importante papel que as citocinas exercem no sistema imune, atuando como moléculas reguladoras do desenvolvimento e do comportamento das células efetoras da resposta imune, o passo seguinte foi quantificar e avaliar estas citocinas nas populações de PBMC e de células NA após 18 horas de estimulação *in vitro* por EPI de indivíduos/pacientes dos grupos NI, IND e CARD.

## 5.8 Avaliação do padrão de citocinas produzidas nos sobrenadantes das culturas de PBMC e de células NA

### IL-2

Observou-se aumento significativo de IL-2 na cultura de PBMC com estímulo antigênico, em relação à cultura sem estímulo nos grupos IND e CARD (FIG. 14A). Já no sobrenadante de células NA, houve aumento de IL-2 somente nas células estimuladas do grupo IND (FIG.14B).



**FIGURA 14.** Dosagem de IL-2 (pg/mL) em sobrenadante de culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). As letras *c* e *e* representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) da cultura de PBMC ou NA com estímulo em relação à cultura de PBMC ou NA sem estímulo dos grupos IND e CARD respectivamente.

**IL- 4**

Verificou-se aumento na produção de IL-4 nas culturas de PBMC e de células NA estimuladas com EPI, quando comparada à de culturas sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD (FIG 15 A e B).

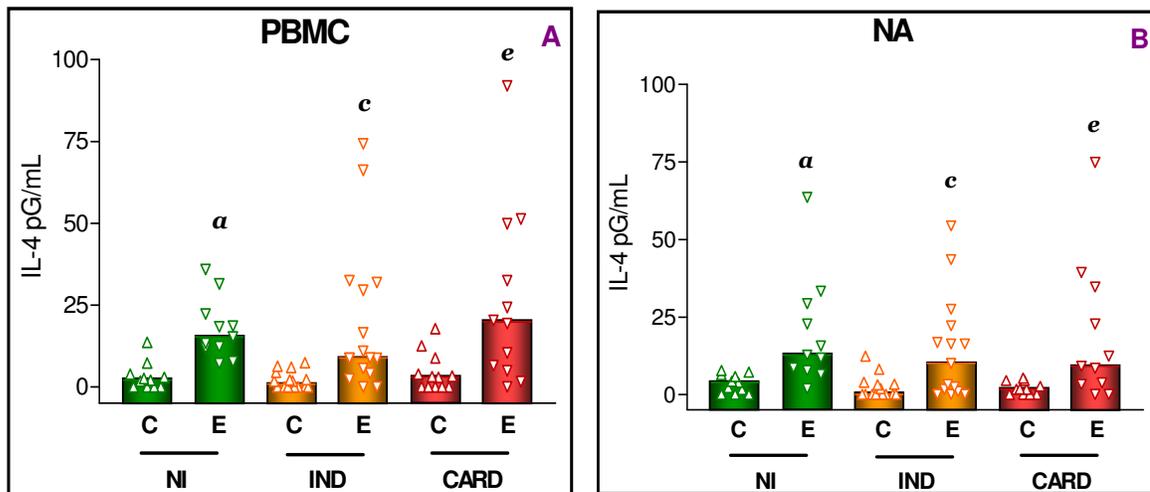
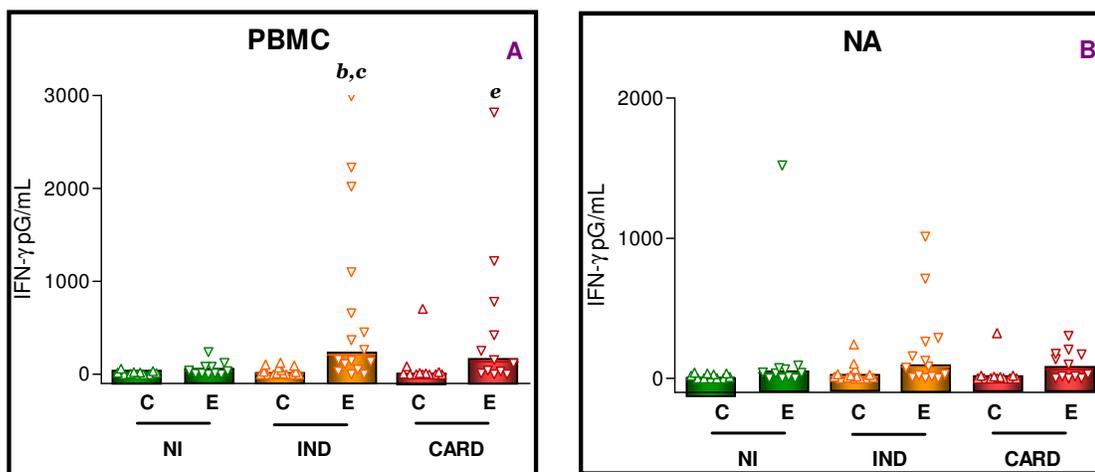


FIGURA 15. Dosagem de IL-4(pg/mL) em sobrenadante de culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo (△) e cultura com estímulo (▽), IND cultura sem estímulo (△) e cultura com estímulo (▽) e CARD cultura sem estímulo (△) e cultura com estímulo (▽). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). As letras a, c e e representam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) da cultura de PBMC ou NA com estímulo em relação à cultura de PBMC ou NA sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD respectivamente.

**IFN- $\gamma$** 

Observou-se aumento significativo de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de culturas de PBMC estimuladas, dos grupos IND e CARD, em relação aos indivíduos do grupo NI. Houve também aumento na produção dessa citocina nas culturas de PBMC estimuladas, em relação às não estimuladas (FIG.16 A).

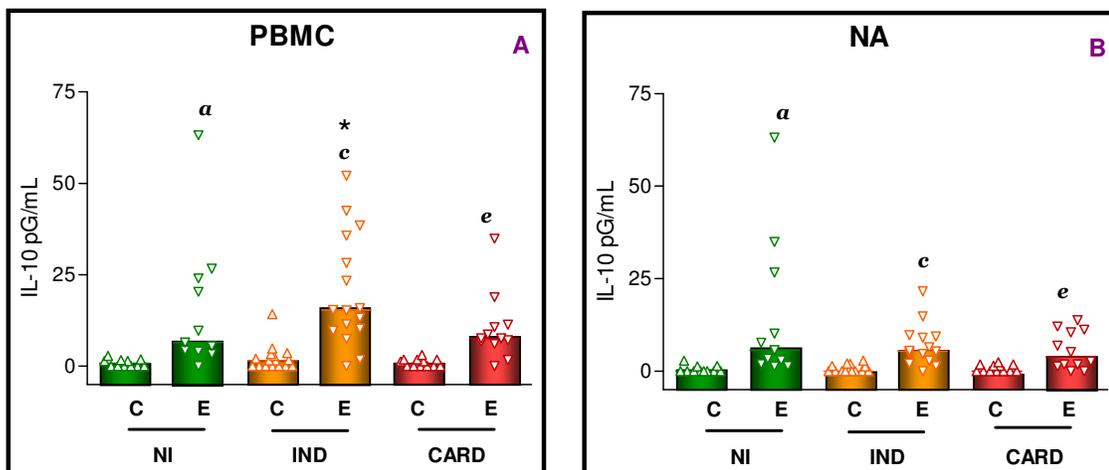
No entanto, nas culturas de células NA, não se observou qualquer diferença estatisticamente significativa (FIG.16 B).



**FIGURA 16.** Dosagem de IFN- $\gamma$  (pg/mL) em sobrenadante de culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). A letra *b* representam a diferença estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) da cultura com estímulo do grupo IND em relação a cultura com estímulo do grupo NI e as letras *c* e *e* representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) da cultura com estímulo em relação a cultura sem estímulo dos grupos IND e CARD respectivamente.

## IL-10

Observou-se aumento significativo de IL-10 nas culturas de PBMC e de células NA com estímulo, em relação às culturas sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD. Observou-se também que, nas culturas estimuladas de pacientes do grupo IND, a quantidade de IL-10 no sobrenadante de PBMC foi estatisticamente maior, comparada à cultura de células NA (FIG. 17A e 17B).



**FIGURA 17.** Dosagem de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante de culturas controle (C) e estimuladas (E) de PBMC e células NA dos grupos: NI cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ), IND cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ) e CARD cultura sem estímulo ( $\Delta$ ) e cultura com estímulo ( $\nabla$ ). Os resultados são expressos como dispersão dos valores individuais (sinais) e medianas (barras). As letras a, c e e representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) da cultura de PBMC ou NA com estímulo em relação à cultura de PBMC ou NA sem estímulo dos grupos NI, IND e CARD respectivamente. O asterisco (\*) representa a diferença estatisticamente significativa da cultura de PBMC com estímulo em relação à cultura de NA com estímulo do grupo IND.

### **5.9 - Resumo dos Resultados**

- A proliferação de PBMC, estimuladas por EPI, foi significativamente maior nos grupos IND e CARD em comparação ao grupo NI.
- A indometacina adicionada às culturas de PBMC facilitou a distinção de dois subgrupos no grupo IND: o primeiro, denominado IND AR, com resposta proliferativa significativamente maior do que o segundo subgrupo, IND BR.
- O nível de proliferação celular do subgrupo IND AR foi semelhante ao do CARD, enquanto que a do subgrupo BR foi semelhante ao do subgrupo NI
- Células CD14<sup>+</sup> de culturas de PBMC e de células NA, na presença ou na ausência de EPI, não mostraram alteração da intensidade média de fluorescência para as moléculas HLADR, CD80 e CD86.
- Linfócitos CD19<sup>+</sup> de culturas de células NA, estimuladas por EPI, nos grupos NI, IND e CARD mostraram maior intensidade de expressão das moléculas HLA-DR e CD80 em relação às culturas não estimuladas.
- Os níveis de citocinas mostraram-se aumentados nos sobrenadantes de culturas estimuladas com EPI

## **6.0 - DISCUSSÃO**

O estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos no curso da doença de Chagas é de fundamental importância para o entendimento das diferentes e complexas manifestações clínicas associadas à doença. A interação parasito-hospedeiro leva à ativação e regulação da resposta imune, na qual a reação do hospedeiro é dependente de vários fatores, dentre eles, a genética, o estado nutricional, o meio ambiente, etc. No que diz respeito ao parasito, a variabilidade molecular das cepas infectantes é crucial para o reconhecimento inicial dos padrões moleculares pelas células da imunidade inata do hospedeiro (Andrade, 1991; Andrade *et al.*, 2002).

Esses fatores, em conjunto, podem determinar o sentido do desenvolvimento das formas clínicas na fase crônica. Acredita-se que o sistema imunológico exerça papel importante na evolução das lesões teciduais, induzidas pelo parasito, através da intensa resposta imune observada em modelo experimental, principalmente na fase aguda da doença (Andrade e Magalhães, 1996; Tarleton, 2001; Soares *et al.*, 2001, Campos e Gazzinelli, 2004). Desta forma, têm-se demonstrado, em estudos multidisciplinares, alterações funcionais de componentes do sistema imune do hospedeiro, relacionando-os à evolução da fase crônica (Brenner e Gazzinelli, 1997, Gomes, *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2005; Talvani *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 1997, Souza *et al.* 2004; 2007).

A indução de uma eficiente resposta imune é diretamente dependente da ativação apropriada de APCs, uma vez que o estímulo de células T requer uma interação entre seus receptores (TCR, CD3 e CD4/CD8) e o complexo MHC-peptídeo. Neste contexto, o estudo funcional de monócitos/macrófagos tem sido alvo de investigações tanto na resposta imune inicial, através de captação de antígenos, via receptores tipo Toll, bem como através da produção de citocinas e

prostaglandinas e da expressão de moléculas reguladoras, envolvidas nos processos imunopatológicos da doença de Chagas (Borges *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 2000, Takahashi, *et al.*, 2005; Kuroda e Yamashita, 2003; Alegre *et al.*, 2001, Souza *et al.* 2004, 2007; Campos e Gazzinelli, 2004).

No presente trabalho, monócitos/macrófagos estimulados *in vitro* com antígenos derivados do *T. cruzi* foram avaliados como células indutoras da resposta imune através de seus marcadores de apresentação de antígenos bem como células reguladoras de mecanismos imunológicos que envolvem também células e moléculas da imunidade adaptativa.

A reatividade *in vitro* aos antígenos do *T. cruzi* é dependente, por um lado, da apresentação de antígenos por monócitos/macrófagos ou por linfócitos B e, por outro lado, da proliferação de linfócitos. As análises da resposta celular a antígenos de epimastigota do *T. cruzi* mostraram que a proliferação de PBMC de pacientes com doença de Chagas foi significativamente maior do que a dos indivíduos NI (FIG. 5A). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as culturas de células de pacientes das formas clínicas IND ou CARD (FIG 5B), indicando que estes pacientes respondem rapidamente ao estímulo antigênico, via linfócitos de memória, responsáveis pela resposta secundária. Todavia, trabalhos anteriores que também utilizaram extratos brutos do parasito não estabeleceram correlação significativa entre o grau de resposta de proliferação celular induzida *in vitro* por antígenos do *T. cruzi* e a forma clínica da doença de Chagas (Mosca *et al.*, 1979; Gusmão *et al.*, 1984; De Titto *et al.*, 1985; Morato *et al.*, 1986; Dutra *et al.*, 1996; Pinge-Filho, 1999, Gomes *et al.*, 2003). Além desses estudos, outros investigadores avaliaram a resposta imune a antígenos isolados e/ou recombinantes do *T. cruzi*. Neste contexto, proteínas derivadas do *T. cruzi* como B13, proteína que apresenta

reatividade cruzada à miosina cardíaca (Abel et al., 1997), a trans-sialidase (Ribeirão et al., 2000) e a cruzipáina (Arnholdt et al., 1993) apesar de induzirem *in vitro* reatividade de células de pacientes com doença de Chagas, também não demonstraram diferenças significativas entre as formas clínicas.

Com o objetivo de avaliar a participação de monócitos/macrófagos como APC, a reatividade *in vitro* aos antígenos de EPI foi conduzida em paralelo com células NA, empobrecidas dessas células mononucleares (FIG.5B). A população de células NA estimuladas *in vitro* com EPI mostrou aumento significativo da proliferação celular nos indivíduos NI, quando comparado com o nível de proliferação de PBMC (FIG 5A). O aumento de proliferação da população NA em indivíduos NI sugere a existência de mecanismos reguladores da homeostasia fisiológica na população de PBMC, uma vez que esses indivíduos não têm células de memória para antígenos de *T.cruzi*. De maneira similar, Piuvezam *et al.* (1993) demonstraram resposta de proliferação significativa de células de indivíduos NI aos antígenos do parasito acompanhada por produção de IL-2. Entretanto, os mecanismos responsáveis por essa estimulação não são ainda bem esclarecidos, podendo ser devido à mitógenos presentes nas preparações antigênicas do *T. cruzi*. Outra possibilidade seria a existência de células capazes de fazer o reconhecimento parcial de antígenos solúveis de EPI, devido ao mimetismo antigênico, decorrente de similaridades entre moléculas autólogas e antígenos do parasito (Cunha-Neto *et. al.*, 1996; Abel *et. al.*, 1997; Tarleton *et. al.*,1997; Minoprio, 2001).

No entanto, a reatividade *in vitro* com EPI de células NA não mostrou qualquer diferença significativa nos pacientes dos grupos IND e CARD, como previamente mostrado por outros autores (Morato, 1994; Barros-Mazon et al., 2004), onde a remoção de células aderentes das culturas de PBMC induzia aumento na

proliferação celular (Morato, 1994; Barros-Mazon et al., 2004). Esses autores sugerem que efeitos supressores seriam exercidos pelos monócitos/macrófagos. Citocinas e mediadores produzidos por macrófagos como prostaglandinas, IL-10 e NO seriam moléculas candidatas a mediar supressão na ativação e proliferação de linfócitos (Walker *et. al.* 1983; Borges *et. al.*,1998;; Cheon *et al.*, 2006).

Prostaglandinas são mediadores lipídicos que regulam numerosos processos biológicos, incluindo a função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação de funções imunes (Phipps *et al.*, 1991; Goetzl *et al.*,1995). Trabalhos já demonstraram que a PGE<sub>2</sub> influencia ativação Th1/Th2, sendo produzida por APCs como macrófagos e células dendríticas (Mosmann *et. al.*, 1989; Constant e Bottomly, 1997). Recentemente, observou-se que a produção de PGE<sub>2</sub> em sobrenadantes de cultura, estimuladas por EPI, de pacientes dos grupos IND e CARD da doença de Chagas eram semelhantes às concentrações encontradas em sobrenadantes de cultura de indivíduos NI, (Pinheiro, 2007).

O efeito da produção de PGE<sub>2</sub> sobre a resposta imune *in vitro* de células de pacientes com doença de chagas e indivíduos NI foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de PBMC e de células NA. Os níveis de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes de cultura estimuladas ou não com antígenos de EPI dos pacientes com doença de chagas e indivíduos NI foram semelhantes (FIG. 10). Esses resultados sugerem que a PGE<sub>2</sub> possa ser produzida pelas células em cultura, mesmo na ausência de estímulo antigênico, talvez em resposta ao estresse das células submetidas à cultura *in vitro*. Da mesma forma, a adição de indometacina, inibidor de PGE<sub>2</sub>, em culturas de PBMC e de células NA não mostrou diferença significativa sobre a proliferação dessas células após a estimulação *in vitro* com EPI (FIG.6). Resultado diferente foi observado por Morato (1994) que observou aumento do nível de proliferação de

células NA de pacientes com doença de Chagas, independentemente da forma clínica, sugerindo estreita correlação entre o nível da resposta proliferativa de células NA, com a inibição da produção de PGE<sub>2</sub> em PBMC, por indometacina. Esses achados sugerem que a PGE<sub>2</sub>, produzida possivelmente por macrófagos, estaria envolvida na regulação da proliferação celular. Esta controvérsia entre os dois trabalhos poderia ser atribuída a vários fatores, dentre eles, à avaliação mais criteriosa dos pacientes, por meio de exames propedêuticos mais acurados e seguindo classificação direcionada à avaliação dos graus de morbidade e evolução da cardiopatia chagásica (Rocha *et al.*, 2003), o que não era possível no passado. Além disso, homogenatos antigênicos do *T. cruzi*, utilizados nos experimentos anteriores, eram preparados de um clone do parasito, enquanto que o do presente trabalho foi originado da cepa CL. A origem distinta dos homogenatos antigênicos pode implicar em alterações qualitativas e/ou quantitativas nos constituintes moleculares do parasito e, em consequência, interferir na resposta imunológica dos pacientes (Andrade e Magalhães, 1996; Vago, 2000).

No entanto, ao se avaliar o perfil individual de resposta de proliferação celular, na presença indometacina, dos pacientes do grupo IND pode-se evidenciar dois subgrupos distintos (FIG. 6C e D). Os pacientes do grupo IND foram, então, diferenciados em: “altos respondedores” (AR) que correspondiam a 40% dos pacientes e que apresentavam resposta proliferativa de PBMC acima de 50000 CPM; e “baixos respondedores” (BR) que correspondiam a 60% dos pacientes e que apresentavam resposta proliferativa de PBMC abaixo de 50000 CPM. A análise dos dados mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o subgrupo IND BR e o grupo CARD; e entre o subgrupo IND AR e o grupo NI. Este critério de classificação permitiu-nos verificar que o grupo IND BR apresenta um perfil de

proliferação celular semelhante ao perfil do grupo NI, enquanto o grupo IND AR apresenta perfil de proliferação semelhante ao perfil do grupo CARD.

Diante desses resultados seria razoável especular que os pacientes do grupo IND, considerados como altos respondedores seriam candidatos a desenvolver mais rapidamente miocardiopatia chagásica após a infecção pelo *T. cruzi*. Por outro lado, poder-se-ia admitir que o grupo IND, baixo respondedor, não evoluiria para a doença cardíaca ou a desenvolveria lentamente. Algumas alterações que podem ser detectadas em pacientes apresentando a forma clínica IND incluem mudanças histopatológicas em biópsias cardíacas e distúrbios autonômicos cardíacos insignificantes e transitórios de condução (Decourt e Barreto, 1988). Estudo longitudinal realizado em Bambuí-MG mostrou que cerca de 2-5% dos pacientes com a forma clínica IND evoluíram para forma cardíaca, a cada ano de curso da doença (DIAS, 1989). O padrão mais comum de evolução é uma miocardiopatia chagásica incipiente. Infelizmente, ainda, não existe marcador imunológico capaz de indicar evolução da forma clínica IND para a forma clínica CARD (Dias 1989, Macedo, 1982), daí a importância dos dados aqui apresentados. Neste sentido, estudos clínicos longitudinais paralelamente à avaliação da resposta imune *in vitro* após estimulação específica poderá ser de grande valor para elucidar esta questão.

Neste contexto, macrófagos teriam papel importante na regulação da proliferação celular através da produção de PGE<sub>2</sub>. Recentemente, foi demonstrada associação entre a síntese PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos e a resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *T. cruzi* (Cardoni e Antunez, 2004). Os autores acreditam que PGE<sub>2</sub> ative macrófagos, aumentando a produção de NO que, por sua vez, inibe a replicação intracelular do parasito, impedindo a morte dos camundongos infectados. A PGE<sub>2</sub> produzida pelos macrófagos, atuando de maneira autócrina,

poderia também modular sua função de APC, regulando a expressão de moléculas de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86. Considerando que macrófagos presentes na população de PBMC e remanescentes na população de células NA seriam capazes de estimular linfócitos, através da interação MHC/peptídeo – complexo TCR investigou-se a capacidade de apresentação de antígeno de monócitos/macrófagos CD14<sup>+</sup> através a expressão de moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 (FIGs. 7, 8 e 9).

A avaliação da expressão da molécula HLA-DR em células CD14<sup>+</sup> na população de PBMC e de células NA estimuladas mostrou não existir diferenças significativas, quando comparou-se culturas controle dos indivíduos dos grupos NI, IND e CARD. No entanto, foi observado que células CD14<sup>+</sup> de pacientes do grupo IND expressam menor IMF de moléculas HLA-DR quando comparada às células dos indivíduos do grupo NI (FIG.7). Os dados sugerem que macrófagos de pacientes do grupo IND apresentam pouca habilidade para estimular linfócitos T, visto que moléculas MHC classe II são fundamentais para apresentação de antígenos aos linfócitos T. Esses achados podem indicar um mecanismo de controle da resposta imune nos pacientes, levando a uma menor lesão tecidual, o que caracterizaria a forma indeterminada. Além disso, foi também observado um subgrupo (BR) na população de indivíduos do grupo IND com resposta proliferativa menor em relação aos pacientes do grupo CARD, possivelmente em decorrência da baixa expressão de HLA-DR nos monócitos. Esses dados corroboram outros estudos que também demonstraram diminuição da expressão de HLA-DR em células CD14<sup>+</sup> de pacientes do grupo IND em relação ao grupo CARD da doença de Chagas (Souza *et al.*, 2004). Em animais de experimentação, a infecção pelo *T. cruzi* pode alterar a sinalização celular, levando à desativação de células acessórias que pode ser

definida como um processo pelo qual a célula torna-se parcialmente ou completamente sem resposta para estímulo de ativação, o que normalmente seria esperado para elevar suas atividades microbicida e tumoricida, produtora de citocinas, de seu poder oxidativo (Reiner, 1994).

Quanto à expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 na população de células CD14<sup>+</sup> verificou-se não haver diferenças significativas entre as culturas controles e estimuladas de PBMC e de células NA (FIGs. 8 e 9). Contudo, foi possível observar menor expressão de CD80 e CD86, embora sem significância estatística, nas culturas de PBMC de pacientes do grupo IND e CARD. Em conjunto, os achados parecem indicar que monócitos/macrófagos na doença de Chagas não têm, preferencialmente, função de células apresentadoras de antígenos, o que leva à hipótese de que esta função seja exercida por linfócito B.

Para compreender melhor o envolvimento dos linfócitos B como células apresentadoras de antígenos, avaliou-se a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 em células B CD19<sup>+</sup> nas culturas de PBMC e de células NA, após estimulação *in vitro* com EPI (FIGs.11, 12 e 13). Diferentemente do padrão de expressão de muitos outros tipos celulares, a das moléculas classe II do MHC em linfócitos B é constitutiva (Benjamini, Coico e Sunshine, 2000). É importante acrescentar que a expressão dessas moléculas pode ser aumentada em linfócitos B, por meio à exposição a determinadas citocinas como IL-4 (Benjamini, Coico e Sunshine, 2000). Nesse sentido, foi investigada a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em células CD19<sup>+</sup> de culturas de PBMC e de células NA, estimuladas *in vitro* com EPI, o que permitiu verificar uma maior expressão das moléculas HLA-DR e CD80 em LB CD19<sup>+</sup>, na cultura de células NA (FIG 11B e 12 B). Esses dados, em conjunto com os achados apresentados para macrófagos, sugerem que os linfócitos

B exercem efetivamente a função de APC, e que macrófagos, além de exercerem suas funções como APC, atuam também como células efectoras, reguladoras e produtoras de citocinas. Poderia, então, a função reguladora ser exercida sobre a atividade de APC de linfócitos B? É possível que sim, devido ao aumento verificado da expressão de moléculas HLADR e CD80 em células B CD19<sup>+</sup>. O fato de pequenas quantidades de antígenos serem melhor apresentadas por LB poderia levar monócitos/macrófagos a regularem a função de APC dos LB, impedindo o reconhecimento de antígenos com alta afinidade, o que desencadearia resposta auto-imune. Na doença de Chagas, observou-se uma predominância de LB CD5<sup>+</sup> na circulação, após estimulação *in vitro* com anticorpos anti- *T. cruzi* de pacientes com a forma clínica CARD, sugerindo o envolvimento dos linfócitos B CD5<sup>+</sup> com desencadeamento de doenças autoimunes autoimunidade (Dutra *et. al.*, 2000; Minoprio *et. al.*, 2001). Com a finalidade de esclarecer melhor o papel de monócitos/macrófagos como células reguladoras e de linfócitos B como APC, foram avaliados os níveis de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares. As citocinas estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo: ativação, proliferação, diferenciação, maturação e migração celular, além da secreção e mudança de isotipos. Elas se ligam aos receptores específicos das membranas das células-alvo, disparando sinais que alteram a expressão gênica na célula-alvo.

A avaliação da produção de IL-2 e IL-4 evidenciou aumento nas culturas estimuladas de PBMC, quando comparadas às culturas sem estímulo, nos grupos IND e CARD.

Com relação à produção IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas de PBMC dos grupos IND e CARD, evidenciou-se aumento significativo em relação ao grupo NI, bem como na cultura estimulada em relação à não estimulada (FIG.16A). Quanto à

produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura de células NA não foi observado diferenças significativas (FIG.16B). Esse dado pode indicar que a maior produção de IFN- $\gamma$  seja dependente de macrófago, uma vez que ao serem ativados produziram citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$  que induziriam a diferenciação para uma resposta Th1 com altos níveis de IFN- $\gamma$ . De fato, na doença de Chagas foi demonstrado que macrófagos podem atuar de maneira diferenciada de acordo com a forma clínica, podendo induzir respostas inflamatórias com alta produção de TNF- $\alpha$  e expressão de HLA-DR nos pacientes do grupo CARD, e também estarem associados a características moduladoras como alta expressão de moléculas supressoras como CTLA-4 e baixa expressão de HLA-DR, bem como a alta produção de IL-10 nos pacientes do grupo IND (Sathler-Avelar et al., 2003; Souza et al., 2004; 2007). Portanto, é provável que a diferença entre os indivíduos do grupo IND, sub-grupo AR e do grupo CARD com os do grupo IND, sub-grupo BR poderia estar associada à ação reguladora dos macrófagos, e conseqüentemente refletiria no controle e/ou desenvolvimento da miocardiopatia chagásica. Além disso, a avaliação da produção de IL-10 foi estatisticamente maior nos sobrenadantes de PBMC de pacientes do grupo IND, o que corrobora com aqueles encontrados por Gomes *et al.* (2002), que mostraram uma maior produção de IL-10 nos pacientes do grupo IND. Os achados reforçam a interpretação que a IL-10 teria papel importante em proteger o hospedeiro contra uma resposta do Tipo 1 desregulada impedindo assim um dano tecidual que poderia ocorrer mais tardiamente. Estudos na literatura mostram que PGE<sub>2</sub> poderia suprimir a produção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e intensificar a síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (De Witt, 1991; Kambayashi *et al.*, 1995; Cheon *et al.*, 2006). Portanto, os resultados obtidos de produção de IL-10 associados a ação de PGE<sub>2</sub> na proliferação celular e na

expressão de moléculas de MHC e moléculas co-estimulatórias pode sugerir que IL-10 juntamente com PGE<sub>2</sub> estariam envolvidas na regulação de uma resposta imune exagerada induzida pelo *T. cruzi*.

Em síntese, o presente estudo mostrou que modificações importantes no sistema imune, relacionadas à capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos e linfócitos B e seus produtos (citocinas e PGE<sub>2</sub>), ocorrem no curso da infecção chagásica crônica. A continuação dos estudos clínicos associados à investigação imunológica da reatividade celular dos pacientes, principalmente o envolvimento dos linfócitos B e macrófagos, será de grande importância para entendimento dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento das manifestações clínicas na fase crônica da doença de chagas. A compreensão da relação parasita-hospedeiro certamente permitirá avanços no delineamento racional de condutas de tratamentos quimioterápicos nos indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*.

## **7.0 - CONCLUSÃO**

## **CONCLUSÃO**

Após realização deste estudo podemos inferir que macrófagos, além de ser uma célula hospedeira para o parasito *T. cruzi*, célula efetora e apresentadora de antígenos, também têm papel importante na regulação da resposta imune no curso da infecção chagásica crônica. Macrófagos poderiam atuar como modulador da função de linfócitos B como célula apresentadora de antígeno.

## **8.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abel, L.C.; Kalil, J.; Cunha-Neto, E. (1997) Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:1305-1308.
- Acosta, A. M. e Santos-Buch, C.A. (1985) Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*, 71:1255-1985.
- Akira, S.; Takeda K.; Kaisho, Tsuneyasu, K. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2:675-680.
- Alegre, M.L.; Frauwirth, K.A.; (2001). Thompson, C.B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 220-228.
- Al-Sabbagh, A.; Garcia, C.A.; Diaz-Barfdales, B.M.; Zaccarias, C.; Sakurada, J.K.; Sato, L. M. (1998) Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. *Exp Parasitol*. 89:304-311.
- Andrade, L.O.; Machado, C.R.; Chiari, E.; Pena, S.D.; Macedo, A.M. (2002) *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol*. 100(4):269-275.
- Andrade, S.G.; e Magalhães, J.B. (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30:27-35.
- Andrade, Z.A. (1991) Pathogenesis of Chagas' disease, *Res. Immunol.* 142:126-129.
- Andrade, Z.A.; Andrade, S.G.; Corra, R.; Sadigursky, M.; Ferrans, V.J. (1994) Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy, *Am. J. Pathol.. Med. Hyg.* 144: 1403-1411.
- Anez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor, C.; Gonzalez, N.; Percoco, G.; Borges, R.; Guervara, P.; Ramirez, J.L. (1999)

Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 60:726-732.

Arnholdt, AC.; Piuvezam, M.R.; Russo, D.M.; Lima, AP.; Pedrosa, R.C.; Reed, S.G. & Scharfstein, J. (1993) Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. *J. Immunol.* 151: 3171-3179.

Avila H.A.; Periera, J.B.; Thiemann, O.; Paiva, E.; Degrave, W.; morel, C.; Simpson, L. (1993) Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of Kinetoplast minicircle DNA: Comparasion with serology and xenodiagnoses. *J. Clin. Microbiology* 31:2421-2426.

Barros-Mazon, S; Guariento, M. E.; Silva, C.A.; Coffman, R.L.. Abrahamsohn, I.A. (2004). Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clinical Immunology* 111:137– 145.

Batista, F.D.; Neuberger, M.S. (1998) Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity.* 8:751–759.

Becker J, Weber C, Storch S, Federlin K. (1990) Relationship between CD5<sup>+</sup> B lymphocytes and the activity of lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 56:219–22.

Benjamini, E. Coioco, R. e Sunshine, G. (2000). *Imunologia*, 4<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan

Bogitsh BJ, Middleton OL, Ribeiro-Rodrigues R. (1999) Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res. Jun:* 85(6):475-80.

Borda E.-S., P. Cossio, de la Vega M, Arana R., Sterin-Borda L., (1984) A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity, *Clin. Exp. Immunol.* 57: 670-686.

Borda E.-S., Sterin-Borda L, (1996) Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas cardiomyopathy, *Int. J. Cardiol.* 54:149-156.

Borges, M.M.; Kloetzel, K.J.; Junior, H.F.A.; Tadokoro, C.E.; Pinge-Filho, P.; Abrahamsohn, I. (1998) Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology Letters.* 63:1-8.

Brener, Z. (1987) Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82:205-213.

Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Neto, M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. *Guanabara Koogan.*

Bronfen, E. Rocha, F.S.A; Machado G.B.N.; Perillo M.M.; Romanha, A.J.; Chiari, E. (1989) Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 84:237-240.

Campos, A.M. e Gazzinelli, R.T.(2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators of Inflammation.* 13:139-143.

Campos, M.A.S.; Almeida, I.C.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Valente, E.P.; Gazzinelli, R.T.(2001) Activation of Toll-Like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan Parasite. *Journal of Immunology.* 167:416-423

Cardillo, F.; Voltarelli, J.; Reed, S.G.; Silva, J.S.(1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. *Infect. Immun.* 64:128-134.

- Cardoni, R.L. e Antúnez, M.I. (2004) Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators of Inflammation*, 13:235-240
- Castes, M.; Panagiotopoulos, A.; Mosca, W. (1986) Demonstration of an indomethacin-sensitive mechanism regulating immune reactivity in Chagas' disease patients. *Immunopharmacology*. 12:203-212.
- Cedillos, R. A; Torrealba, J. W; Tonn, R. J.; Mosca W.; Ortegon, A. (1982) Artificial xenodiagnosis in Chags disease. *Bol Oficina Sanit Panam*. 93:240-249.
- Cheon, H.; Gho, Y.H.; Chi, S. J.; Lee, Y.H.; Song, G.G.; Sohn, J. Won, N.G.; Ji, D.J. (2006) Prostaglandin E<sub>2</sub> augments Il-10 signaling and function. *The Journal of Immunology*. 177: 1092-1100.
- Chiari, E. (1999) Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.; 94 Suppl 1:299-300.
- Cillari, E., Liew, F.Y., Lelchuk, R., (1986). Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 54: 386–394.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2005) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* - vol. 38: suplemento III, 01-29.
- Constant, S. L. e Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> t cell responses: the alternative approaches. *Annual Review of Immunology* 15:297-322.
- Cunha-Neto, E.; Coelho, V.; Guilherme, L.; Fiorelli, A.; Stolf, N.; Kalil, J. (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin. Invest.* 98:1709-1712.

Cunha-Neto, E.; Duranti, M.; Gruber, A.; Zingales, B.; De Messias, I.; Stolf, N.; Bellotti, G.; Patarroyo, M.E.; Pilleggi, F.; Kalil, J. (1995) Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin-specific epitope crossreactive to immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:3541-3545.

De Rezende J.M.; Moreira, H. (1988). Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arq Gastroenterol.* 25:32-42.

De Titto, E.H., Braum, M., Lazzari, J.O. and Segura, E.L. (1985). Cell mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. *Immunol. Cell* 9: 249.

De Witt, D. L. (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys Acta* 1083:121-134

De Witt, D.L.; 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase. Regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.*1083:121-134

Décourt, L. V e Barreto, A. C. P..(1988) Indeterminate forms of Chagas'diseases. *Ars cvrandi cardiol*;10,12:5-20

Degrave, W. Fernandes, O.; Thiemann, O.; Wincker, P.; Britto,C.; Cardoso, A.; Pereira, J.B.; Bozza, M.; Lopes, U.; Morel, C. (1994) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *leishmania* using the polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89:367-368.

Dias J. C. P. (1989) The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review . *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22:147-156.

Dias J. C. P. (2000) Epidemiologia. In: Brener, Z. Andrade, Z. A.; Barral-Neto, M. (Ed) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2<sup>nd</sup> edição, Guanabara koogan, Rio de Janeiro,. p. 48-74.

Dutra, W. O; Martins-Filho, O. A.; Cançado, J. R.; Pinto-Dias, J. C; Brener, Z; Gazzinelli, G; Carvalho, J. F; Colley, D. G (1996). Chagasic Patients Lack CD28 Expression on Many of Their Circulating T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 43:88-93.

Dutra, W.O.; Colley, D.G.; Pinto-Dias, J.C. Gazzinelli, G.; Brener, Z. Pereira, M. E. S. Coffman, R. L. Corrêa-Oliveira, R.; Carvalho-Parra, J. F. (2000). Self and Nonself Stimulatory Molecules Induce Preferential Expansion of CD5<sup>+</sup> B Cells or Activated T Cells of Chagasic Patients, Respectively. *Scand. J. Immunol.* 51:91–97.

Dutra, W.O.; Rocha, M.O.C.; Teixeira, M.M. (2005) The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*. 21:(12)581-587.

Fedyk, E. R. e Phipps, E. (1997) Prostaglandin receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate B-lymphocyte activation and differentiation to IgE-secreting cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 433:153-157.

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA Jr, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 262:909-911.

Freeman, G.J; Borriello, F.; Hodes, R.J.; Reiser, H.; Gribben, J.G; Ng, J.W; Kim J.; Goldberg, J.M; Hathcock, K.; Laszlo, G. (1993). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med*. 178:2185-2192.

Garg, N. e Tarleton, R.L. (2002) Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 70:5547-5555.

Goetzl, E.J , An, S.; e Smith, W.L. (1995). Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *The FASEB Journal*, 9:1051-1058.

Gomes J.A.S, Bahia-Oliveira L.M, Rocha M.O.C, Martins-Filho,O.A, Gazzinelle, G., Correa-Oliveira, R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 71:1185-1193.

Gomes, J.A.S. (2002) Doença de Chagas: Perfil imunológico das formas clínicas indeterminada e cardíaca. Tese. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

Guermonprez, P.; England, P.; Bedouelle, H.; Leclerc, C. (1998). The rate of dissociation between antibody and antigen determines the efficiency of antibody-mediated antigen presentation to T cells, *J. Immunol*. 161:4542-4548.

Gusmão, R. A.; Rassi, A.; Rezende, J.M.;Neva, F. A. (1984). Specific and non-specific lymphocyte blastogenic responses in individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 33:827-834.

Harizi H.; Juzan M.; Grosset C.; Rashedi M.; Gualde N. (2001). Dendritic Cells Issued in Vitro from Bone Marrow Produce PGE2 That Contributes to the Immunomodulation Induced by Antigen-Presenting Cells. *Cellular Immunology e* 209:19-28.

Higuchi, M.L.; Reis, M.M.; Aiello, V.D.; Benvenuti, L.A.; Gutierrez, P.S.; Bellotti, G.; Pileggi, F. (1997) Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi antigens* in chronic human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 56:485-589.

Higuchi, M.L.B.T.; Reis, M.M.; Barbosa, A.; Bellotti, G.; Pereira-Barreto, A.C.; Pileggi, F. (1993) . Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings, *Cardiovasc. Pathol*. 2:101-106.

Holscher, C.; Kohler, G.; Muller, U.; Mossmann, H.; Schaub, G.A.; Brombacher, F. (1998) Defective nitric óxido effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* – infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric óxido synthase. *Infect. Immun.* 66:1208-1215.

Hunter, C.A; Ellis-Neyes, L.A; Slifer, T.; Kanaly, S.; Grunig, G.; Fort, M.; Rennick, D. e Araujo, F.G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 7:3311-3316.

Jones, E.M.; Colley, D.G.; Tostes, S.; Lopes, E.R.; Vnencak-Jones, C.L. & McCurley, T.L. (1993) Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 48, 348-357.

Kaisho, T.; Akira, S. (2001). Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand.* 59:124-130

Kambyashi, T. C. O, Jacob. D. , Zhou, N., Mazurek, M. K., Fong, and G. Strassmann (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J. Innunol.* 155:4909-4916.

Kierszenbaum, F. (1986) Autoimmunity in Chagas' disease. *J Parasitol.* 72:201-211.

Koberle, G (1958) Cardiopatia chagásica - *O Hospital* 53: 311

Kunkel, S.L., Spengler, M., May, M.A., (1988). Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 263: 5380–5384.

Kunkel,S.L; Chensue, S.W e Phan, S.H. (1986) Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *The Journal of Immunology*, 1:186-192.

Kuroda, E. e Yamashita, U. (2003) Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *The Journal of Immunology*. 757-764

L.M.G. Bahia-Oliveira, J.A. S. Gomes, J.R. Cançado, T.C. Ferrari, E. M. Lemos, Z. M. P. Luz, M. C. Moreira, G. Gazzinelli, e R. Correa-Oliveira.(2000) Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14–30 Years Ago. *The Journal of Infectious Diseases* . 182:634–638.

Levitus, G.; Hontebeyrie-Joskowicz, M.; Van Regenmortel, M.H.; Levin, M.J. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:413-417.

Liang, B.; Mamula, M.J. (2000). Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:561–568

Macedo, A.M. et al. (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 1-12.

Macedo, V. (1982) Chagas' Disease. In: *Cvecil Textbook of Medicine*, eds. *J. B. Wyngaarden and L. H. Smith*, p. 1728. *W. B. Saunders Company, Philadelphia*

Michailowsky, V.; Luthrs, K.; Rocha, M.O.; Fouts, D.; Gazzinelli, R.T.;Manning, J.E. (2003) Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect. Immun.* 71: 3165-3171.

Michelin, M.A.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q.C. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology* 111:71-79.

Minoprio, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *International Journal for Parasitology* . 31:588-591.

Minter-Goedbloed, E.; Minter, D.M.; Marshall J.F.C. (1978) Quantitative comparison between xenodiagnoses and haemoculture in detection of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans Roy. Soc. Med. Trop. Hyg.* 72:84-91.

Montran, C. C., Fretes, R.E., Cerban, F.M.; Rivarola, H.W.; Vottero de Cima, E. (2000) Immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice. *Clin. Immunol.* 97:89-94 .

Morato M.J. G., Brener Z., Cançado J. R., Nunes R.M.B., Chiari I. e Gazzinelli G. (1986) Cellular immune response of chagasic patients to antigens derived from different *Trypanosoma cruzi* strains and clones. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 505-511.

Morato, M. J. (1994) Imunorregulação da resposta celular a extratos antigênicos do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos das formas clínicas indeterminada e cardíaca. Tese. Departamento de Imunologia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Morichika, T.; Takahashi, H.K.; H.K.; Iwagaki, H.; Yoshino, T.; Tamura, R.; Yokoyama, M.; Mori, S.; Akagi, T.; Nishibori, M.; Tanaka, N.; (2003). Histamine inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in an intercellular adhesion molecule-1- and B7.1- dependent manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304:624-633.

Mosca, W., Paje, J., Gallardo, E. and Garcia Barrios, H. (1979). Immune response in human Chagas disease. I Lymphocyte blastogenesis in chagasic patients without evidence of cardiomyopathy. *Acta Cient. (Venezolana)* 30, 401.

Mosmann, T.R, e Coffman, R.L. (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol.* 46:111-147.

Muzio, M.; Polentarutti, N.; Bosisio, D.; Prahlandan, M.K.P.; Mantovani, A. (2000) Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology.* 67:416-423

Palomino, S.A.; Aiello, V.D.; Higuchi, M.L. (2000). Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94:571-579.

Pérez-Fuentes, R; Guégan, J.F; Barnabé, C; López-Colombo, A; Salgado-Rosas, H; Torres-Rasgado, E; Briones, B; Romero-Díaz, M; Ramos-Jiménez, J; Sánchez-Guillén Mdel, C. (2003). Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 33:293-299.

Phipps RP, Stein SH, Roper RL.(1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today.* 12:349-352.

Pinge-Filho, P.; Tadokoro, C.E.; Abrahamsohn, I.A. (1999) Prostaglandins mediate suppression of Lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection, *Cell. Immunol.* 193:90-98

Piuvezam, M.R.; Russo, D.M.; Burns, J.M. Jr.; Skeiky, Y.A; Grabstein K.H.; Reed, S.G. (1993) Characterization of responses of normal human T cells to *Trypanosoma cruzi* antigens. *J Immunol.* 150:916-924.

Prata, A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* 1:92-100.

Rappaport, R.S.; Dodge, G.R. (1982) Prostaglandin E Inhibits the production of human interleukin-2. *J. Exp. Med.* 155:943-948.

Rassi, A e Luquetti, A. O (1992) Therapy of Chagas Disease. In: Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine, eds. S. Wemdel, Z. Brener, M. E. Camargo and A. Rasse, P. 237, ISBT – SBHH, São Paulo.

Reed, S. G. (1988) Administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 140:4342-4347.

Reiner, NE. (1994). Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today.* 15:374-381.

Ribeirão, M.; Pereira-Chioccola, V.L.; Renia, L.; Augusto Fragata Filho, A.; Schenkman, S.; Rodrigues, M.M. (2000) Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 22:49-53.

Rocha, M.O.C.; Ribeiro, A.L.P.; Teixeira, M.M. (2003) Clinical Management of Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Frontiers in Bioscience* 8:44-54.

Rodríguez-Pinto, D. (2006) B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*, 238:67-75

Saoudi, A.; Simmonds, S.; Huitinga, I.; Mason, D. (1995) Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells, *J. Exp. Med.* 182:335–344.

Sather-Avelar, R.; Lemos, E.M.; Reis, D. D.; Medrano-Mercado, N.; Araújo-Jorge, C.T.; Antas, Z.R.Ç.; Corrêa-Oliveira, R.; Teixeira-Carvalho, A.; Santos-Elói, M.S.; Favato, D.; Martins-Filho, O.A. (2003) Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal of Immunology* 58:655-663.

Scales, W.E; Chensue, S.W; Otterness, I.; Kunkel, S.L.J. (1989). Regulation of monokine gene expression: prostaglandin E2 suppresses tumor necrosis factor

but not interleukin-1 alpha or beta-mRNA and cell-associated bioactivity. *Leukoc Biol.* 5:416-21.

Silva J.S.; Vespa, G.N.; Cardoso, M.A.; Aliberti, J.C.; Cunha, F.Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 63:4862-4867.

Silva, J.S.; Morrissey, P.J.; Grabstein, K.H.; Mohler, K. M>; Anderson, D.; Reed, S. G. (1992). Interleukin-10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175: 169-174.

Smith, HR; Olson, R.R. (1990) B lymphocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 17:833–9.

Snyder, D.; Beller, D.; Unanue, E. (1982). Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature.* 299:163-166.

Soares, M.B.P., Silva-Mota, K.N.; Lima, R.S.; Bellintani, .C.; Pontes-De-Carvalho, L.; e Rebeiro-Dos-Santos, R. (2001) Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* 159:703-709.

Soares, M.B.P.; Pontes-De-Carvalho, L. e Ribeiro-Dos-Santos, R. (2001). The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73:547-559.

Souza, P.E.A.; Rocha, M.O.C.; Menezes, C.A.S.; Coelho, J.S.; Chaves, A.C.L.; Gollob, K.J.; Dutra, W.O. (2007). *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of co-stimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from indeterminate and cardiac Chagas disease patients. *American society for Microbiology.* 75:1886-1894.

Souza, P.E.A.; Rocha, M.O.C.; Rocha-Vieira, E.; Menezes, C.A.S.; Chaves, A.C.L.; Gollob, K.J.; Dutra W. O. (2004) Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. *American Society for Microbiology*. 72:5283–5291.

Sterin-Borda L., Gorelik G., Postan M., Gonzales Cappa S., Borda E, (1999) Alterations in cardiac beta-adrenergic receptors in chagasic mice and their association with circulating beta-adrenoceptor-related autoantibodies, *Cardiovasc. Res.* 41:116-125.

Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M., Kambayahi, T., (1994). Evidence for the involvement of interleukin-10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Medicine* . 180:2365–2370.

Takahashi, H.k.; Iwagaki, H.; Tamura, R. Katsuno, G.; Xue, D.; Sugita, S.; Mori S. Yoshino, T.; Tanaka, N.; Nishibori, M. (2005). Differential effect of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> on lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *European Journal of Pharmacology*. 512:223-230.

Talvani A., Ribeiro C. S., Aliberti J.C.S., Michailowsky V., Santos P. V.A., Murta S.M.F, Romanha A. J., Almeida I.C., Farber J., Lannes-Vieira J, Silva J.S, Gazzinelli, R.T. (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*, *Microbes and Infection*. 2:851–866.

Talvani, A.; Rocha, M.O.C; Ribeiro, A.L.; Correa-Oliveira, R. Teixeira, M.M. (2004). Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J. Infectg. Dis.* 189:214-220.

Talvani, A.; Rocha, M.O.C.; Ribeiro, L.A.; Borda, E.; Sterin-Borda L.; Teixeira, M.M. (2006) Levels of anti-M2 and anti-b1 autoantibodies do not correlate with the

degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease, *Microbes and infection*. 8: 2459-2463.

Tarleton, R.L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31:550-554.

Tarleton, R.; Zhang, L.; Downs, M. (1997). Autoimmunity rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3932-3937.

Townsend, S. E. e Goodnow, C.C. (1998). Abortive Proliferation of Rare T Cells Induced by Direct or Indirect Antigen Presentation by Rare B Cells In Vivo. *J. Exp. Med.*, 187:1611-1621.

Tsitoura, D.C.; Yeung, V.P.; DeKruyff, R.H.; Umetsu, D.T. (2002) Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens, *Int. Immunol.* 14:659-667.

Vago, A.R.; et al, (2000) Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* 156:1805-1809.

Vago, A.R.; Macedo, A.M.; Oliveira, R.P.; Andrade, L.O.; Chiari, E.; Galvão, L.M.; Reis, D.; Pereira, M.E.; Simpson, A.J.; Tostes, S.; Pena, S.D. (1996) Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *A. J. Pathol.* 149:2153-2159.

Van Der Pouw Kraan, T. C. T. M.; Boeije, L. C. M.; Smeenk, R. J. T.; Wijdenes J.; Aarden, L. A. (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J. Exp. Med.* 181:775.

Van Voorhis, W. C. e Eisen H. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169:641-652.

Vespa, G.N.R.; Cunha, F.Q.; Silva, J.R. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62:5177-5182.

Vitelli-Avelar, D.M; Sathler-Avelar, R.; Wendling, A.P; Rocha, R.D; Teixeira-Carvalho, A.; Martins, N.E; Dias J.C; Rassi, A., Luquetti, A.O; Elói-Santos, S.M; Martins-Filho, O.A. (2007). Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods.* 318:102-12.

Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F., deWeck, A.L., (1983). Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *Journal of Immunology* 130:1770–1773.

WHO Expert Committee.(2002) Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Per Ser 905:I-VI, 1-109.

Wood, J. N.; Hudson,L. T.; Jessell, M. e Yamamoto M. (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature* 296, 34 – 38

Yuschenkoff, V.N.; Sethna, M.P.; Freeman, G.J.; Parker, D.C. (1996) Coexpression of B7-1 and antigen blocks tolerance induction to antigen presented by resting B cells, *J. Immunol.* 157:1987–1995.

Zarate-Bladesa C.R., Bladés N., Nascimento M.S., Silveira J.F., Umezawa E. S., (2007) Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted–secreted antigens in an endemic area for Chagas’ disease in Bolivia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57:229–232.

**9.0 - ANEXO**



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 7003  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3248.9641  
FAX: (31) 3248.9939



Ministério da Saúde- Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Av. Augusto de Lima, 1715 – Bairro Barro Preto  
39100-002 Belo Horizonte – MG – BRASIL  
Tel.: (31) 3295-3566 – FAX: (31) 3295-3115

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) paciente \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado(a) para participar de um projeto de pesquisa sobre a Doença de Chagas: (ASSOCIAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENO, IMUNORREGULAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA MORBIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS). Esse projeto se iniciará em setembro de 2006, com término previsto para março de 2008.

A proposta deste trabalho é buscar esclarecer como o organismo do paciente está reagindo com relação à doença. A infecção pelo parasito *Trypanossoma cruzi*, causador da doença, pode se manifestar de diversas maneiras e gravidade, dependendo, entre outros fatores, do tipo da resposta imunológica contra a infecção, ou seja, da resposta do organismo do indivíduo. As informações obtidas por este tipo de investigação podem auxiliar na compreensão dos mecanismos do surgimento das lesões e evolução da doença e no tratamento clínico dos pacientes.

Se você concordar em ser atendido pela equipe de pesquisadores e colaborar voluntariamente com este estudo, será colhida amostra de sangue (50mL) em tubos estéreis, para a realização dessa pesquisa. Os possíveis riscos associados com a coleta de sangue é formação de um pequeno hematoma no local da punção venosa, através do sistema de coleta a “vácutainer”, este processo é pouco freqüente e não trará problemas clínicos importantes. A amostra deste material será conduzida ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ para realização do exame de sangue e deverá ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima. Todo o material a ser utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório. O restante da avaliação clínica e laboratorial a ser realizada faz parte da rotina de atendimento do ambulatório

Sua participação nesse estudo é voluntária e não lhe trará benefício direto ou privilégio. **Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo, inclusive no seu acompanhamento médico.** Todos os exames e consultas médicas serão gratuitos. Para qualquer esclarecimento, por favor, entre em contato com um dos pesquisadores abaixo:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha	Telefone: 3248-9547
Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira	Telefone: 3349-7775
Dra. Juliana de Assis Silva Gomes	Telefone: 3349-7779
Andréia Maria Molica	Telefone: 3349-7748
Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG)	Telefone: 3499-4592

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, \_\_\_\_\_, após ser esclarecido sobre o projeto de pesquisa, concordo em participar do estudo acima.

Belo Horizonte, ..... de ..... de 200....

\_\_\_\_\_  
Orientador responsável: Manoel Otávio da Costa Rocha

\_\_\_\_\_  
Mestranda: Andréia Maria Molica