



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

LEYLLANE RAFAEL MOREIRA

**EFEITO DO BENZONIDAZOL SOBRE AS CÉLULAS MONONUCLEARES
SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM UMA CEPA DE *Trypanosoma
cruzi* RESISTENTE AO TRATAMENTO**

RECIFE-PE
2018

LEYLLANE RAFAEL MOREIRA

**EFEITO DO BENZONIDAZOL SOBRE AS CÉLULAS MONONUCLEARES
SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM UMA CEPA DE *Trypanosoma*
cruzi RESISTENTE AO TRATAMENTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Dr^a Virgínia Maria Barros de Lorena

(Instituto Aggeu Magalhães- IAM/Fiocruz)

Co-orientadora: Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

(Instituto Aggeu Magalhães- IAM/Fiocruz)

Recife
2018

M835e	Moreira, Leyllane Rafael. Efeito do benzonidazol sobre as células mononucleares submetidas a infecção <i>in vitro</i> com uma cepa de <i>trypanosoma cruzi</i> resistente ao tratamento / Leyllane Rafael Moreira. – Recife: o autor, 2018. 116 f.; il.; 30 cm. Orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em medicina tropical. Inclui referências, apêndices e anexos. 1. <i>Trypanosoma cruzi</i>. 2. Tratamento farmacológico. 3. Citocinas. I. Lorena, Virgínia Maria Barros de (orientadora). II. Título. 616.97 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 084)
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

LEYLLANE RAFAEL MOREIRA

**EFEITO DO BENZONIDAZOL SOBRE AS CÉLULAS MONONUCLEARES
SUBMETIDAS À INFECÇÃO *IN VITRO* COM UMA CEPA DE *Trypanosoma*
cruzi RESISTENTE AO TRATAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 16/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Michelle Christiane da Silva Rabello (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Á Deus e minha família, em especial aos
meus pais, Lucicleide e Aparecido.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ser o meu guia em todos os momentos de aflição e ter me dado forças para continuar esta jornada!

Aos meus pais, Lucicleide e Aparecido, por serem a razão da minha vida e sempre me incentivarem a buscar os meus sonhos. Eu amo vocês imensamente!

Aos meus queridos avós, Angelita (*in memoriam*), Ataíde (*in memoriam*), José (*in memoriam*) e Julieta (*in memoriam*), por terem sido os melhores avós desse mundo, e as referências da minha vida em bondade e amor ao próximo. Sei que lá do céu, vocês também estão vibrando por essa minha conquista. Saudades imensas!

Á minha querida madrinha-mãe, Jacineide, por acompanhar e torcer por cada passo meu, obrigada por ser tão presente em minha vida. Amo a senhora!

Ao meu namorado, Demétrio, por toda paciência, companheirismo e amor nos meses mais desafiadores da minha vida. Eu amo você!

Ao meu cãozinho, Scooby, por sempre me roubar um sorriso nos dias mais difíceis e exaustivos. Te amo!

Á todos os meus familiares, presentes em todos os momentos da minha vida, amo todos vocês!

Á minha querida orientadora, Virginia, obrigada por confiar em mim desde o primeiro dia em que surgi em tua porta pedindo uma luz, por ter me ensinado o tipo de profissional que eu quero ser quando um dia crescer. Obrigada pela amizade, e por sempre nos dar ânimo quando tudo parecia perdido, sem você sei que não teria conseguido. Te amo, Vi!

Á minha co-orientadora, Clarice, por todo aprendizado, estímulo e discussões científicas edificantes. Muito obrigada!

Á minha querida amiga, Kamila Kássia, por ser a minha duplinha de bancada, de cultura, de lágrimas. Nós sabemos o quanto esses dois anos foram difíceis... garrafas contaminadas, muitas dosagens, sobrenadantes de culturas, mas também muitas risadas, e de um presente que Deus me deu, uma irmã de coração! Eu não teria conseguido sem a tua ajuda! Te amo, Mila!

Á minha amiga, Michelle Barros, por ter sido tão importante na minha vida! Obrigada pela amizade, pelos puxões de orelha, por ceder teu lar para que eu conseguisse realizar um sonho e ainda, por me fazer enxergar que a vida é muito ruim quando a gente não tem uma amiga assim pra contar. Amo-te e eu não vou te abandonar, Mish!

Á todos do meu querido Grupinho Chagas, Diego, Amanda, Mineo, Karine, Tiago, por sempre me ensinarem tanto e pelo apoio, principalmente nesse último semestre do mestrado tão conturbado, sem vocês eu não teria conseguido! Muito obrigada, amo vocês!

Á todos os meus amigos da pós em Medicina Tropical, em especial à Jorge, Lucas, Luan, Marcela, por terem dividido comigo todas as risadas e aflições no período de aula. Que saudade de ver vocês todos os dias!

Aos amigos do Aggeu, Crhisllane, João, Rodrigo e Túlio por fazer dos almoços as horas mais divertidas do meu dia e, pelo abraço de urso quando o dia acorda cinza. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos da faculdade, Lays, Paulo, Vinícius, Wadja e João Paulo por continuarem sempre presentes em minha vida, mesmo distantes, cada um trilhando o caminho que escolheu pra viver. Que bom que eu tive vocês no meio desse caminho, e a propósito, morro de saudades!

Aos amigos de sempre, Camila Carvalho, Iasmine Cataldi, Adson Belém, Alexandra Luna, Leandro Aguiar e Wilton Leal que apesar da distância física, sempre se fazem presentes em meu coração.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela oportunidade de desenvolver o estudo e aprender mais sobre o universo das doenças tropicais.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM/Fiocruz) por disponibilizar toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento do estudo.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por todo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo!

“A única coisa que se coloca entre um homem e o que ele quer na vida é normalmente e meramente, a vontade de tentar e a fé para acreditar que aquilo é possível.”

(Richard M. Devos)

RESUMO

O fármaco preconizado para o tratamento da doença no Brasil é o benzonidazol (Bz) e atualmente sua utilização na fase crônica da doença de Chagas tem por finalidade prevenir ou retardar a evolução da doença para formas clínicas mais graves. Acreditamos que o sucesso do tratamento dependa do sinergismo entre a ação tripanocida do Bz e a resposta imune do hospedeiro. Nosso estudo avaliou as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) infectadas *in vitro* com uma cepa de *Trypanosoma cruzi* que tem resistência ao Bz, a cepa colombiana (CCol), e adição do tratamento com Bz. O sangue de indivíduos voluntários não portadores da doença (n=11) foi coletado em sistema à vácuo em tubos contendo heparina sódica. As células mononucleares foram separadas através de centrifugação em gradiente de densidade por Ficoll Hypaque PLUS™. As PBMCs foram depositadas em placas de 48 poços (1×10^6 células/mL) para adesão das células aderentes/ monócitos por 1h. Em seguida, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas e reservadas. e os tripomastigotas da CCol foram adicionados ($2,5 \times 10^5$ parasitas/ poço) durante 2h. Os parasitas que não se interiorizaram foram removidos por lavagem e por fim, os linfócitos foram readicionados e o tratamento com Bz foi adicionado. Os co-cultivos foram incubados por 24h, 5 e 10 dias. Os sobrenadantes de cultura foram estocados a -20°C para a dosagem de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF) por *cytometric beads array* (CBA), e com as células do co-cultivo, foi realizada a imunofenotipagem para as moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, e CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺. Nossos resultados demonstraram que o Bz induziu uma modulação negativa da ativação celular em células T CD4⁺ e CD8⁺ por aumentar a expressão de CTLA-4 e por promover a diminuição de HLA-DR em monócitos, além de reduzir a produção de IL-2 e IFN- γ em PBMC infectadas *in vitro* com a CCol, quando comparadas às células sem tratamento. Portanto, por induzir essa inibição da resposta celular acreditamos que a utilização de Bz poderia trazer benefício ao indivíduo infectado por cepas de *T. cruzi* resistentes ao Bz, se os esquemas de tratamento pudessem ser personalizados de acordo com o tipo de cepa albergada pelo indivíduo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Tratamento farmacológico. Citocinas.

ABSTRACT

The drug recommended for the treatment of the disease in Brazil is benznidazole (Bz) and currently its use in the chronic phase of Chagas disease is to prevent or delay the evolution of the disease to more severe clinical forms. We believe that the success of the treatment depends on the synergism between the trypanocidal action of Bz and the immune response of the host. Our study evaluated the in vitro-infected peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with a *Trypanosoma cruzi* strain that has resistance to Bz, Colombian strain (CCol), and addition of the treatment with Bz. Blood from volunteer non-diseased individuals (n = 11) was collected in a vacuum system in tubes containing sodium heparin. Mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation by Ficoll Hypaque PLUS™. PBMCs were deposited in 48 well plates (1 x 10⁶ cells / ml) for adhesion of adherent cells / monocytes for 1h. Then, the non-adherent cells (lymphocytes) were removed and reserved. and the CCol trypomastigotes were added (2.5 x 10⁵ parasites / well) for 2h. The parasites that did not internalize were removed by washing and finally, the lymphocytes were readmitted and treatment with Bz was added. Co-cultures were incubated for 24h, 5 and 10 days. The culture supernatants were stored at -20 ° C for the cytometric beads array (CBA), and with the cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- co-cultivation cells, immunophenotyping for CD28 + and CTLA-4 + molecules was performed on CD4 + and CD8 + lymphocytes, and CD80 +, CD86 + and HLA-DR + on CD14 + monocytes. Our results demonstrated that Bz induced a negative modulation of cell activation in CD4 + and CD8 + T cells by enhancing CTLA-4 expression and by promoting the decrease of HLA-DR in monocytes, in addition to reducing the production of IL-2 and IFN - γ in PBMC infected in vitro with CCol, when compared to untreated cells. Therefore, by inducing such inhibition of the cellular response we believe that the use of Bz could bring benefit to the individual infected by Bz resistant *T. cruzi* strains if the treatment schemes could be customized according to the type of strain housed by the individual.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Drug Therapy. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número estimado de imigrantes infectados pelo <i>T. cruzi</i> vivendo em países não endêmicos para a Doença de Chagas.....	20
Figura 2. Evolução clínica da Doença de Chagas humana.....	23
Figura 3. Imunorregulação das citocinas durante a Doença de Chagas.....	24
Figura 4. Comparação entre os modelos Duas Hbridizações e Três Ancestrais no papel das mudanças genéticas durante a evolução clonal de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 5. Distribuição geográfica estimada das DTU's de <i>T. cruzi</i> em ciclos domésticos e silvestres.....	31
Figura 6. Célula Vero infectada com a CCol de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 7. Desenho esquemático dos poços do co-cultivo entre PBM, tripomastigota da CCol de <i>T. cruzi</i> e o tratamento com Bz.....	40
Figura 8. Estratégia de aquisição e análise de linfócitos.....	43
Figura 9. Estratégia de aquisição e análise de monócitos.....	44
Figura 10. Exemplo de aquisição e análise da média de intensidade de fluorescência (MIF).....	45
Figura 1. Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos.....	51

Figura 2. Detecção da produção de citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, no sobrenadante de cultura das células aderentes e não aderentes, obtidas do co-cultivo entre PBMC, infecção pela CCol de *T. cruzi* e tratamento com Bz..... 54

Figura 3. Detecção da produção de citocinas IL-6, IL-4, IL-2, no sobrenadante de cultura das células aderentes e não aderentes, obtidas do co-cultivo entre PBMC, infecção pela CCol de *T. cruzi* e tratamento com Bz..... 55

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Características de diferentes populações de *Trypanosoma cruzi*, baseada na classificação em DTU's..... 29

Tabela 2. Característica dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo..... 42

Tabela 1. Medianas de expressão e média de intensidade de fluorescência de moléculas de superfície em linfócitos..... 57

Tabela 2. Medianas da expressão e da média da intensidade de fluorescência de moléculas de superfície em monócitos..... 57

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

APC	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis</i>
Bz	Benzonidazol
CBA	<i>Citometric Beads Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCol	Cepa Colombiana
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DC	Doença de Chagas
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTU's	<i>Discrete Typing Units</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon gama
IGg	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SSC	<i>Side Scatter</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares secretores de citocinas do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Doença de Chagas.....	20
2.2 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas.....	23
2.3 Tratamento etiológico da Doença de Chagas.....	26
2.4 Linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
2.4.1 Cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3 JUSTIFICATIVA.....	34
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	35
5 OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
6.1 Cultivo de Células Vero para manutenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	37
6.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas da CCol de <i>T. cruzi</i>	37
6.3 Seleção de indivíduos e coleta de sangue.....	38
6.4 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC).....	39

6.5 Co-cultivo de PBMC, tripomastigota CCol de <i>T.cruzi</i> e adição de tratamento com Bz.....	39
6.6 Coleta do sobrenadante e armazenamento.....	40
6.7 Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura do co-cultivo de PBMC, Tripomastigota CCol de <i>T. cruzi</i> e adição de tratamento com Bz.....	41
6.8 Imunofenotipagem de linfócitos e monócitos oriundos do co-cultivo entre PBMC, Tripomastigota da CCol de <i>T. cruzi</i> e adição de tratamento com Bz.....	41
6.9 Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos no citômetro de fluxo.....	42
6.10 Análises estatísticas.....	45
7 RESULTADOS.....	46
Artigo: O tratamento <i>in vitro</i> com benzonidazol modula negativamente a resposta celular após infecção com a cepa colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
8 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICES.....	84
APÊNDICE A – Artigo: <i>In vitro</i> treatment with benzonidazole down-regulation cellular response after infection with the Colombian strain of <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	84
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário.....	106
APÊNDICE C – Cinética tempo <i>versus</i> resposta das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF.....	108

ANEXOS.....	116
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	116

1 INTRODUÇÃO

O tratamento etiológico da doença de Chagas (DC) é um desafio, principalmente na fase crônica da doença, onde o benzonidazol (Bz), medicamento disponível para o tratamento, apresenta uma taxa de cura pouco expressiva, efeitos colaterais graves e ausência de critérios para a avaliação da cura do paciente (MARIN-NETO et al., 2009). Essa baixa eficácia do Bz na fase crônica pode estar relacionado a vários fatores, dentre eles a resistência natural ao fármaco que algumas cepas de *Trypanosoma cruzi* apresentam, como a cepa colombiana (CCol) e Montalvânia, (CAMPOS et al., 2005; DUTRA et al., 2014). Nos estudos de Nascimento (2015) e Neves (2015) o efeito do Bz foi avaliado *in vitro* sobre as células mononucleares de pacientes portadores da fase crônica, quando infectadas com a cepa Y do *T. cruzi*, que têm sensibilidade ao medicamento. Dessa forma, verificou-se que a resposta inflamatória foi modulada negativamente, devido a ação de citocinas do tipo Th2 (IL-10) e do receptor de quimiocina CXCR5, após o tratamento com o Bz, o que reforça a utilização desse fármaco na fase crônica da doença. Todavia os eventos imunomodulatórios das cepas resistentes frente ao tratamento ainda não foram avaliados.

Magalhães et al. (2015) verificaram o perfil imunológico da infecção *in vitro* por *T. cruzi* apresentado em monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis quando infectados por cepas diferentes, onde a CCol induziu uma ativação aumentada de monócitos e produção da citocina anti-inflamatória IL-10, já a cepa Y teve baixa ativação de monócitos e perfil inflamatório. Entretanto, os mecanismos imunomodulatórios não foram observados frente ao tratamento com Bz, o que auxiliaria no entendimento da resistência ao fármaco.

Devido aos intensos fluxos migratórios, uma heterogeneidade de cepas de *T. cruzi* vem disseminando a doença pelo continente americano (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A CCol, que está bem distribuída na América Central e no Brasil (ZINGALES et al. 2012), e em estudos experimentais demonstrou um maior poder de invasividade da mucosa gástrica e produção de uma infecção mais intensa em camundongos, quando comparadas a outras cepas de *T. cruzi* (ANDRADE, 1990; ANDRADE, 2000; GUERREIRO et al. 2015). Além disso, a CCol é resistente

ao principal fármaco de tratamento da Doença de Chagas, o Bz (FILARDI; BRENER, 1987; WILKINSON et al. 2008), o que poderia explicar o motivo de alguns pacientes não alcançarem a cura da doença.

Diante do exposto, o presente estudo se propõe a investigar a ação do Bz frente às células mononucleares de indivíduos voluntários, quando infectadas *in vitro* com a CCol de *T. cruzi*, pela produção de citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) e a expressão de moléculas de superfície em linfócitos e monócitos. Essa avaliação pode auxiliar o entendimento dos eventos imunológicos relacionados a falha terapêutica do Bz, em pacientes infectados com a cepas de comportamento semelhante a colombiana. Assim, esperamos com a realização desse trabalho, sugerir possíveis mecanismos imunológicos para fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais, o que melhoraria a eficácia do tratamento.

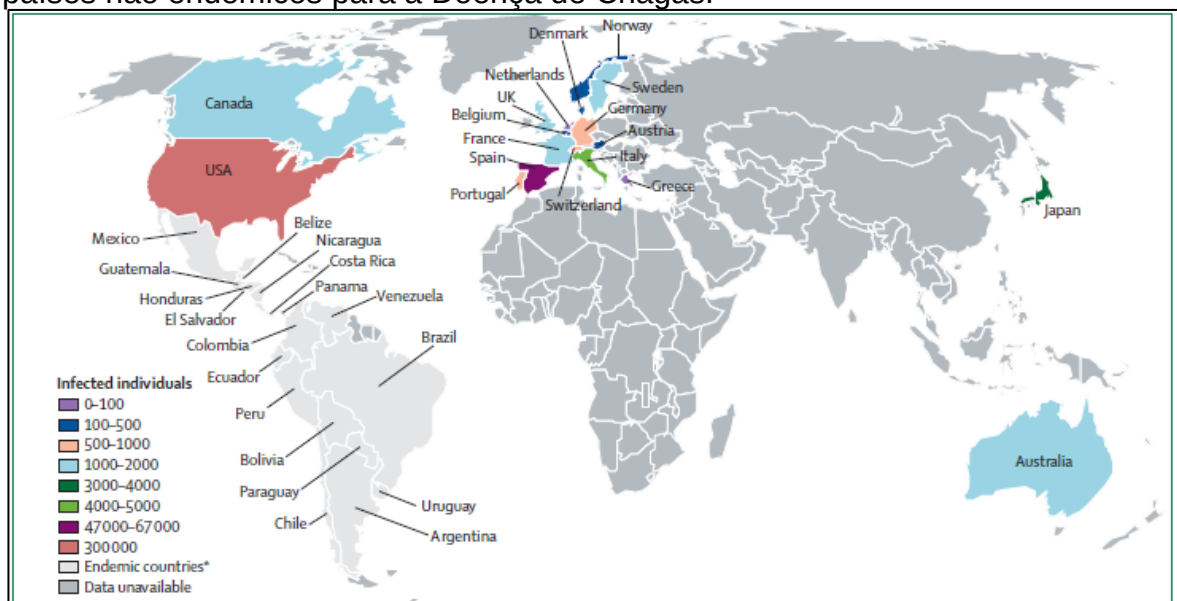
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que pertence a ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae (COURA; DIAS, 2009). A doença foi descoberta em 1909, pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas que descreveu o agente etiológico, vetores, principais reservatórios e mecanismos de infecção, bem como as manifestações clínicas do primeiro caso humano. Entretanto, a DC provavelmente é bastante antiga, pois o DNA do *T. cruzi* foi encontrado em espécimes teciduais de múmias de até 9000 anos atrás (AUFDERHEIDE et al., 2004; FERNANDES; ANDREWS, 2012).

A DC representa um grave problema de saúde pública, que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente na América Latina, onde é considerada endêmica e estima-se que 75-90 milhões de pessoas estão expostos à infecção pelo *T. cruzi* (COURA et. al., 2009). Todavia, nos últimos anos, novos casos vêm sendo notificados em áreas não endêmicas, na América do Norte e em outros países, como nos Estados Unidos, Canadá, Espanha e Austrália, em decorrência dos intensos fluxos migratórios (Figura 1) (COURA; VIÑAS, 2010; RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 1. Número estimado de imigrantes infectados pelo *T. cruzi* vivendo em países não endêmicos para a Doença de Chagas.



Fonte: Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2010.

No Brasil, estima-se que aproximadamente 3 milhões de pessoas sejam portadores da DC (PETHERICK et al. 2010). A taxa média de internação nacional pela DC foi de 0,99 no período de 1995 a 2008. No mesmo período, Pernambuco obteve uma média de 0,39, sendo as maiores taxas no interior do Estado. Com relação ao número de óbitos, o Brasil apresentou média de 3,66 no período de 1980 a 2007 e o estado de Pernambuco apresentou média de 1,56 no mesmo período (BRAZ et al., 2011).

A forma de transmissão clássica da doença é através da via vetorial, onde se dá o contato da pele lesionada do indivíduo com os tripomastigotas metacíclicos presentes nas excretas de insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros, sendo o principal vetor o *Triatoma infestans* (COURA, 2007; GORLA et al. 2010). Outras vias, como transplantes de órgãos ou transfusional e a via congênita correspondem mundialmente de 5 a 20% e 0,5 a 8% da transmissão do parasita, respectivamente (DIAS, 2000). Contudo, o controle da sua transmissão pelo combate ao vetor *T. infestans*, e pela triagem de doadores infectados em bancos de sangue, a doença vem sofrendo uma relevante diminuição (DUARTE et al., 2003; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007, OSTERMAYER et al., 2011).

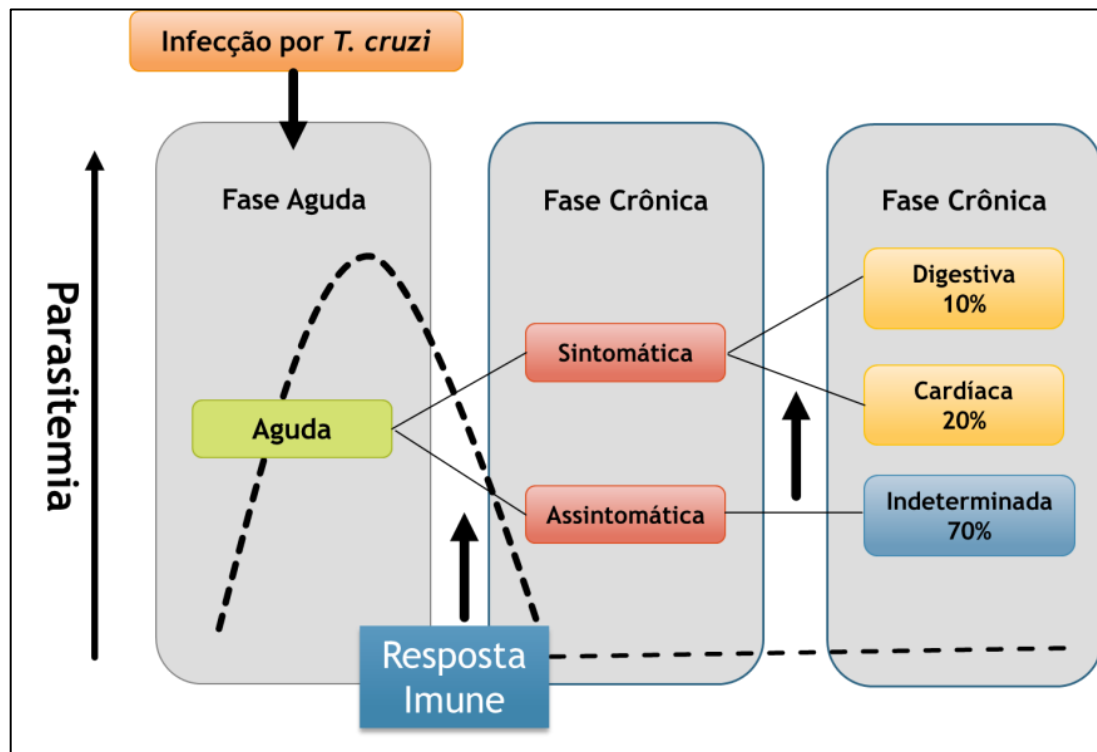
No Brasil, a transmissão pela via oral ou vetorial-oral tem ganhado atenção devido aos surtos de DC aguda, reportados após o consumo de alimentos, como açaí e a cana-de açúcar, contaminados por vetores ou reservatórios infectados (RUEDA et al., 2014; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991). No período de 2000 a meados de 2010, foram registrados 1093 casos de DC aguda, sendo, 71% (776/1093) por transmissão oral e 6% por transmissão vetorial (70/1093) (BRASIL, 2010). Segundo Laison et al. (1979), a transmissão por via oral pode vir a se tornar um grande problema de saúde pública, considerando que os casos são subnotificados e as precauções necessárias não são tomadas (MARTINS et al., 2011).

As manifestações clínico-laboratoriais dividem a DC em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda dura de 2 a 4 meses e cursa com elevada parasitemia, na maioria dos indivíduos é imperceptível devido à ausência de manifestações clínicas ou a presença de sinais como febre, mal-estar, cefaléia, adenomegalia e hepatoesplenomegalia (COURA, 2007; KIRCHHOFF; RASSI, 2011). Quando a transmissão é vetorial, alguns indivíduos podem apresentar sinais de porta de entrada do parasita, como o edema bipalpebral denominado sinal de

Romanã ou o chagoma de inoculação (LANA; TAFURI, 2005). Durante a fase aguda, o diagnóstico é realizado através de métodos parasitológicos já que o *T. cruzi* permanece circulando na corrente sanguínea. Podem ser utilizados métodos convencionais diretos (esfregaços, gota espessa, exame a fresco), caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração, tais como micro-hematócrito. Também podem ser utilizados os métodos indiretos como o xenodiagnóstico e hemocultura, contudo, estes testes possuem maior complexidade em sua realização e maior tempo de execução (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; KIRCHHOFF; RASSI, 2011).

Após o fim da fase aguda, se inicia a fase crônica cerca de 2 a 4 meses após a infecção aguda. A progressão para essa fase da doença é concomitante com o estabelecimento de uma resposta imune relativamente eficiente contra o parasita, que cursa com a diminuição da parasitemia e aumento dos níveis de IgG no sangue dos indivíduos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; DUTRA et al. 2009). A maioria dos pacientes crônicos evolui para a forma indeterminada da DC que apresenta ausência de sintomas e manifestações clínicas, e estima-se que 60-70% permaneçam nessa forma clínica da doença. Cerca de 30-40% evoluem para as formas sintomáticas mais graves: a cardíaca (20-30%) e digestiva (8-10%) (Figura 2) (RASSI Jr; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Nesta fase da doença, devido à baixa parasitemia, o diagnóstico laboratorial é realizado empregando métodos sorológicos. O diagnóstico é realizado utilizando-se um teste de elevada sensibilidade em associação com outro de alta especificidade (ELISA com antígeno total ou imunofluorescência indireta-IFI) (BRASIL, 2005; RASSI et al. 2012).

Figura 2 – Evolução clínica da Doença de Chagas humana.



Fonte: Adaptado de Dutra et al. 2009.

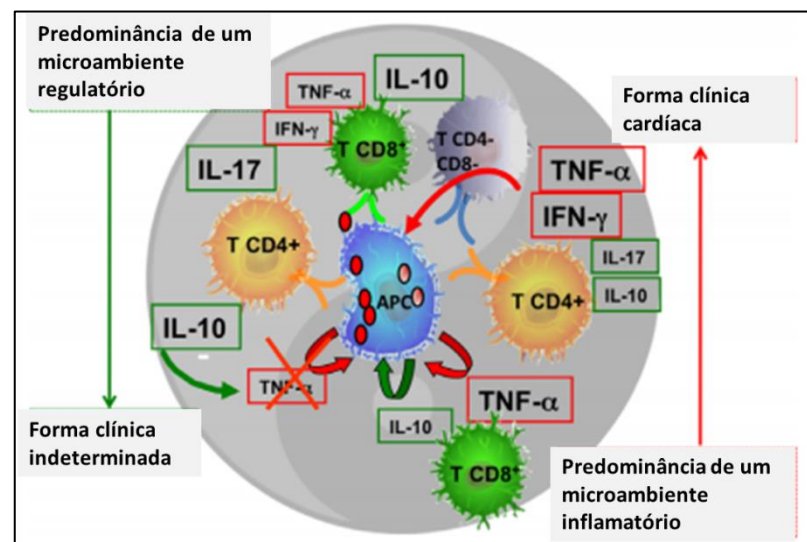
2.2 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas

Os mecanismos imunológicos referentes à evolução clínica da DC ainda não foram totalmente elucidados, principalmente no que diz respeito à progressão dos portadores da forma indeterminada da doença para as formas sintomáticas graves (cardíaca, digestiva ou mista). Todavia, acredita-se que a associação do *background* genético e resposta imune do hospedeiro e fatores ligados ao parasita são importantes na evolução clínica do paciente (DUTRA; GOLLOB, 2008; GUTIERREZ et al., 2009). Dentre as características do hospedeiro, a ausência de manifestações clínicas em indivíduos com a forma indeterminada estaria correlacionada à capacidade de controlar a resposta imune que é dirigida ao parasita, o que não ocorreria em indivíduos portadores de formas sintomáticas, que apesar de manter uma resposta eficaz ao parasita, resultaria em um processo inflamatório exacerbado

com consequentes efeitos danosos para os tecidos (SATHLER-AVELAR et al., 2009).

É bem demonstrado que pacientes com a forma indeterminada apresentam um microambiente imune modulatório, com a alta produção de citocinas do tipo IL-10 e IL-17 (COSTA et al. 2009; MAGALHÃES et al. 2015; VILLANI et al. 2010). Em contrapartida, a resposta observada nos pacientes cardíacos tende a ser inflamatória, com alta produção de TNF e IFN- γ voltado para a resposta Th1, que ativa os macrófagos a matarem o parasita intracelular, e se a resposta não for controlada, pode ser correlacionada com a piora da função cardíaca (SOUZA et al. 2004; TALVANI et al. 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Imunorregulação das citocinas durante a Doença de Chagas



Fonte: Adaptado de Dutra et al. (2014)

Nesse mesmo contexto, Sousa et al. (2014) avaliaram os níveis de citocinas presentes no plasma de pacientes chagásicos com a forma indeterminada, cardíaca e também de indivíduos voluntários, e foi demonstrado que pacientes com a forma indeterminada tem uma alta expressão de IL-10, comparada aos indivíduos dos outros grupos, no entanto, a expressão de citocinas inflamatórias, como IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-1 β está aumentada nos pacientes com a forma cardíaca, demonstrando a polaridade da resposta imunológica entre as formas clínicas da doença.

Logo após a infecção pelo *T. cruzi*, imediatamente após o parasitismo, é acionado o recrutamento de leucócitos para o tecido, e a migração de células do sistema imunológico é dependente da produção local de citocinas e quimiocinas,

bem como o aumento na regulação da expressão dos seus receptores e moléculas de adesão (LAUCELLA et al. 1996; LANNES-VIEIRA et al. 2003). No entanto, a resistência do hospedeiro durante a DC é dependente tanto de mecanismos relacionados a imunidade inata quanto à adquirida (KAYAMA; TAKEDA, 2010; KRETTLI, 2009).

As respostas inatas, logo após o início da parasitemia, cursam com o aumento de citocinas pró-inflamatórias e mediadores microbicidas liberados por macrófagos e células NK, seguido a isso ocorre a ativação policlonal dos principais subgrupos de linfócitos e o início da imunidade adquirida contra o parasita, mediada por células T CD4+, CD8+ e células B. Dessa forma, essa robusta maquinaria imune reduz, mas não elimina o parasita (BRENER; GAZZINELLI, 1997; DOS REIS, 2011).

A produção de citocinas e quimiocinas, que são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, pode inibir ou estimular a resposta imune. Além disso, sua presença no microambiente de células T e na apresentação de antígeno determina o tipo de resposta inflamatória que irá ser produzida (D'AMBROSIO; SINIGAGLIA, 2000). Outro mecanismo muito importante no controle da parasitemia é a produção de óxido nítrico, que é o grande responsável pela morte do *T. cruzi* mediada por macrófagos, entretanto o aliado também pode ser danoso, devido a esse estresse oxidativo gerado culminar em lesão tecidual (WEN et al., 2006). As citocinas IFN- γ e TNF, bem como quimiocinas, são fortes indutoras da enzima que produz o óxido nítrico (NO- sintase), que são produzidas em grande quantidade durante a infecção aguda, em contrapartida TGF- β e IL-10 regulam negativamente essa indução. No entanto, a toxicidade do óxido nítrico é dependente da sensibilidade do parasita, que está relacionada a cepa de *T. cruzi* com a qual ocorreu a infecção, como também ao microambiente em que ele está exposto (GUTIERREZ et al., 2009; MACHADO et al., 2008; SILVA et al., 2003).

Na fase aguda da doença, citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF são prontamente liberadas, aumentando a ativação de outras células inflamatórias (MICHAILOWSKY et al., 2001), e os macrófagos e células dendríticas que tinham endocitado o parasita, conseqüentemente estimulam uma forte resposta de células T e anticorpos contra o *T. cruzi*. Dessa forma, células T específicas produtoras de IFN- γ são geradas e migram junto com outros leucócitos para sítios de inflamação, em resposta a quimiocinas produzidas pela infecção, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, participando da resposta imune contra o parasita

(BILATE; CUNHA-NETO, 2008; TEIXEIRA et al., 2002). Segundo o estudo de Marino et al. (2004), realizado em modelo experimental, o bloqueio de CCR5 diminui consideravelmente a intensidade do infiltrado inflamatório cardíaco, sugerindo que a migração de linfócitos para o miocárdio durante a infecção aguda é dependente de CCR5.

Já na fase crônica, relacionada a cardiomiopatia chagásica, citocinas inflamatórias também são produzidas e há exacerbação da resposta Th1, apresentando níveis elevados de TNF e CCL2 comparados aos indivíduos com a forma indeterminada (FERREIRA et al., 2003; TALVANI et al., 2004). Gomes et al. (2014) avaliaram a ação do monócito/macrófago como fonte de mediadores inflamatórios para os pacientes chagásicos, em PBMC de pacientes com a forma indeterminada, cardíaca e de indivíduos não infectados, após a depleção/remoção das células aderentes. Foi demonstrado que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IFN- γ , tem diminuição após a depleção das células aderentes, em todos os grupos infectados, além disso, os níveis de IL-10 e IL-5 também foram reduzidos após a depleção das células aderentes, tanto na forma indeterminada como na cardíaca. Nesse contexto, os mediadores inflamatórios produzidos pelos monócitos, apesar de terem papéis diferentes nas formas clínicas da doença, são importantes na modulação das respostas imunes.

2.3 Tratamento etiológico da Doença de Chagas

As drogas disponíveis para o tratamento da DC são o nifurtimox e o benzonidazol (Bz), ambas tem efeito tripanossomicida para todas as formas evolutivas do parasita (amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas) e acredita-se que elas atuam através da formação de radicais livres ou metabólicos eletrofílicos, que afetam a síntese de macromoléculas, como DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (MAYA et al., 2003; MAYA et al., 2007; URBINA, 2009). A ausência de mecanismos de desintoxicação contra esses radicais livres no *T. cruzi*, torna o parasito mais sensível ao dano celular induzido por esses metabólitos do que as células humanas (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; MAYA et al., 2006). No entanto, os resultados obtidos com o tratamento com ambas as drogas variam de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, dose, idade, a origem

geográfica do paciente, além disso, algumas cepas do parasita apresentam resistência ao medicamento (COURA; CASTRO, 2002; FILARDI; BRENER, 1987).

A partir da década de 1980, o tratamento com nifurtimox foi descontinuado, no Brasil em outros países da América do Sul, como Argentina, Chile e Uruguai devido à sua toxicidade e ao seu efeito tripanossomicida ser menor em algumas regiões endêmicas (COURA; CASTRO 2002). Portanto, atualmente o único fármaco disponível pra o tratamento da DC no Brasil é o Bz. Todavia, o tratamento com o Bz pode causar toxicidade e vários efeitos adversos como dor de cabeça, exantemas, anorexia, vômitos, náusea, tontura, a efeitos mais graves como dermatopatia por hipersensibilidade, polineuropatia periférica e depressão da medula óssea (DIAS et al., 2015; KIRCHHOFF, 2000; BRASIL, 2005).

Na fase aguda da doença o Bz é fortemente recomendado com uma taxa de cura correspondendo a aproximadamente 70%, todavia na fase crônica ainda não há um consenso sobre a utilização da terapia, em decorrência dos efeitos adversos e ausência de critérios para a avaliação da cura do paciente (MARIN-NETO et al., 2009). No entanto, acredita-se que a utilização do Bz na fase crônica tem a finalidade de prevenir e/ou retardar a evolução da DC para formas clínicas mais agressivas (BERN et al., 2007; FRAGATA-FILHO et al., 1995; GARCIA et al., 2005). Sugere-se que um dos principais fatores associados à eliminação do parasita e controle da morbidade é a ação da terapia com o Bz e a resposta imune do hospedeiro (SATLHER-AVELAR et al., 2012), entretanto as manifestações imunológicas que ocorrem após o uso da medicação ainda não foram totalmente esclarecidas.

Em 2004, o projeto BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) foi criado com intuito de avaliar a segurança e a eficácia do Bz em pacientes com cardiomiopatia chagásica. O BENEFIT é um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado e ensaio clínico controlado, em que metade dos pacientes selecionados receberam o placebo e a outra metade o Bz. O estudo incluiu aproximadamente 3.000 pacientes com cardiomiopatia chagásica, e contou com a participação do Brasil, Argentina, Bolívia, Colômbia e El Salvador (MARIN-NETO et al., 2009). Recentemente, dados obtidos durante o BENEFIT foram publicados e demonstraram que entre os pacientes com cardiomiopatia chagásica o tratamento com Bz reduziu significativamente a detecção de parasitas circulantes, mas não reduziu o dano cardíaco (MORILLO et al., 2015; PECOUL et al., 2016).

Em relação aos mecanismos imunológicos, alguns estudos como o de Nascimento (2015) e Neves (2015) avaliaram o efeito do Bz nas células mononucleares do sangue periférico de portadores crônicos da DC, e a produção de citocinas, quimiocinas e expressão de receptores através da estimulação *in vitro* com uma cepa Y de *T. cruzi*, que têm sensibilidade ao medicamento. Dessa forma, foi identificado que a resposta inflamatória não foi exacerbada com o uso do fármaco, o que reforça a utilização do Bz na fase crônica da doença.

2.4 Linhagens de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* dá-se na forma evolutiva epimastigota quando se localizam no tubo digestivo de insetos vetores, quando atingem o reto são eliminadas nas fezes dos insetos como tripomastigotas metacíclicos que serão as formas infectantes no hospedeiro vertebrado. Ao penetrar na célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, e após um período de latência de 20 a 30 horas começam a se multiplicar (BERN, 2015; RASSI Jr; RASSI; MARINETTO, 2010). O parasita se reproduz através de divisão binária e apresenta uma grande diversidade genética e bioquímica em relação as suas cepas, o que vêm sendo considerado um fator importante nas diferentes apresentações clínicas da doença (ZINGALES et al., 2012), como demonstrado no estudo de Vago et al. (2000), onde parasitas isolados do coração e esôfago de pacientes chagásicos apresentaram perfis genéticos distintos. Inicialmente foi proposto que tal diversidade fosse resultante de uma evolução predominantemente clonal, mas atualmente, acredita-se que a troca genética entre os parasitas foi muito importante para estrutura populacional do parasita hoje encontrada (TIBAYRENC et al., 1986; ZINGALES et al., 2009).

Vários métodos foram utilizados a fim de caracterizar a estrutura populacional do *T. cruzi*, o que gerou diferentes denominações como: biodemas que levava em conta critérios morfológicos e histopatológicos para classificar a ocorrência de tipos biológicos característicos (ANDRADE, 1970; ANDRADE, 1976), zimodemas (MILES et al., 1978; ROMANHA et al., 1979), schizodemas (MOREL et al., 1980), clones (TIBAYRENC; AYALA, 1991), linhagens (SOUTO et al., 1996), clados (KAWASHITA et al., 2001), e mais recentemente haplótipos e DTUs (FREITAS et al., 2006; HERRERA et al., 2007; TIBAYRENC, 1998; TIBAYRENC, 2003). Dessa maneira, em

1999 foi realizada uma reunião satélite no intuito de organizar a classificação do *T. cruzi*, a partir de então foi definida a divisão do parasita em duas grandes linhagens evolutivas denominadas de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS,1999). Todavia, com o avanço da tecnologia e do conhecimento sobre a biologia do parasita, 10 anos mais tarde realizou-se uma nova reunião, e foi então admitido o termo DTU's (*Discrete Typing Units*) (TIBAYRENC, 2003).

As DTU's agrupam um conjunto de cepas geneticamente semelhantes entre si, e que podem ser identificados por marcadores genéticos, moleculares e imunológicos (TIBAYRENC; AYALA, 2015). São distribuídas em 6 DTU's de *T. cruzi* I (TcI) a *T. cruzi* VI (TcVI) que foram classificadas de acordo com crescimento *in vitro* e infectividade em células de cultura, capacidade de transmissão por triatomíneos, patogenicidade em camundongos e sensibilidade a drogas *in vitro* e *in vivo* (TIBAYRENC, 2003; ZINGALES et al. 2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Características de diferentes populações de *Trypanosoma cruzi*, baseada na classificação em DTU's

DTU	Patogenicidade em camundongos	Sensibilidade a drogas anti-tripanosomicidas	Transmissibilidade através de vetores triatomíneos	Ciclo
I	Alta patogenicidade	Baixa sensibilidade	Alta transmissibilidade	Doméstico e Silvestre
II	Baixa patogenicidade	Alta sensibilidade	Baixa transmissibilidade	Doméstico
III	ND	ND	ND	Silvestre
IV	ND	ND	ND	Silvestre
V	Baixa patogenicidade	Alta sensibilidade	Baixa transmissibilidade	Doméstico
VI	—	—	—	Doméstico

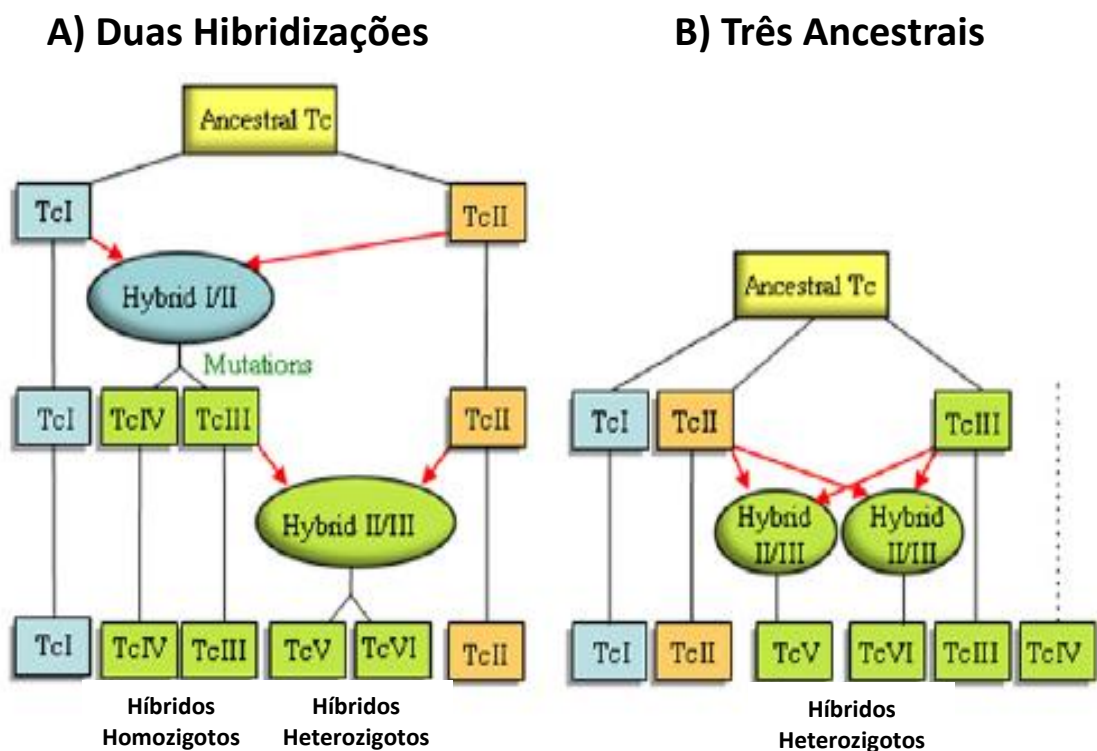
Legenda: ND (Não determinado). Fonte: Adaptado de Dutra et al. (2014)

Dentro do modelo de evolução clonal as “novas” DTU's envolvem um processo de acumulação de mutações discretas, não afetados por raros eventos de troca genética. Nessa abordagem, estudos têm investigado a genética das DTU's e foi identificado que a heterozigose, observada em isolados naturais de TcV e TcVI,

sugeriu que tais DTU's são híbridas e derivadas de TcII e TcIII (STURM et al., 2003; STURM; CAMPBELL, 2015) e já as DTU's TcI, TcII, TcIII e TcIV mostram homozigose alélica. Dessa forma enquanto o dogma da teoria clonal ainda explica o modo comum de expansão da população do *T. cruzi*, novos modelos incorporam eventos de hibridização para explicar a estrutura populacional existente que inclui as DTU's híbridas (WESTENBERGER et al., 2005; FREITAS et al., 2006; ZINGALES et al., 2012).

Os modelos de evolução clonal são “Modelo das duas hibridizações” (WESTENBERGER et al., 2005) e o “Modelo dos três ancestrais” (FREITAS et al., 2006), onde ambos incorporam dois eventos de hibridização. O “modelo das duas hibridizações” envolve uma mudança genética ancestral entre DTU's TcI e TcII, com a perda da heterozigose entre a progênie que produz TcIII e TcIV, seguido por uma segunda hibridização mais recente entre TcII e TcIII que produziu tanto TcV e TcVI, já o “modelo dos três ancestrais” postula que dois eventos de mudanças genéticas recentes entre TcII e TcIII produzem TcV e TcVI (Figura 4).

Figura 4. Comparação entre os modelos de “Duas Hibridizações” e “Três Ancestrais” no papel das mudanças genéticas durante a evolução clonal de *T. cruzi*.

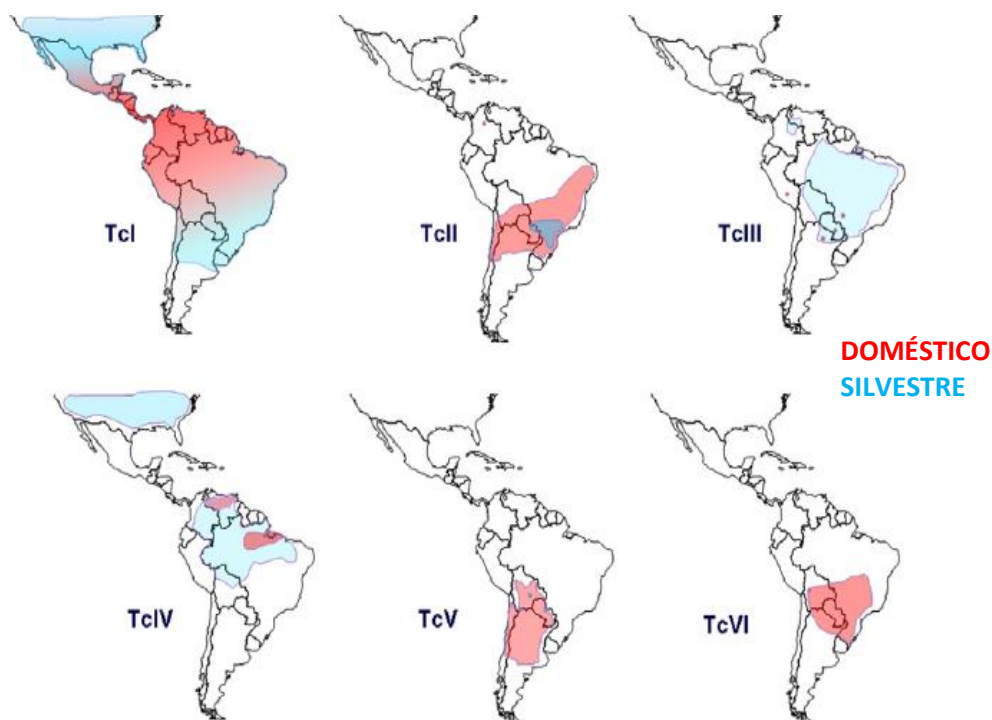


Fonte: Adaptado de Zingales et al. (2012).

Legenda: Retângulos indicam as DTU's distintas. Fusão de duas células e mudanças genéticas são indicadas por balões ovais, com contribuição parental indicada por setas vermelhas.

Em relação as 6 DTU's, todas são bem conhecidas por infectarem humanos e suas características biológicas e geográficas são divergentes (Figura 5). A TcI é a mais abundante e bem distribuída DTU nas Américas, podendo estar associada tanto a ciclos silvestres como domésticos e sua infecção em humanos está concentrada principalmente no norte da América do Sul e América Central, estando relacionada a cardiomiopatia chagásica (ZINGALES et al. 2012). A TcII é encontrada principalmente nas regiões centrais e no sul da América do Sul e em ciclos domésticos, sendo associada a manifestações cardíacas, concomitante as mega-síndromes, similarmente ao observado nas TcV e TcVI (LISBOA et al., 2007). A TcIII está relacionada principalmente aos ciclos silvestres, perfazendo poucos casos humanos e alguns casos agudos na Amazônia. Em contrapartida, apesar de a TcIV ser principalmente uma DTU de ciclo silvestre, é a causa secundária de DC na Venezuela (LLEWELLYN et al., 2009; MARCILI et al., 2009; YEO et al., 2005). As DTU's mais prevalentes no Brasil são a TcII, que tem como representante clássica a cepa Y, e a TcI sendo o exemplo clássico a CCol (ZINGALES et al. 2012).

Figura 5. Distribuição geográfica estimada das DTU's de *T. cruzi* em ciclos domésticos e silvestres.



Fonte: Adaptado de Zingales et al. (2012)

2.4.1 Cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*

A CCol foi isolada pela primeira vez de um caso humano na Colômbia, todavia em decorrência dos fluxos migratórios já é bem distribuída pela América Central e Sul (FEDERICI; ABELMANN; NEVA, 1964; ZINGALES et al., 2012). A parasitemia induzida pela CCol é de evolução lenta, com picos variando entre vigésimo e trigésimo dias de infecção, baixas taxas de mortalidade e nítido tropismo pela musculatura esquelética, desenvolvendo grandes lesões nas fibras musculares esqueléticas, intenso processo inflamatório e lesões miocárdicas (ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 2000).

Em modelo murino, demonstrou habilidade em invadir a mucosa gástrica e produzir uma infecção mais agressiva quando comparada a de outras cepas de *T. cruzi* (ANDRADE, 1990). Além disso, a CCol tem a característica marcante de ter resistência natural aos fármacos para o tratamento da DC, o Bz e o nifurtimox (ANDRADE et al., 1985; FILARDI; BRENNER, 1987). Camandaroba et al. (2003) ao avaliar a susceptibilidade à quimioterapia ao Bz de sete clones isolados da CCol em camundongos infectados, verificaram que a alta resistência demonstrada na cepa parental não foi atenuada nos clones, embora características biológicas, como a virulência, tenham sido discrepantes entre eles. A multiclonalidade das cepas de *T. cruzi* permite o isolamento de clones com diferentes graus de virulência, de cepas isoladas das mesmas áreas endêmicas e apresentando os mesmos perfis genéticos, biológicos e isoenzimáticos, como já foram demonstrados por Campos e Andrade (1996) com a cepa São Felipe e Camandaroba et al. (2001) com a cepa CCol.

Ao avaliar a influência da CCol na miocardite chagásica crônica de murinos, Pereira et al. (2014) observaram a presença de altos níveis de TNF e óxido nítrico no soro, estando diretamente associados com intenso infiltrado inflamatório difuso e focal, o que corroborou com o estudo de Guerreiro et al. (2015) ao demonstrar que sucessivas re-infecções com CCol agravam a cardiomiopatia chagásica. Duz et al. (2014) ao infectar cães com a cepa Y e CCol verificaram que o pico de parasitemia da CCol é mais tardio quando comparado a cepa Y, e esta apresenta uma resposta imune mais intensa durante a fase aguda da infecção se comparada a CCol. No entanto, Machado (2010) ao infectar duas linhagens de camundongos diferentes

(C57BL/6 e BALB-c) tanto com a cepa Y, como a CCol demonstraram que o maior comprometimento cardíaco dos camundongos BALB-c em comparação com o C57BL/6, provavelmente foi reflexo do desequilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo mais evidente na infecção com a CCol do que na cepa Y.

Magalhães et al. (2015) verificaram as características imunológicas encontradas em monócitos de indivíduos saudáveis infectados *in vitro* tanto pela CCol como pela cepa Y e demonstraram que as células infectadas com a CCol induzem uma alta ativação de monócitos concomitante a elevada produção de IL-10, já as células infectadas com a cepa Y tiveram baixa ativação de monócitos atrelado a um perfil inflamatório intenso. Todavia, as características imunológicas das células mononucleares do sangue periférico ainda não foram avaliadas após o tratamento com o Bz quando infectadas com a CCol, que têm resistência ao fármaco.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta aproximadamente 3 milhões de indivíduos portadores da DC, e o estado de Pernambuco, que é uma área endêmica da doença, trata cerca de 2000 pacientes em fluxo contínuo no ambulatório especializado em cardiopatia chagásica do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE). O uso do fármaco Bz indicado para o tratamento da doença, em pacientes crônicos ainda é controverso, e sua utilização pode ter a finalidade de prevenir ou retardar a evolução da doença para formas clínicas mais graves. Estudos experimentais e clínicos que avaliaram a evolução da doença em pacientes crônicos demonstraram que o uso do Bz em pacientes cronicamente infectados é de grande importância para a sobrevivência do paciente, entretanto as consequências das manifestações imunológicas do tratamento no paciente ainda não foram totalmente elucidadas.

Diante disso, nosso grupo de pesquisa avaliou a ação do Bz frente às células imunes de pacientes crônicos infectadas por cepa Y de *T. cruzi*, e a produção de citocinas, quimiocinas e a expressão de marcadores de superfície. Em nosso grupo de estudo, identificamos resultados que sustentam a hipótese do Bz ser uma ferramenta essencial para uma resposta inflamatória controlada na fase crônica da doença. Entretanto, devido aos fluxos migratórios, a disseminação de um grupo heterogêneo de cepas que são potencialmente patogênicas e resistentes ao tratamento por Bz vêm ocorrendo.

Uma vez que a eficácia do Bz pode ser alterada por vários fatores, dentre eles a cepa de *T. cruzi* que infectou o paciente e o seu status imunológico, é relevante conhecer que tipo de modulação o Bz provoca na resposta imune de pacientes infectados com cepas resistentes, com a finalidade de fornecer maior entendimento acerca dessa falha terapêutica. Além disso, os nossos resultados podem auxiliar os estudos de desenvolvimento de novas drogas que desempenhem um esquema terapêutico mais eficiente, com menos efeitos colaterais e que auxiliem na qualidade de vida desses pacientes por prevenir os danos causados nos tecidos como coração e trato gastrointestinal.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe diferença na expressão de moléculas de ativação e inibição celular, e nos níveis de citocinas produzidas pelas células infectadas *in vitro* pela CCol de *T. cruzi* tratadas com o Bz com as que não receberam esse tratamento?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do Bz sobre as células mononucleares quanto a ativação/inibição e produção de citocinas após exposição a uma cepa do *T. cruzi* resistente ao Bz.

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF) no sobrenadante do cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), expostas a uma cepa de *T. cruzi* resistente ao Bz, após adição do tratamento;
- b) Avaliar a expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ oriundos do co-cultivo de PBMC, expostos a uma cepa do *T. cruzi* resistente ao Bz, após a adição do tratamento;
- c) Avaliar a expressão das moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ oriundos do co-cultivo de PBMC, expostos a uma cepa do *T. cruzi* resistente ao Bz, após a adição do tratamento;

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultivo de Células Vero para manutenção de tripomastigotas de *T. cruzi*

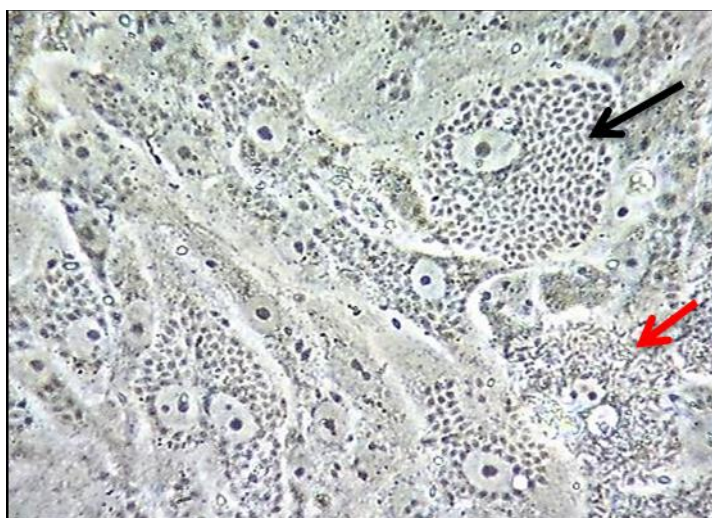
Células Vero criopreservadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10% e 1% de penicilina/ estreptomicina (RPMI 1640 completo) e contendo DMSO (Sigma) a 20% foram descongeladas em banho-maria, ressuspensas em 5mL de RPMI 1640 completo e centrifugadas a 400 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células, ressuspensado em meio RPMI 1640 completo. A suspensão celular foi cultivada em garrafas de cultura de 25 cm² e/ou 75 cm², contendo meio RPMI 1640 completo e incubada (37° C / 5% CO₂) até confluência total das células. Para a realização do repique das células Vero, utilizamos uma solução de tripsina/EDTA a 2%, que auxilia na remoção das células, posteriormente as células removidas foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo e, em seguida foram transferidas para outras garrafas de cultivo contendo meio RPMI 1640 completo e incubadas.

6.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas da CCol de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas *T. cruzi* (CCol) criopreservadas (10⁷ tripomastigotas/ml) foram descongeladas em banho-maria a 37°C, e lavadas por centrifugação (400 x g por 10 minutos a 22°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado com meio RPMI 1640 completo. A suspensão foi distribuída em garrafas de cultura contendo células Vero e incubada por 24 horas em estufa (37° C / 5% CO₂) para interiorização dos tripomastigotas. Ao fim da incubação, o sobrenadante foi retirado e as células Vero foram lavadas com meio de cultivo para remoção dos parasitas que não infectaram as células. Em seguida, o meio RPMI 1640 completo foi adicionado às garrafas de cultura que foram incubadas por 7 a 10 dias. Diariamente, as culturas foram observadas no microscópio invertido e realizamos a manutenção das formas tripomastigotas para utilizá-las nos ensaios de cultivo celular. Ao se interiorizarem nas células Vero, as formas tripomastigotas evoluem para a forma amastigota como

representado pela figura 8 (seta preta), e à medida que vão se multiplicando, transformam-se em tripomastigotas e rompem as células Vero (Fig. 8 - seta vermelha), ficando livres no meio de cultura para infectarem novas células. O meio de cultura contendo formas tripomastigotas é coletado e centrifugado (2555 x g por 10 minutos a 20°C), o sobrenadante é descartado e o precipitado é contado com *Trypan Blue* em câmara de Neubauer, a fim de verificar a viabilidade celular dos tripomastigotas para o ensaio de co-cultivo.

Figura 6. Célula Vero infectada com a CCol de *T.cruzi*.



Fonte: A autora.

Legenda : Seta preta – Formas amastigotas da CCol;

Seta vermelha – Formas tripomastigotas da CCol.

Aumento: 40x

6.3 Seleção de indivíduos e coleta de sangue

Foram selecionados indivíduos não infectados (n=11) que apresentassem sorologia não reagente para a infecção pelo *T. cruzi*. Foram utilizados como critério de exclusão: ser menor de 18 anos, ter recebido transfusão sanguínea, residir em área endêmica para a DC e ter sorologia reagente para DC. O sangue foi coletado através do sistema à vácuo, em tubos contendo heparina sódica para obtenção das células mononucleares e utilização nos ensaios de cultivo celular e tubos seco para realização da sorologia da DC. Os testes sorológicos foram realizados pelo Serviço de Referência em Doença de Chagas do IAM/ Fiocruz-PE, conforme

recomendações do Ministério da Saúde (DIAS et al. 2015). As abordagens utilizadas neste estudo têm aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/ Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190) (Anexo A). Todos os indivíduos participantes responderam a um formulário de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

6.4 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

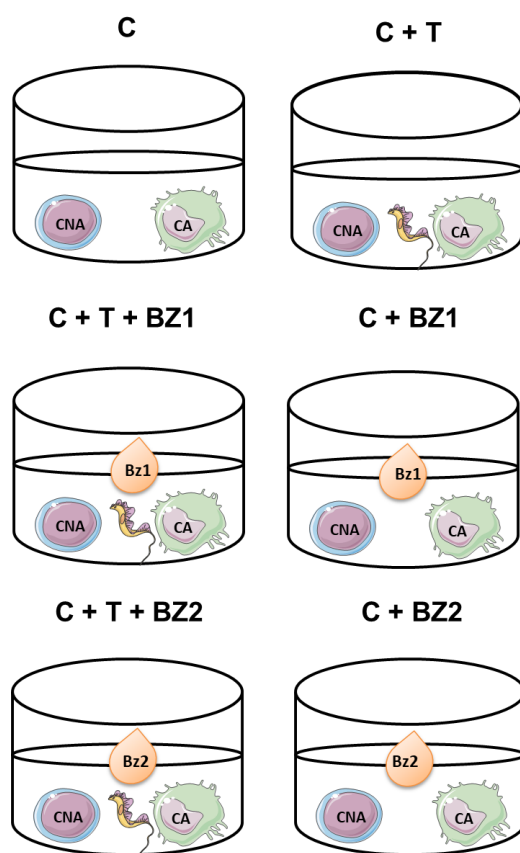
O isolamento das PBMC foi realizado através de centrifugação do sangue em gradiente de densidade. O sangue coletado foi adicionado a tubos Falcon de 50ml, seguido da adição da solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril. Essa solução foi adicionada a tubos de polipropileno (50 ml) contendo 10ml de Ficoll-Hypaque PLUSTM, sendo o sangue adicionado sobre o Ficoll de forma inclinada com um ângulo aproximado de 45° para criar uma separação entre o Ficoll-Paque PLUSTM e o sangue (1:2 sangue/PBS e Ficoll). Após a centrifugação a 900 x g por 30 minutos a 25 °C, o anel de PBMC foi removido e colocado em tubos de polipropileno (15 ml). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. Posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan em uma diluição de 1:10. O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10⁶ células/mL.

6.5 Co-cultivo de PBMC, Tripomastigota da CCol de *T. cruzi* e adição de tratamento com Bz

As culturas de PBMC foram realizadas em placas de 48 poços de poliestireno, durante tempo de cultivo de 24h, 5 dias e 10 dias estabelecidos por realização de cinética (tempo x resposta) (ver apêndice C). Para adesão das células aderentes (monócitos) PBMC foram adicionadas aos poços da placa na concentração de 1 x 10⁶ células/mL. As placas foram levadas à estufa durante 1h, homogeneizando delicadamente, a cada 30 minutos. Após a adesão, as células não aderentes (linfócitos) são retiradas de cada poço e guardadas em tubos falcon de 15 ml na estufa (37° C / 5% CO₂). Neste momento, os monócitos foram infectados pelas formas tripomastigotas da CCol na relação 10 parasitos por monócito, na

concentração de $2,5 \times 10^5$ por poço, em meio RPMI 1640 completo. A preparação foi incubada (37°C / $5\% \text{CO}_2$) por mais 2h para interiorização das formas tripomastigotas. Os parasitas que não conseguiram interiorizar nos monócitos foram removidos por lavagem, e os linfócitos foram readicionados. Subsequente a isso os tratamentos foram adicionados aos respectivos poços (Bz na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ e $2 \mu\text{g/mL}$). Este estudo teve controles para a comparação com o co-cultivo (células aderentes - monócitos, não aderentes - linfócitos, tripomastigotas e o Bz), conforme observado na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemático das condições de co-cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: C – Células; CNA – Células não-aderentes; CA – Células aderentes; T – Tripomastigota; BZ1 – benzonidazol na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ BZ2 – benzonidazol na concentração de $2 \mu\text{g/mL}$.

6.6 Coleta do sobrenadante e armazenamento

Os sobrenadantes de cultura foram coletados após os tempos de cultivo estudados, e estocados imediatamente a -20°C para utilização em ensaios de CBA (cytometric bead array-BD Biosciences, EUA).

6.7 Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura do co-cultivo de PBMC, Tripomastigota da CCol de *T. cruzi* e adição de tratamento com Bz

. O CBA foi utilizado para a mensuração quantitativa das citocinas, conforme recomendado pelo fabricante. Resumidamente, esta técnica emprega uma mistura de esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para a detecção de citocinas humanas detectadas no canal FL2.

Assim, 22 µL da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF para citocinas foram adicionadas em tubos poliestireno (BD Systems™- 5mL) . Em seguida 22 µL do sobrenadante de cultura e 22 uL do reagente de detecção foram adicionados e em todos os tubos. Após essa etapa, as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 300 µL de solução tampão (*Wash Buffer*) foram adicionados para ressuspender as esferas. Os tubos foram homogeneizados por vórtex e 1800 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas NPT/IAM/Fiocruz utilizando o CellQuestPro (Beckton Dickson) e analisadas no software FCAP 3.1.

6.8 Imunofenotipagem de linfócitos e monócitos oriundos do co-cultivo entre PBMC, Tripomastigota da CCol de *T. cruzi* e adição de tratamento com Bz

Após 24h de co-cultivo os linfócitos e monócitos foram removidos das placas de 48 poços através de vigorosas lavagens com PBS Wash gelado (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™), e as células removidas, foram transferidas para tubos de citometria onde foram centrifugados a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os anticorpos monoclonais foram adicionados (Tabela 2), os tubos contendo as células foram incubados por 30 minutos a TA, e ao abrigo da luz. Após a incubação, PBS-Wash foi adicionado e uma centrifugação (400 x g por 5 min a TA) foi realizada. O

sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 150 µL de BD Cytfix™ (BD Biosciences®), por um período de 15 min, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-Wash por centrifugação (400 x g por 5 min a TA). O pellet de células foi ressuspensionado com 300 µL de PBS-Wash e os tubos foram estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickinson).

Tabela 2. Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD4	S3.5	Mouse IgG2a	PerCP
CD8	3B5	Mouse IgG2a	FITC
CD28	10F3	Mouse IgG1	PE
CTLA-4/ CD152	BN13	Mouse IgG2a	APC
CD14	TüK4	Mouse IgG2a	FITC
HLA-DR	Tü36	Mouse IgG2b	PerCP
CD80	MEM-233	Mouse IgG1	PE
CD86	BU63	Mouse IgG1	APC

Fonte: A autora

Legenda: CD: *Cluster of differentiation*; CTLA-4: Antígeno de linfócito T citotóxico 4; HLA-DR: Antígeno leucocitário humano; APC: Alococianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Peridinin chlorophyll protein complex.

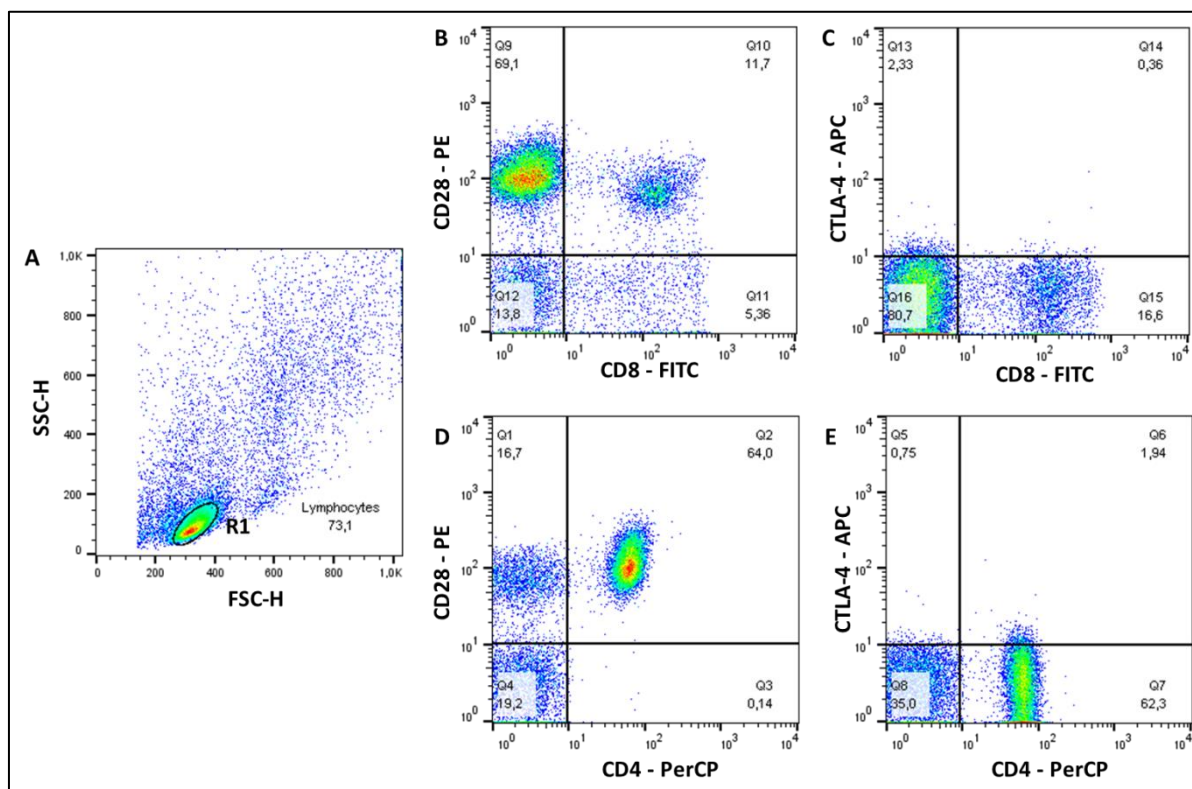
6.9 Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos no citômetro de fluxo

A aquisição e análise das amostras foi realizada na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz. Através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) onde podemos avaliar o tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulosidade das células (Side Scatter-SSC), além das fluorescências tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4). As aquisições e análises no citômetro de fluxo obedeceram às Normas de Boas Práticas de Laboratório instituídas no IAM/Fiocruz pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS/ Fiocruz).

A figura 8 ilustra a sequência de etapas para a análise dos linfócitos T. A população de linfócitos foi selecionada através de dot plot FSC versus SSC, sendo adquiridos 20.000 eventos dentro da janela R1 (Fig. 8A). Após a seleção da janela de interesse (R1) as subpopulações de linfócitos foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência através do software FlowJo®, onde foi possível estabelecer as modalidades FL1 (CD8/FITC) *versus* FL2 (CD28/PE) ou FL4 (CTLA-4/APC) (Fig. 8B e 8C) e, FL3 (CD4/PerCP) *versus* FL2 (CD28/PE) ou FL4 (CTLA-4/APC) (Fig. 8D e 8E).

A população de monócitos foi selecionada através de dot plot SSC-H versus FL1, sendo adquiridos 1000 eventos dentro da janela de interesse (R2) (Fig. 9A). Após a seleção de R2, os monócitos CD14/FL1, bem como as moléculas foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência através do software FlowJo®. Foi possível estabelecer as modalidades FL1 (CD14/FITC) *versus* FL2 (CD80/PE) (Fig. 9B), FL1 (CD14/FITC) *versus* FL3 (HLA-DR/PerCP) (Fig. 9C) e FL1 (CD14/FITC) *versus* (CD86/APC) (Fig. 9D).

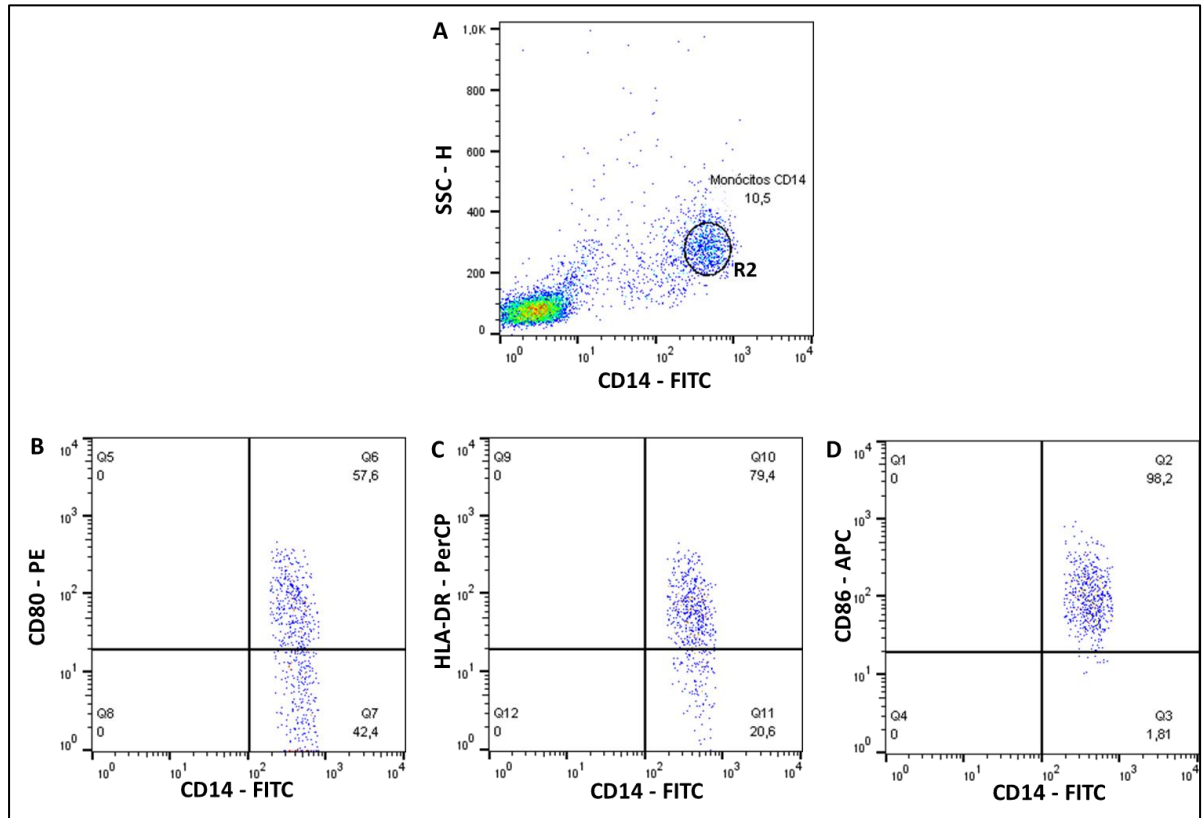
Figura 8. Estratégica de aquisição e análise de linfócitos.



Fonte: A autora a partir do software FlowJo®

Legenda: A – Dot plot da população de linfócitos selecionada para a análise; B – Gráfico bidimensional CD8/FITC por CD28/PE; C– Gráfico bidimensional CD8/FITC por CTLA-4/APC; D – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CD28/PE; E – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CTLA-4/APC.

Figura 9. Estratégia de aquisição de análise de monócitos

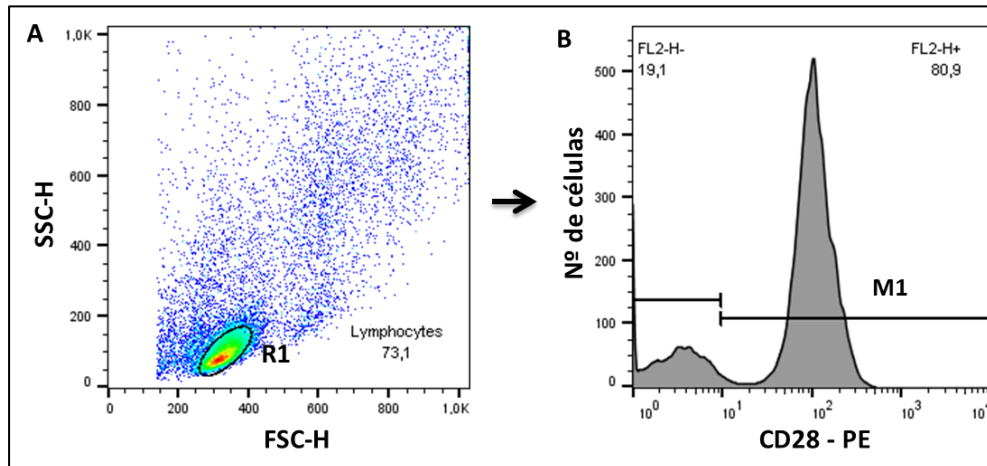


Fonte: A autora a partir do software FlowJo®.

Legenda: A – Dot plot da população de monócitos selecionada para a análise; B – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD80/PE; C– Gráfico bidimensional CD14/FITC por HLA-DR/PerCP; D – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD86/APC.

A média da intensidade de fluorescência (MIF) foi obtida através da seleção dos *gates* de linfócitos e monócitos, onde a fluorescência de cada fluorocromo ligado foi representada graficamente em histograma de parâmetro único (Número de células x Fluorocromo). A região M1 foi estabelecida para determinar a MIF de cada molécula (Fig.10).

Figura 10. Exemplo de aquisição e análise da média de intensidade de fluorescência (MIF)



Legenda: A - Dot plot da população de linfócitos selecionada para a análise (R1). B- Histograma representativo da MIF da molécula CD28 ligada ao fluorocromo PE.

6.10 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados através da comparação entre as condições de cultivo. As análises estatísticas dos dados da produção de citocinas no sobrenadante de cultura e frequência das moléculas de superfície, bem como MIF, em linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e monócitos $CD14^+$ foram realizadas através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que assumiram distribuição normal foram analisados através do teste t pareado, e os que não assumiram distribuição normal foram analisados através do teste de Wilcoxon. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

Artigo que será submetido à Revista *Parasite Immunology*: O tratamento *in vitro* com benzonidazol modula negativamente a resposta celular após infecção com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi*

Introdução

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, afetando milhares de pessoas ao redor do mundo.^{1,2} Há uma grande diversidade genética e bioquímica de cepas do parasita, que pode estar relacionada com as diferentes formas clínicas e manifestações imunológicas dos pacientes portadores da DC.³ As cepas de *T. cruzi* são classificadas atualmente em 6 DTU's (*Discrete Typing Units*), essas unidades agrupam um conjunto de cepas geneticamente semelhantes entre si, e que podem ser identificados por marcadores genéticos, moleculares e imunológicos.^{4,5} As DTU's mais prevalentes no Brasil são a TcII, que tem como representante clássica a cepa Y, e a TcI sendo o exemplo clássico a cepa colombiana (CCol).^{3,6} Todavia, em decorrência das diversas mutações genéticas relacionadas ao parasita e dos intensos fluxos migratórios, outras DTU's e perfis mistos também podem circular pelo país.^{3,7}

A CCol, foi isolada pela primeira vez de um caso humano na Colômbia, e apresenta ciclo evolutivo lento, alcançando pico de parasitemia, em modelo murino, entre o vigésimo e o trigésimo dia, têm tropismo pela musculatura esquelética, induz intenso processo inflamatório e lesões miocárdicas.^{8,9} A característica mais marcante da CCol é a resistência natural ao principal fármaco de tratamento disponível para a DC no Brasil, o benzonidazol (Bz).^{10,11}

O Bz é utilizado há mais de 40 anos no tratamento da DC no Brasil, entretanto pouco se sabe sobre a farmacocinética, dinâmica e efeitos imunológicos no hospedeiro infectado, além disso, há graves efeitos colaterais e controvérsias na utilização do fármaco na fase crônica da doença.¹²⁻¹⁵ A eficácia do Bz também pode ser alterada pela dose, idade, origem geográfica do paciente e infecção por cepas resistentes ao fármaco. Acredita-se que o sucesso do tratamento dê-se quando ocorre um sinergismo da resposta imunológica do indivíduo e ação farmacológica do Bz.^{16,17} Diante disso, nosso estudo propôs avaliar as manifestações imunológicas

decorrentes da infecção *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com a CCol de *T. cruzi*, e adição do tratamento com Bz.

Materiais e Métodos

População de estudo – O sangue periférico de 11 indivíduos voluntários foi coletado em tubos de coleta á vácuo (Vacutainer®) contendo heparina sódica para obtenção das células mononucleares e utilização nos ensaios de cultivo celular e tubos seco para realização da sorologia da DC. Nosso estudo teve como critérios de exclusão residir em área endêmica, ter recebido transfusão sanguínea, ser menor de 18 anos e apresentar sorologia positiva para a DC.

Parasitas – Formas tripomastigotas da CCol mantidas congeladas a -80°C em nosso laboratório, foram descongeladas e utilizadas para infecção de células Vero cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma™) suplementado (10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza) (meio completo) por 24 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Ao fim da incubação, o sobrenadante foi retirado para remoção dos parasitas que não infectaram as células. Em seguida, foi adicionado meio RPMI 1640 (Sigma™) completo e as culturas incubadas por 7 a 10 dias. Diariamente, as culturas foram observadas no microscópio e realizamos a manutenção das formas tripomastigotas para utilizá-las nos ensaios de cultivo celular. Após a ruptura das células Vero, os tripomastigotas livres no meio de cultura foram coletados, centrifugados (2555 x g por 10 minutos a 20°C), e o precipitado foi contado com Azul de Trypan (Sigma™) para observar a viabilidade celular dos tripomastigotas que seriam utilizados no co-cultivo.

Isolamento das PBMC – Após a coleta de sangue em tubos contendo heparina sódica utilizando o sistema a vácuo (Vacutainer®), o sangue foi distribuído em tubos de polipropileno (BD Falcon™ - 50 mL) seguido da adição da solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril. Essa solução foi adicionada a tubos de polipropileno (BD Falcon™ - 50 mL) contendo Ficoll-Hypaque PLUS™ (Amersham Biosciences). As células foram separadas por centrifugação durante 30 minutos a 900 x g 20°C em gradiente de densidade, e o anel de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) formado entre a interface do Ficoll e o plasma foi

coletado. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma™) completo. Em seguida, as PBMC foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan (Sigma™) e ajustadas para a concentração desejada de 10^6 células/mL.

Co-cultivo entre PBMC, CCol de *T. cruzi* e adição do tratamento com Bz – Para definir os melhores tempos de co-cultivo na dosagem de citocinas realizamos uma cinética tempo x resposta (ver apêndice 2), onde os tempos de 24h, 5d e 10d foram os escolhidos para o cultivo. Em placas de 48 poços de poliestireno, 1mL de PBMC (células aderentes e não aderentes) foram adicionadas na concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (Sigma™) completo, e incubadas durante 1h para a adesão das células aderentes/ monócitos (37°C / 5% CO_2). Após a incubação, as células não aderentes/ linfócitos foram removidas por lavagem e armazenadas na estufa a 37°C e 5% CO_2 . Após isso, as células aderentes/ monócitos foram infectados pelas formas tripomastigotas da CCol na relação de 10 parasitas por monócito, em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ por poço, em meio RPMI 1640 (Sigma™) completo. A preparação foi incubada (37°C e 5% CO_2) por 2h para interiorização dos parasitos. Após a incubação, os parasitas que não conseguiram se interiorizar foram removidos por lavagem, os linfócitos foram readicionados nos poços e foi adicionado o tratamento com Bz na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$. Após o tempo de co-cultivo, o sobrenadante de cultura foi coletado e imediatamente estocado a -20°C para as dosagens posteriores.

Deteção dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura por CBA – Os níveis de citocinas foram mensurados no sobrenadante de cultura do co-cultivo através do sistema Cytometric Bead Array (CBA – BD Biosciences), seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante. Primeiramente, 22 μL da mistura de beads de captura, marcadas com anticorpos monoclonais (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF) com diferentes intensidades de fluorescências são adicionadas em tubos de poliestireno (BD Systems™- 5mL), em seguida foi adicionado 22 μL do sobrenadante de cultura e 22 μL do reagente de detecção. Após essa etapa, as amostras foram incubadas por 3 horas a temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 mL da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200 g por 5 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 300 μL de solução tampão (*Wash Buffer*) para

ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz, através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry Systems), com o software CellQuestPro (Beckton Dickson) e analisadas no software FCAP 3.1.

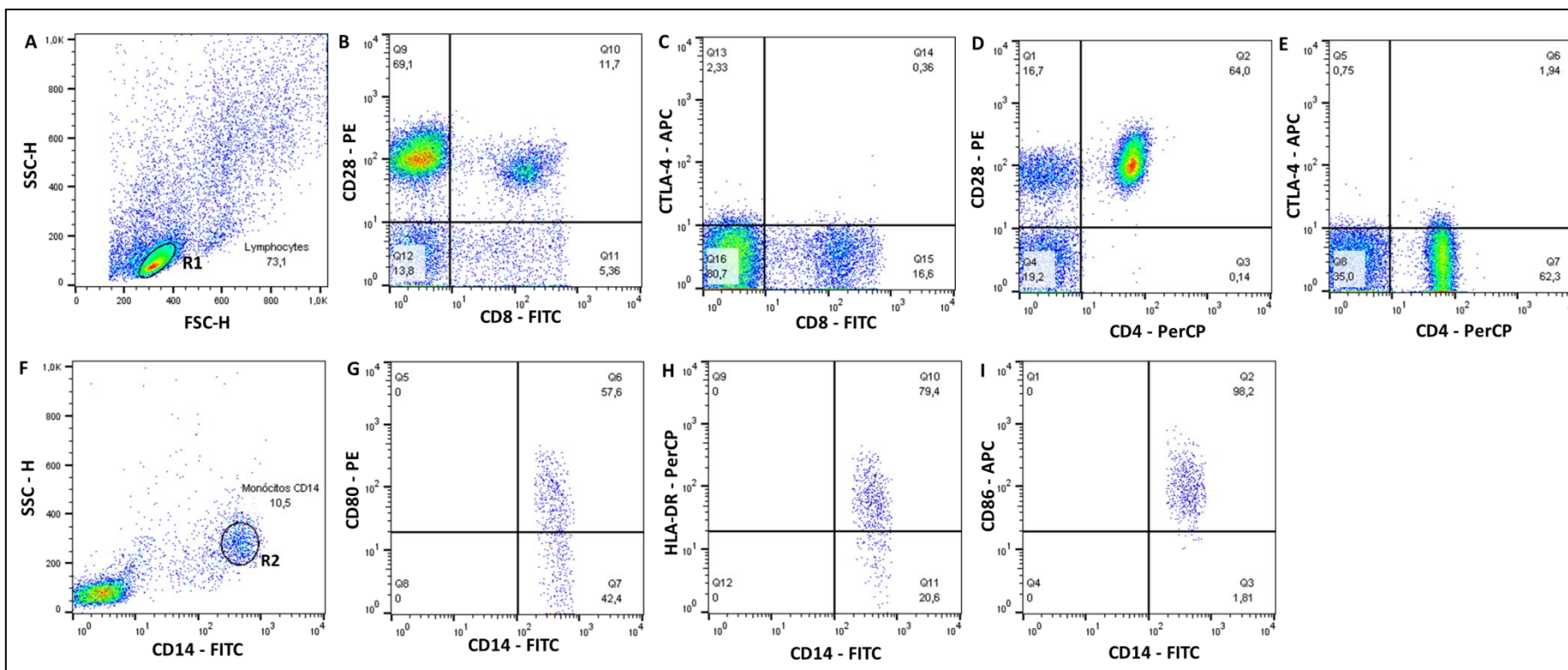
Imunofenotipagem para moléculas de superfície em linfócitos e monócitos do co-cultivo entre PBMC, CCol de *T. cruzi* e adição do tratamento com Bz – Após 24h do co-cultivo, as células foram removidas utilizando PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% e azida sódica a 1%) gelado. Depois de retiradas, as células foram colocadas em tubos de poliestireno (BD Systems™- 5mL) e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os anticorpos monoclonais adicionados, sendo eles: CD4/ PerCP (1.5 µL - Invitrogen), CD8/ FITC (1.5 µL - Invitrogen), CD28/ PE (1.5 µL - Invitrogen) e CTLA-4/ APC (10 µL - Invitrogen) para linfócitos, e CD14/ FITC (2.5 µL - Invitrogen), CD80/ PE (1.5 µL - Invitrogen), CD86/ APC (1.5 µL - Invitrogen), HLA-DR/ PerCP (2.5 µL - Invitrogen) para os monócitos, sendo incubados por 30 minutos a TA, e ao abrigo da luz. Após a incubação, uma centrifugação (400 x g por 5 min a TA) foi realizada e o sobrenadante descartado. Após, as células foram fixadas com 150 µL de BD Cytotfix™ (BD Biosciences®), por um período de 15 min, a 4°C. Subsequente, foi realizada uma última centrifugação (400 x g por 5 min a TA), e novamente foi descartado o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 300 µL de PBS-Wash aos tubos e os mesmos foram estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Aquisição e análise de linfócitos e monócitos no citômetro de fluxo - foi realizada na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/IAM/Fiocruz. A população de linfócitos foi selecionada através de dot plot FSC versus SSC, sendo adquiridos 20.000 eventos dentro da janela R1 de linfócitos e os monócitos foram selecionados através de FCS versus FL1, sendo adquiridos 1000 eventos dentro da janela R2. Após a seleção da janela de interesse (R1) e (R2), os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e monócitos CD14⁺, bem como as moléculas foram analisados pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência através do software FlowJo® (Ver figura 1).

Análises estatísticas - Os resultados foram avaliados através da comparação entre as condições de cultivo. As análises estatísticas dos dados da produção de citocinas no sobrenadante de cultura e frequência das moléculas de superfície, bem como MIF, em linfócitos T CD4, CD8 e monócitos CD14 foram realizadas através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov- Smirnov. As condições que assumiram distribuição normal no teste de normalidade foram analisadas através do teste *t* pareado, e as que não assumiram distribuição normal foram analisados através do teste de Wilcoxon. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

Considerações éticas – As abordagens utilizadas no estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/Fiocruz (CAEE:07511612.2.0000.5190). Todos os indivíduos participantes responderam a um formulário de pesquisa e assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Figura 1- Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos.



Legenda: A – Dot plot da população de linfócitos selecionada para a análise; B – Gráfico bidimensional CD8/FITC por CD28/PE; C– Gráfico bidimensional CD8/FITC por CTLA-4/APC; D – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CD28/PE; E – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CTLA-4/APC; F – Dot plot da população de monócitos selecionada para a análise; G – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD80/PE; H– Gráfico bidimensional CD14/FITC por HLA-DR/PerCP; I – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD86/APC.

Resultados

Detecção das citocinas no sobrenadante de cultura

Nossos resultados mostram que nas condições experimentais onde as células foram infectadas com a CCol de *T. cruzi* verificamos uma maior produção de citocinas se comparadas as condições de cultivo não infectadas. Verificamos uma produção estatisticamente maior de IFN- γ no tempo de 24h, na condição experimental C+T+BZ1, se comparada a condição C+T+BZ2 (Fig. 2A). Ademais, foi observado que a condição C+BZ2 produziu menos IFN- γ que a condição C, no tempo de 5d (Fig. 2D).

Ao observarmos as dosagens de TNF, notamos que em 24h a produção foi discretamente maior nas condições experimentais infectadas com o *T. cruzi* (Fig. 2B), em contrapartida, a partir dos tempos de 5d e 10d ocorre um decaimento da produção de TNF nas condições infectadas com o *T. cruzi*, se comparado aos controles observados sem a infecção (Fig 2E, 2H).

Na dosagem da citocina IL-10, as condições experimentais infectadas pela CCol (C+T; C+T+BZ1 e C+T+BZ2) apresentam uma maior produção de IL-10 nos tempos de 24h, 5d e 10d, se comparadas aos controles não infectados C e C+BZ1 (Fig. 2C, 2F, 2I). Além disso, apesar de não ter diferença estatística, as medianas da condição experimental C+T+BZ2, em todos os tempos avaliados, são discretamente superiores as das condições de cultivo infectadas com a CCol.

De modo geral, na dosagem de IL-6 (Fig. 3A, 3D, 3G) foi demonstrado uma maior produção da citocina nas condições experimentais infectadas com a forma tripomastigota da CCol (C+T, C+T+BZ1, C+T+BZ2) se comparada as condições não infectadas (C, C+BZ1 e C+BZ2) em todos os tempos avaliados. No entanto, apesar de não ter apresentado diferença estatística, a produção de IL-6 na condição C+T+BZ2 foi discretamente menor que nas demais condições de cultivo infectadas pela CCol.

Figura 2- Detecção da produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes, obtidas do co-cultivo entre PBMC, infecção pela CCol de *T. cruzi* e tratamento com Bz

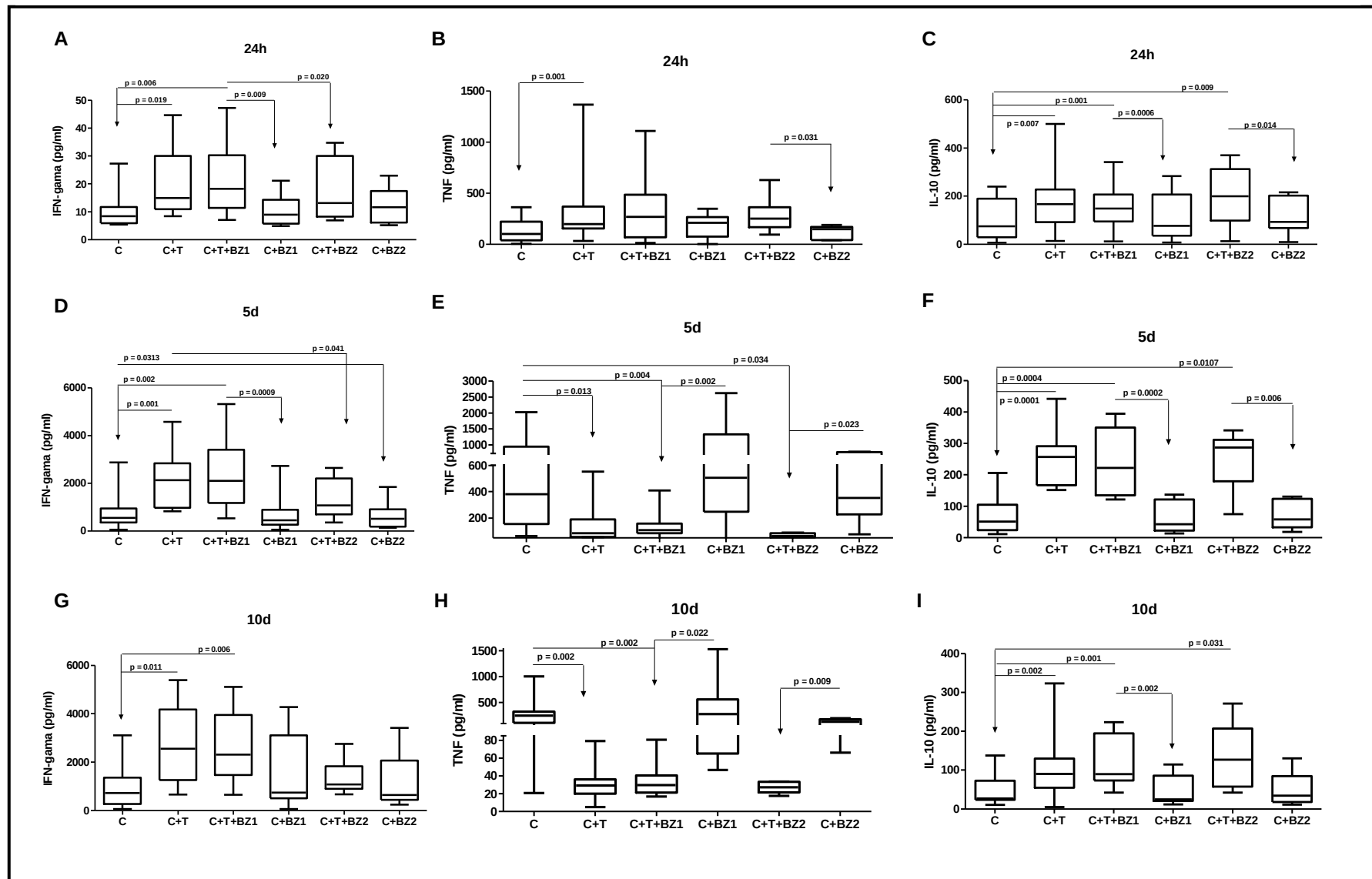
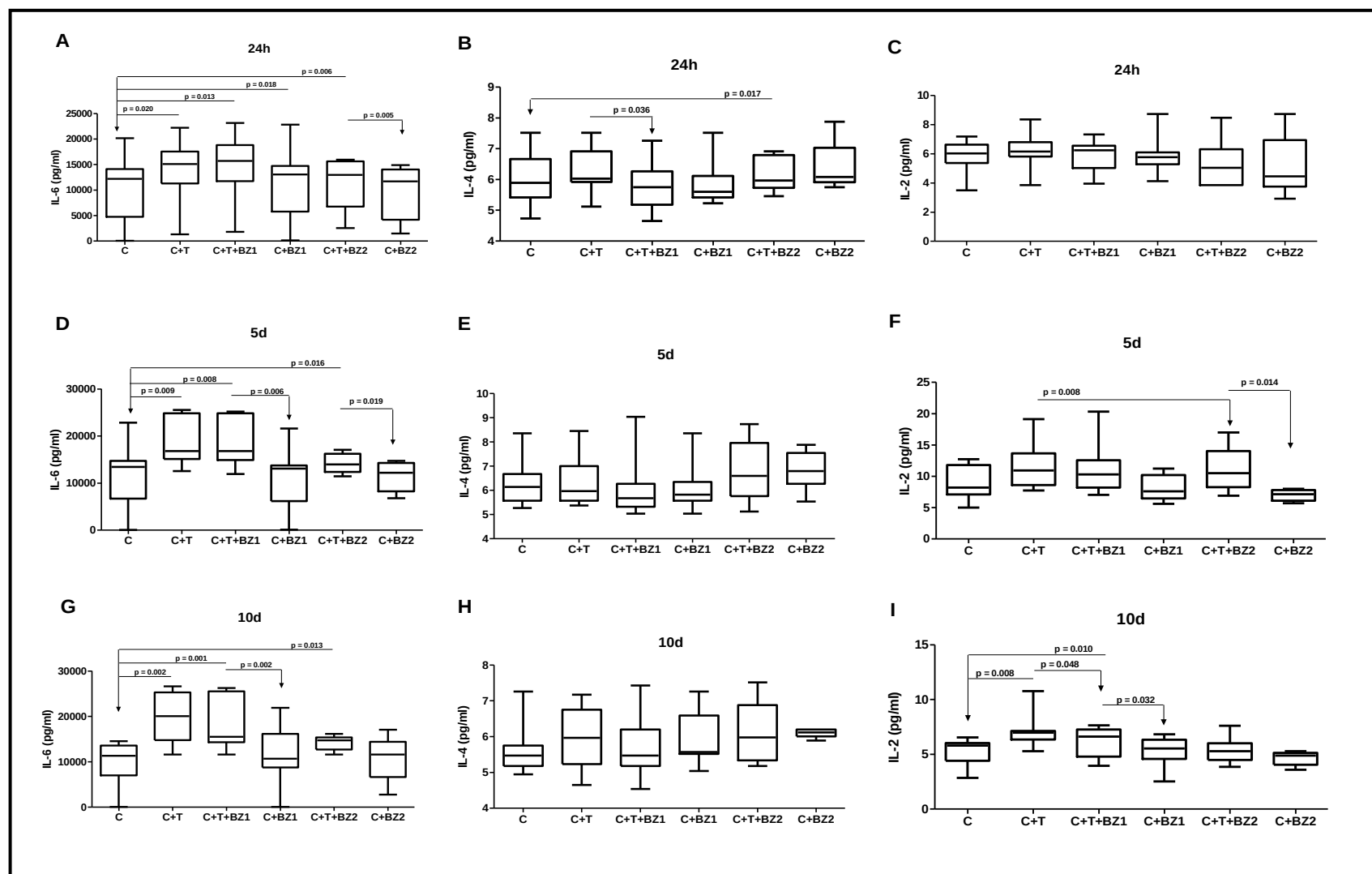


Figura 3- Detecção da produção das citocinas IL-6, IL-4 e IL-2, no sobrenadante de cultura de células aderentes e não aderentes, obtidas do co-cultivo entre PBMC, infecção pela CCol de *T. cruzi* e tratamento com Bz



Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ1 – Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 1µg/mL; C+BZ1 – Célula + Benzonidazol 1µg/mL; C+T+BZ2 - Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 2µg/mL; C+BZ2 – Célula + Benzonidazol 2µg/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

A detecção da IL-4 se apresentou de maneira semelhante nas condições de cultivo observadas (Fig. 3B, 3E e 3H), exceto no tempo de 24h onde a produção de IL-4, na condição experimental C+T, foi estatisticamente maior que na condição C+T+BZ1 (Fig. 3B). Ademais, apesar de não ter apresentado diferença estatística, a mediana da produção de IL-4 nos tempos de 5d e 10d (Fig. 3E, 3H), na condição experimental C+T foi maior que na condição C+T+BZ1, no entanto foi similar a da condição C+T+BZ2.

As dosagens da citocina IL-2 no tempo de 24h (Fig. 3C) apresentaram similaridade entre as condições de cultivo. Em contrapartida, no tempo de 5d e 10d (Fig. 3F e 3I) uma maior produção de IL-2 nas condições experimentais infectadas com a CCol de *T. cruzi* foi verificada quando comparadas às condições sem infecção. Além disso, foi observado que a condição experimental C+T produziu uma quantidade de IL-2 estatisticamente superior que as condições C+T+B1 e C+T+BZ2 nos tempos 5 dias e 10d.

Avaliação da expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Ao avaliarmos a expressão das moléculas CD28⁺ em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi demonstrado que a expressão de tais moléculas se comportou de maneira similar em todas as condições de cultivo observadas, no tempo de 24h (Tabela 1). Quanto à expressão de moléculas CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no tempo de 24h, foi observado que a maior expressão ocorreu na condição de cultivo C+T+BZ1, em ambas as populações celulares. Todavia, o mesmo não ocorreu para CD4⁺ nas condições de cultivo que apresentaram o Bz na concentração de 2 µg/mL (BZ2), onde foi observado uma discreta diminuição da expressão de CTLA-4, se comparada às demais condições de cultivo (Tabela 1). Os dados obtidos pela média de intensidade de fluorescência (MIF) demonstraram que nas condições experimentais C+T, seguido por C+T+BZ1 e C+T+BZ2 ocorre maior número de células T CD4⁺, todavia a presença de células T CD8⁺ foi maior na condição C+T+BZ2. Além disso, a MIF de CD28⁺ demonstrou que essa molécula é mais expressa nas condições C+T, C+T+BZ1 e C+BZ1, se comparada às demais condições de cultivo, mas nenhuma diferença estatística foi observada.

Concordando com a análise das células duplo marcadas, o maior número de moléculas CTLA-4⁺ expressas deu-se na condição C+T+BZ1.

Avaliação da expressão de moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺

Ao avaliarmos a média da expressão de moléculas CD80⁺ em monócitos CD14⁺ observamos que a maior expressão dessa molécula co-estimulatória foi na condição C+T+BZ1, seguida por C+T, mas sem diferença estatística. Além disso, ocorreu uma discreta diminuição das médias de C+BZ1 e C+BZ2 se comparada a condição de cultivo C (Tabela 2), mas sem apresentar diferença significativa. A expressão de moléculas CD86⁺ em linfócitos CD14⁺ ocorreu de maneira similar em todas as condições de cultivo, exceto pela discreta diminuição de C+T+BZ1 em relação as demais condições de cultivo avaliadas (Tabela 2).

A expressão de moléculas HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ foi maior na condição experimental C+T, sendo estatisticamente significativo se comparada à condição C (p= 0.041), o fenômeno se repetiu quando avaliamos a MIF dos monócitos CD14⁺HLA-DR⁺, entretanto apesar de não ter diferença estatística a expressão de HLA-DR⁺ também aconteceu de maneira expressiva na condição C+T+BZ2 quando comparada às demais condições de cultivo (Tabela 2).

Tabela 1. Medianas da expressão e da média de intensidade de fluorescência de moléculas de superfície em linfócitos.

Marcações	C	C+T	C+T+BZ1	C+BZ1	C+T+BZ2	C+BZ2
%CD4 ⁺ CD28 ⁺	48.65	52.70	52.55	52.75	48.25	48.85
%CD8 ⁺ CD28 ⁺	13.55	13.77	14.35	14.40	14.40	14.60
%CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	0.82	1.09	1.44	1.13	0.91	0.77
%CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺	0.34	0.33	0.39	0.32	0.29	0.34
MIF CD4 ⁺	54.45	56.95	55.60	55.35	55.60	55.00
MIF CD8 ⁺	26.95	24.90	27.15	27.30	27.60	26.30
MIF CD28 ⁺	64.75	66.95	67.05	67.00	66.20	64.90
MIF CTLA-4 ⁺	2.00	2.10	2.70	2.10	1.90	1.50

Legenda: MIF – Média da intensidade de fluorescência. C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ1 – Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 1µg/mL; C+BZ1 – Célula + Benzonidazol 1µg/mL; C+T+BZ2 - Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 2µg/mL; C+BZ2 – Célula + Benzonidazol 2µg/mL

Tabela 2. Medianas da expressão e da média da intensidade de fluorescência de moléculas de superfície em monócitos.

Marcações	C	C+T	C+T+BZ1	C+BZ1	C+T+BZ2	C+BZ2
% CD14 ⁺ CD80 ⁺	67.25	75.00	77.55	68.70	58.90	61.20
%CD14 ⁺ CD86 ⁺	99.55	99.65	99.25	99.60	99.90	99.80
%CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	75.80	89.65*	78.70	77.00	85.00	82.30
MIF CD14 ⁺ CD80 ⁺	67.50	75.70	77.80	68.90	60.10	61.50
MIF CD14 ⁺ CD86 ⁺	99.80	99.90	99.40	99.65	99.90	100
MIF CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	77.25	90.05*	79.40	77.55	85.40	83.10

Legenda: MIF – Média da intensidade de fluorescência. C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ1 – Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 1µg/mL; C+BZ1 – Célula + Benzonidazol 1µg/mL; C+T+BZ2 - Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 2µg/mL; C+BZ2 – Célula + Benzonidazol 2µg/mL. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quando comparadas a C são indicadas por (*).

Discussão

No presente estudo investigamos a produção de citocinas e a frequência das moléculas de superfície presentes nas células mononucleares de indivíduos após a infecção *in vitro* de monócitos com a CCol e tratamento com Bz. O objetivo do trabalho foi avaliar as possíveis modulações da resposta imunológica induzidas pela

infecção por uma cepa de *T. cruzi* resistente ao Bz, como a CCol, após o tratamento com o fármaco em estudo.

Nossos resultados mostraram que os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ se elevaram nas condições de cultivo onde havia infecção, já nas primeiras 24h de cultura e permaneceram elevadas durante até 10 dias de cultivo, indicando que a CCol dispara uma forte resposta celular. Porém, curiosamente, não há um marcado aumento de TNF, nas condições experimentais onde a CCol estava presente. Pelo contrário, nas condições ns condições de cultivo onde as células foram infectadas com a CCol verificamos menor produção de TNF quando comparamos às condições de cultivo sem infecção. Em estudo prévio de nosso grupo, verificamos que a cepa Y de *T. cruzi* (susceptível ao tratamento com Bz) também induziu maiores níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ e também de TNF.¹⁸ O TNF é produzido principalmente por macrófagos ativados, mas também por células NK, linfócitos T, células endoteliais, entre outras populações celulares. Além disso, exerce uma gama de atividades biológicas como proliferação e diferenciação, apoptose, citotoxicidade, inflamação e imunomodulação.¹⁹ Na DC, o TNF atua sinergicamente ao IFN- γ em mecanismos que levam a eliminação do parasita e proteção contra a morbidade na fase aguda, além disso, por mecanismos parácrinos e autócrinos, podem estimular células infectadas a liberar óxido nítrico e a controlar a multiplicação do *T. cruzi*.^{20,21} Além disso, já foi demonstrado em vários estudos, que níveis plasmáticos de TNF estão correlacionados com o nível de disfunção cardíaca em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, sugerindo que a participação desta citocina na formação da inflamação cardíaca crônica e lesão cardíaca.²²⁻²⁴

Uma investigação acerca dos efeitos provocados após a infecção de monócitos, oriundos do PBMC de indivíduos saudáveis, com diferentes cepas de *T. cruzi*, a cepa Y (DTU II) e a CCol (DTU I) mostrou que a CCol induz menor produção de TNF quando comparada a cepa Y.²⁵ Dessa forma, tais dados corroboram com o nosso estudo, evidenciando que a produção de TNF pode ser díspar quando as células da resposta imune são infectadas com cepas de DTU's diferentes. Essa hipótese também foi levantada no estudo de Poveda et al. (2014)²⁶ onde ao avaliarem o perfil de citocinas de indivíduos portadores de cardiomiopatia chagásica com o perfil de pacientes infectados com cepas de diferentes DTU's foi demonstrado que os grupos infectados por cepas TcII e mistas apresentam maiores

níveis de citocinas, se comparados aos grupos infectados com cepas TcI, portanto especula-se que a ausência de um perfil específico associado a uma DTU é provavelmente devido ao efeito pleitrópico, e muitas vezes, redundante de algumas citocinas.

Diante disso, a baixa produção de TNF sugere que a CCol atua diminuindo a resposta Th1, apontando para um mecanismo de fuga do sistema imunológico para sua sobrevivência, como já observado na literatura, quando alguns glico-inositol-fosfolipídios, encontrados na membrana celular de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, apresentaram função supressora na ativação das APCs, inibindo a secreção de citocinas como TNF e IL-12.²⁷⁻²⁹

Em nossos resultados foi demonstrado uma grande produção de IFN- γ em todos os tempos avaliados, nas condições infectadas com a CCol, entretanto a condição C+T+BZ2 produz uma quantidade estatisticamente menor da citocina, se comparada a C+T+BZ1 no tempo de 24h, e a C+T no tempo de 5d. Curiosamente, também foi observado que a condição de cultivo C+BZ2 apresentou níveis de IFN- γ menores que a condição C no tempo de 5d e 10d, sugerindo uma modulação negativa desta citocina induzida pelo Bz. O IFN- γ é produzido pelas células Th1 CD4⁺, células NK e células T CD8⁺, e é um elemento crucial no controle da parasitemia e ativação de macrófagos, a sua ausência determina um drástico aumento da parasitemia, do parasitismo tecidual, do infiltrado leucocitário no coração e músculos estriados e também da mortalidade.³⁰

Laucella et al. (2009)³¹ após estudarem PBMCs de portadores crônicos da doença de Chagas tratados com Bz verificaram que houve diminuição da produção de IFN- γ por células T específicas após o tratamento de 12 meses com o fármaco. Assim, acreditamos que essa diminuição de IFN- γ deva-se ao estabelecimento de um controle da replicação parasitária induzido pelo Bz.

Acredita-se que os indivíduos da forma indeterminada que produziram maior quantidade de IFN- γ são candidatos promissores ao desenvolvimento de cardiomiopatia se comparado aos baixos produtores, demonstrando que a exacerbação do IFN- γ precisa ser balanceada com a produção de IL-10 pra não ser tão danosa.³² D'Ávila et al. (2009)³³ avaliaram a produção de IFN- γ e IL-10 em soro de portadores crônicos cardíacos e da forma indeterminada e foi demonstrado que nos portadores da forma indeterminada há uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ e IL-10, já os indivíduos da forma cardíaca não há esta

correlação, indicando uma resposta inflamatória descontrolada, reforçando a hipótese que uma regulação entre IFN- γ e IL-10 ineficiente pode levar à piora clínica. Baseado nos estudos descritos anteriormente, nossos dados concordam com o de Gomes et al. (2003) e D'Ávila et al. (2009) visto que apesar de ter ocorrido uma grande produção de IFN- γ em todos os tempos avaliados, os níveis de IL-10 também aumentaram com o decorrer do cultivo celular, principalmente nas condições de cultivo infectadas com a CCol.

Nossos resultados quanto a produção de IL-2 demonstraram que os níveis da citocina são estatisticamente menores nas condições de cultivo em que as células foram infectadas e tratadas com Bz quando comparada à condição de células infectadas. A IL-2, que é produzida pelas células T, atua na proliferação e diferenciação de células T efectoras e de memória, está ligada ao desenvolvimento, a sobrevivência e as funções de células T regulatórias; em células NK também atua na proliferação e ativação, além de promover a proliferação e síntese de anticorpos *in vitro* das células B.³⁴ Nossos resultados apontam que o tratamento com Bz *in vitro* de células infectadas com a CCol por diminuir a produção de IL-2, induz a diminuição da diferenciação e proliferação de células T.

Em nosso estudo, as frequências das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ não apresentaram diferenças significativas entre as condições de cultivo. No entanto, foi identificado que a frequência de CTLA-4⁺ foi maior na condição C+T+BZ1, em células T CD4⁺ e CD8⁺, apesar de não ter diferença estatística. Concordante ao nosso estudo, nosso grupo de pesquisa em outro trabalho do grupo, identificou que a frequência de CTLA-4 foi maior na condição C+T+BZ em células T CD8⁺.¹⁸ A ativação de linfócitos T envolve o receptor de linfócito T (TCR), o receptor CD28, que se liga as moléculas co-estimulatórias CD80 (B71) e CD86 (B72) expressas nas APCs ativadas e a regulação desta ativação é exercida pela molécula CTLA-4, o sinal inibitório. A molécula CD28 fornece sinais positivos que promovem e sustentam as respostas de células T, enquanto que a molécula CTLA-4 regula as respostas desses linfócitos.^{34,35} Durante o processamento antigênico, as APCs precisam aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 que são importantes para promover a ativação e diferenciação de linfócitos T.^{34,36} A molécula CD86 é expressa constitutivamente e, portanto, é mais abundante na superfície de monócitos que CD80, que é expresso apenas após a estimulação antigênica.^{37,38} Dessa forma, em nosso estudo, apesar de não verificarmos diferenças significativas

na porcentagem de MIF, a frequência de células $CD14^+CD80^+$ foi maior nas condições onde as células foram infectadas. Por outro lado, parece que a concentração Bz 2 diminuiu a expressão dessa molécula, apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significativas.

Magalhães et al. (2015)³⁹ demonstraram que monócitos de indivíduos infectados *in vitro* com a CCol apresentam maior expressão de CD80 e CD86 após 72h de infecção se comparada aos monócitos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, esses resultados demonstram que o perfil genético da cepa de *T. cruzi* também pode estar relacionado com a expressão de moléculas co-estimulatórias, e como consequência, do seu espectro clínico. Neste mesmo estudo a expressão de monócitos $CD14^+HLA-DR^+$ foi similar em ambas as cepas estudadas. As moléculas HLA-DR são antígenos glicoproteicos oriundos do MHC classe II, que são constitutivos das APCs. Estas moléculas estimulam a resposta imune adaptativa através da apresentação de peptídeos a linfócitos T $CD4^+$.⁴⁰ Também já foi demonstrado que em células aderentes e mononucleares de sangue total de portadores da forma indeterminada ocorreu uma menor expressão de $HLA-DR^+$, sugerindo que a ativação de células T possa estar mais controlada nessa fase da doença.⁴¹

Nossos resultados mostraram que a infecção com a CCol induziu elevado aumento de HLA-DR em células $CD14^+$, ratificando, portanto, esta robusta ativação da resposta celular. Todavia, em outro estudo do grupo, ao observar a frequência de células $CD14^+HLA-DR^+$ em PBMC infectadas *in vitro* com a cepa Y foi demonstrada que a expressão dessas células foi similar em todas as condições de cultivo,⁴² sugerindo que a infecção com a CCol promove uma resposta mais intensa frente ao MHC II do que a cepa Y. Por outro lado, o tratamento *in vitro* com Bz poderia estar modulando negativamente a expressão desta molécula, visto que a frequência de $CD14^+HLA-DR^+$, bem como de MIF de HLA-DR, foram menores quando comparado aos controles, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que o Bz induziu um controle da ativação celular em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ por aumentar a expressão de CTLA-4 e por promover a diminuição de HLA-DR em monócitos, além de reduzir a produção de IL-2 e IFN- γ em PBMC infectadas *in vitro* com a CCol. No entanto, a modulação negativa da ativação celular também pode exercer um papel benéfico ao controlar a ativação exacerbada dessas células, que estariam provocando o dano tissular. Em

contrapartida, devido à heterogeneidade de perfis genéticos das cepas de *T. cruzi*, cada cepa pode desencadear diferentes respostas imunes em associação com o background imunológico do hospedeiro. Portanto, o nosso trabalho sugere que estudo da DTU de *T. cruzi* pode ser uma ferramenta importante para nortear a terapêutica associada com o acompanhamento do status imunológico do paciente, uma vez que a associação destas variáveis pode colaborar para um tratamento mais eficaz.

Referências

1. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1882.
2. Dias JCP. Chagas disease: still a challenge around the World. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 Jul-Aug;48(4):367-9.
3. Zingales B, Milles MA, Campbell DA et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):240-53.
4. Tibayrenc M, Ayala FJ. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Tropica*. 2015 Nov;151:156-65.
5. Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.*, 2014 Aug;36(8):377-87.
6. Zingales B, Andrade SG, Briones MR et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051-4.
7. Pinazo M-J, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*. 2015, 151:16-20.
8. Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res*. 1985, 18(4): 499-506.
9. Andrade LO, Galvão LM, Meirelles MdeN et al. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Sep;105(6):834-7.

10. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strain to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):755-9.
11. Camandaroba EL, Campos RF, Magalhães JB et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001 Mar-Apr;34(2):151-7.
12. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5022-7.
13. Viotti R, Vigliano C, Lococo B et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009 Mar;7(2):157-63.
14. Cevey ÁC, Mirkin GA, Penas FN. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2015 Dec 12;6(1):12-22.
15. Molina I, Gómez IPJ, Salvador F. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014 May 15;370(20):1899-908.
16. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Jan;97(1):3-24.
17. Sather-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Elói-Santos SM et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with trypanosome cruzi antigens. *BMC Infect Dis.* 2012 May 24;12:123.
18. Neves PAF. *Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos à exposição ao Trypanosoma cruzi.* 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.
19. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996 Apr-Jun;7(2):93-124.

20. Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 1997 Feb;65(2):457-65.
21. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000 Dec 12;102(24):3003-8.
22. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Apr;98(3):407-11.
23. Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*. 2003 Mar;33(3):293-9.
24. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 1;38(7):943-50.
25. Magalhães LMD. *Avaliação dos efeitos da infecção com diferentes cepas de Trypanosoma cruzi em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos*. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
26. Poveda C, Fresno M, Girones N et al. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS One*. 2014 Mar 7;9(3):e91154.
27. Silva JS, Aliberti JC, Martins GA et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Jan;31(1):111-5.
28. Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and co-stimulatory molecules. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):4033-40.
29. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC et al. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol*. 2002 Jun;18(6):272-8.

30. Marinho CRF, Nuñez-Apaza LN, IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):297-308.
31. Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-Specific Immune Responses after Treatment: Surrogate Markers of Treatment Efficacy. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1675-84.
32. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1185-93.
33. D'Ávila DA, Guedes PM, Castro AM et al. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL -10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Feb;104(1):100-5.
34. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 592p, 2012.
35. Rudd C E, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):12-26.
36. Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E et al. Monocytes from patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5283-91.
37. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Differential Modulation of Costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1886-94.
38. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol*. 1994 Sep 1;153(5):1990-7.
39. Magalhães LM, Viana A, Chiari E et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jul 6;9(7):e0003816.
40. La Famme AC, Kahn SJ, Rudensky AY et al. *Trypanosoma cruzi* infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class antigen presentation. *Eur J Immunol*. 1997 Dec;27(12):3085-94.

41. Molica AM. *Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas*. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
42. Soares AKA. *Avaliação in vitro da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o Trypanosoma cruzi* - Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2017.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com Bz induziu nas PBMC infectadas *in vitro* com a CCol um controle da ativação celular através do aumento da expressão da molécula CTLA-4⁺ tanto em linfócitos T CD4⁺ quanto em CD8⁺, promovendo assim, uma regulação da ativação exacerbada dessas células. Além disso, também foi verificado que a frequência da molécula HLA-DR, presente na membrana das APCs, foi reduzida induzindo a uma diminuição da resposta celular. O tratamento com o fármaco também reduziu os níveis das citocinas IL-2 e IFN- γ , importantes citocinas associadas com a defesa do organismo na eliminação do parasita, mas que são apontadas como iniciadores de mecanismos inflamatórios responsáveis pelos danos tissulares. Além disso, foi observada a diminuição da citocina TNF nas condições de cultivo onde a CCol estava presente, sugerindo que mecanismos relacionados à cepa também possam contribuir para o controle da ativação celular. Esses dados sugerem que a resistência ao Bz da CCol, possa estar associada à modulação negativa da ativação celular, promovendo um mecanismo de defesa que favorece a sobrevivência do parasita e pode estar relacionado com a falha terapêutica.

Em nosso estudo, a modulação negativa da ativação celular após o tratamento com o Bz pode ter um efeito benéfico pra alguns pacientes, por controlar a exacerbação de células ativadas, diminuindo assim o possível dano tissular. Entretanto, devido à diversidade genética do parasita, a resposta imunológica frente à cepa, e a administração do fármaco, pode ser divergente nas mais diferentes formas clínicas. Portanto, acreditamos que a investigação da DTU da cepa que infectou o paciente pode ser utilizada como uma ferramenta que venha a nortear a terapêutica, juntamente com o acompanhamento do status imunológico do hospedeiro, uma vez que a associação destes poderia resultar no sucesso do tratamento.

REFERÊNCIAS

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

AUFDERHEIDE, A.C. et al. A 9,000-year record of Chagas disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 2034–9, 2004.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 18, p. 140-141, 1976.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz J Med Biol Res**. v. 18, n. 4, p. 499-506; 1985.

ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 17-27, 1990.

ANDRADE, S. G.; PIMENTEL, A. R.; DE SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 63; p. 64-70; 2000.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94(Suppl. II), p. 429–432, 1999.

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

BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **The journal of the American Medical Association**, United States, v. 298, n.18, p. 2171-2181, 2007.

BERN, C.; MARTIN, D.L.; GILMAN, R.H. Acute and congenital Chagas disease. **Adv Parasitol**; v. 75: p. 19-47, 2011

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**; v. 373, p. 456-66, 2015.

BILATE, A.M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo , v. 50, p. 67-74, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, supl. III, 29 p, 2005.

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

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

CALDAS, S. et al. "Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology**, v. 141, p. 1628–1637, 2014.

CAMPOS, R.F. et al. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme Type II, *Trypanosoma cruzi* II) **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2, p. 142-146, 2005.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human and experimental toxicology**, Basingstoke, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

COSTA, G.C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J Infect Dis**, v.199, p. 451–454, 2009.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; VINÃS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature outlook**, London, p.S6-S7, 2010.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (Suppl. I), p. 31-40, 2009.

DIAS, J. Epidemiologia. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2000.

DIAS, J.C.P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Epidemiol. Serv. Saúde** [online]. 2016, vol.25, n.spe, p.7-86, 2015.

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2001.

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

DUTRA, W.O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n. 1, p. 208-218, 2009.

DUTRA, W.O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol.**, 2014 ; v. 36, n. 8, p. 377-87.

DUZ, A.L. et al. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 1005–1013, 2014.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and Progressive Myocarditis and Myositis in C3h Mice Infected with *Trypanosoma Cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**. v. 13, p. 272-80; 1964.

FERREIRA, R.C., et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/ "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 407-411, 2003.

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

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 81, n. 5, p. 755-9, 1987.

FLÓREZ , O. et al. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. **Human Immunology**, v. 73, p. 852–858, 2012.

FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benznidazol. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 65 (Supl I), p. 71, 1995.

FREITAS, J.M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 2, p.226–235, 2006.

GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v. 49, p. 1521-1528, 2005.

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

GOMES, J.A.S. et al. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. **Human Immunology**, v. 75, p. 20–28, 2014.

GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. **American trypanosomiasis (Chagas disease)**. One hundred years of research. 1st edition. Burlington (VA): Elsevier Inc; 2010. p. 209–31.

GRAVES, D.T. et al. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo. **Am J Pathol.** ; v. 140, n. 1, p. 9-14, 1992.

GUEDES, P. M. M. et al. Increased type 1 chemokine expression. In experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, p. 106 - 113, 2010.

GUERREIRO, M.L. et al. Immunological response to re-infections with clones of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* with different degrees of virulence: influence

on pathological features during chronic infection in mice . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 500-506, 2015.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, Suppl. I, p. 236-245, 2009.

HARDISON, L. J. et al. The Chemokines CXCL9 and CXCL10 Promote a Protective Immune Response but Do Not Contribute to Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 125 -134, 2006.

HERRERA, C. et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infect Genet Evol**, v. 7, p. 535-539, 2007.

HIGGINS, K.R. et al. Nucleotides Regulate Secretion of the Inflammatory Chemokine CCL2 from Human Macrophages and Monocytes. **Mediators Inflamm.** , p. 293925, 2014.

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

KAWASHITA, C. et al. Maximum-likelihood divergence data estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraespecific evolution. **Mol Biol Evol**, v. 18, p. 2250-2259, 2001.

KIRCHHOFF, L.V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Rakel, R.E. (Ed.), **Conn's Current Therapy**. W. B. Saunders, New York, pp. 101–102, 2000.

KIRCHHOFF LV, RASSI A JR. Chagas' disease and trypanosomiasis. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al, editors. **Harrison's principles of internal medicine**. 18th edition. New York: McGraw-Hill; p. 1716–21, 2011.

KRETTLI, A. U. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 104 (Supl 1): p.142–151, 2009.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Org.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, p. 73-100, 2005.

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

LENSCHOW, D.J. et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. **J Immunol**; v. 153, p.1990-1997, 1994.

LISBOA, C.V. et al. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. **Exp. Parasitol.**, v. 116, 150–155., 2007.

LLEWELLYN, M.S. et al. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.** , v. 3, p. 510, 2009.

MACHADO, J.R. **Avaliação de citocinas em diferentes linhagens de camundongos infectados com as cepas Y e Colombiana de *Trypanosoma cruzi***. Dissertação. (Mestrado Acadêmico em Patologia). – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

MACHADO, F.S. et al . *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, p. 3003-08, 2000.

MACHADO, F.S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes Infect**, v. 10, p. 1558-1566, 2008.

MAGALHÃES, L. M. D. **Avaliação dos efeitos da infecção com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 9, n. 7, p. e0003816, 2015.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641–655, 2009.

MARINHO, C.R.F. et al. IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 297–308, 2007.

MARINO, A.P. et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. **Circulation**, v. 110, p. 1443-1449, 2004.

MARIN-NETO, J.A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 319-324, 2009.

MARTINS, G.A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN- γ production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect** ; v. 6: p. 1133–1144, 2004.

MAYA, J.D. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochem. Pharmacol.** v. 65, p.999–1006, 2003.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 146, p. 601-620, 2006.

MAYA, J. D., et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, p. 601-20, 2007.

MILES, M.A. et al. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v.272, p. 819-821, 1978.

MICHAILEWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 159, p. 1723-1733, 2001.

MOREL C, et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MORILLO C.A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med.**; v. 373, n. 14, p. 1295-306, 2015.

NASCIMENTO, A. V. **Avaliação das quimiocinas e da expressão de seus receptores em células mononucleares de pacientes portadores da doença de Chagas submetidas à infecção *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* e tratamento**

subsequente com benzonidazol. 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

NEVES, P. A. F. **Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos à exposição ao *Trypanosoma cruzi*.** 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

OSTERMAYER, A.L. et. al. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 44, p. 108-121, 2011.

PECOUL B. et al. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? **PLoS Negl Trop Dis.** 2016 Feb 25;10(2):e0004343.

PEREIRA, I.R. et al. Severity of chronic experimental Chagas heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v. 109, p. 289-298, 2014.

PETHERICK, A. Chagas disease. **Nature outlook**, p. 10-11, 2010

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

ROMANHA, A.J. et al. Isoenzyme patterns of cultures *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. **Comp Biochem Physiol**, v. 62, p. 139-142, 1979.

ROMANHA, A.J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, vol. 105, n. 2, p. 233-238, mar. 2010.

RUDD, C. E.; TAYLOR, A.; SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. **Immunological Review**, Copenhagen, v. 229, n. 1, p. 12-26, 2009.

RUEDA, K. et al. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. **Biomédica**; v. 34, p. 631-41, 2014.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104(Suppl. I), p. 246-251, 2009.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with trypanosome cruzi antigens. **BMC Infectious Disease**, London, v. 123, p 12, 2012.

SILVA, J.S. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, p. 314-325, 2003.

SOUSA, G.R. et al. Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. **PLoS One**, v. 6; n. 9, s.3;:p. e87082, 2014.

SOUTO, R.P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 83, p. 141-152, 1996.

SOUZA, P.E. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, p. 5283–5291, 2004.

SOUZA, P.E.A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun**; v. 75, p.1886-1894, 2007

STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**. v. 115, 35–43, 2010.

STURM, N.R., et al. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol**. v. 33, p. 269–279, 2003.

TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. **Clin Infect Dis** v. 38, p. 943-950, 2004.

TEIXERA, M.M. et al.. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol** , v. 18, p. 262-265, 2002.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol Today**, v. 7, p. 228-232, 1991.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Int J Parasitol**, v. 25, p. 85-104, 1998.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, p.12, 2003.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. **Acta Tropica**, v. 151, p. 156–165, 2015.

URBINA, J. A. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. **Acta Trop.** v. 115, p. 55-68, 2009.

VAGO, A.R. et al. 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, 2000.

VILLANI, F.N. et al. *Trypanosoma cruzi* induced activation of functionally distinct alphabeta and gammadelta CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 78, p. 4421–4430, 2010.

VILLIGER, P.M. et al. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. **J Immunol.**; v. 149, n. 2, p. 722-7, 1992.

YLÄ-HERTTUALA, S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. **Proc Natl Acad Sci USA.**; v. 88, n. 12, p. 5252-6, 1991.

YU, X. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in delayed type hypersensitivity reactions in the skin. **Lab Invest.**; v. 71, n. 2, p. 226-35, 1994.

WEN, J.J. et al. Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. **Free Radic Biol Med**, v. 41, p. 270-276, 2006.

WESTENBERGER, S.J. et al. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, p. 527–543, 2005.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051–1054, 2009.b

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo

* Artigo que será submetido à Revista Parasite Immunology

In vitro* treatment with benzonidazole down-regulation cellular response after infection with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi

Leyllane Rafael Moreira¹; Clarice Neuenschwander Lins de Moraes²; Virginia Maria Barros de Lorena^{1,3,*}.

¹- Departament of Tropical Medicine, Federal University Pernambuco, UFPE, PE, Brazil.

²- Departament of Virology, Aggeu Magalhães Institute, IAM/Fiocruz, PE, Brazil.

³- Departament of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, IAM/Fiocruz, PE, Brazil.

*Integrated Chagas DiseaseProgram, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence: Virginia Maria Barros de Lorena. Aggeu MagalhãesInstitute/Fiocruz. Departament of Immunology. Professor Moraes Rêgo Avenue, s/n. Phone: (81) 2101-2563 – Zip code: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br

Abstract

The recommended drug for the treatment of the disease in Brazil is benzonidazole (Bz) and currently its use in the chronic phase of Chagas disease is aimed at preventing or delaying the evolution of the disease to more severe clinical forms. The success of the treatment depends on the synergism between the trypanocidal action of Bz and the immune response of the host. Our study aimed to investigate the immunomodulatory effects of infected mononuclear cells in vitro with Bz resistant *Trypanosoma cruzi* strain associated with the treatment. We performed the co-culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from volunteers (n=11) infected in vitro with the *T. cruzi* Colombian strain (CCol) and treated with Bz. The co-culture supernatant was used in cytokine dosage by cytometric beads array (CBA) and lymphocytes and monocytes were evaluated for expression of surface molecules. Our results demonstrated that Bz induced a control of the cellular activation in CD4 + and CD8 + T cells by increasing the expression of CTLA-4 and by promoting the decrease of HLA-DR in monocytes, besides reducing the production of IL-2 and IFN- γ in PBMC infected in vitro with CCol when compared to untreated cells. However, we believe that this negative modulation of cellular activation maybe beneficial for the control of tissue damage due to the decrease in the exacerbated activation of these cells. In contrast, due to the genetic diversity of the parasite, the immunological manifestations against the treatment and the immunological background of the host can promote diferente patterns of immune response. Therefore, by inducing such inhibition of the cellular response, we believe that the use of Bz could bring benefit to

the infected individual if the treatment schemes could be customized according to the type of strain housed by the individual.

Keywords: Trypanosoma cruzi. Drug Therapy. Cytokines.

Introduction

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, affecting thousands of people around the world.^{1,2} There is enormous genetic and biochemical diversity of strains of the parasite, which may be related to the different clinical forms and immunological manifestations of patients with CD.³ The strains of *T. cruzi* are currently classified in 6 DTU's (Discrete Typing Units), these units group together a set of genetically similar strains that can be identified by genetic, molecular and immunological markers.^{4,5} The most prevalent DTUs in Brazil are TcII, which has as classic representative the strain Y, and TcI being the classic example the Colombian strain (CCol).^{3,6} However, due to the various genetic mutations related to the parasite and the intense migratory flows, other DTUs and mixed profiles can also circulate throughout the country.^{3,7} The CCol was isolated for the first time from a human case in Colombia, and presents a slow evolutionary cycle, reaching a peak of parasitemia, in a murine model, between the 20th and 30th days, have tropism by the skeletal musculature, induce intense inflammatory process and myocardial lesions.^{8,9} The most striking feature of CCol is the natural resistance to the main treatment drug available for DC in Brazil, benznidazole (Bz).^{10,11}

The Bz has been used for more than 40 years in the treatment of CD in Brazil, however little is known about the pharmacokinetics, dynamics and immunological effects in the infected host, besides, there are serious collateral effects and controversies in the use of the drug in the chronic phase of the disease.¹²⁻¹⁵ The efficacy of Bz can also be altered by dose, age, geographical origin of the patient and infection by drug resistant strains. The success of the treatment is believed to occur when a synergism of the individual's immune response and pharmacological action of Bz occurs.¹⁶⁻¹⁷ Therefore, our study aimed to evaluate the immunological manifestations of *in vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with *T. cruzi* CCol, and addition of Bz treatment.

Materials and Methods

Study population – Peripheral blood from 11 volunteers was collected in vacuum collection tubes (Vacutainer®) containing sodium heparina to obtain mononuclear cells and used in cell culture assays, and dried tubes to perform these serology of DC. Our study had as exclusion criteria residing in endemic area, received blood transfusion, being under 18 years old and presenting positive serology for CD.

Parasites - Col trypomastigote forms kept frozen at -80 ° C in our laboratory were thawed and used for infection of Vero cells cultured in supplemented RPMI 1640 (Sigma TM) medium (10% fetal bovine serum - FBS) (GIBCO®) and 1% penicillin / streptomycin (Lonza) (complete medium) for 24 hours in a CO₂ incubator at 37°C. At the end of the incubation, the supernatant was removed for removal of the parasites that did not infect the cells and cultures incubated for 7 to 10 days. The cultures were monitored daily under the microscope and maintained the trypomastigote forms for use in the cell culture assays. trypomastigotes in the culture medium were collected, centrifuged (2555 xg for 10 minutes at 20 °C), and the precipitate was counted with Trypan Blue (Sigma TM) to observe the cell viability of trypomastigotes used in co-culture.

Isolation of PBMCs - After collection of blood in tubes containing sodium heparin using the vacuum system (Vacutainer®), blood was distributed into polypropylene tubes (BD Falcon TM - 50 mL) followed by the addition of the phosphate buffered saline solution (PBS) filtered and sterile. This solution was added to polypropylene tubes (BD Falcon TM - 50 mL) containing Ficoll-Hypaque PLUSTM (Amersham Biosciences). Cells were separated by centrifugation for 30 minutes at 900 x g 20 ° C in density gradient, and the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ring formed between the Ficoll interface and the plasma was collected. Cells were washed twice by centrifugation and resuspended in complete RPMI 1640 (SigmaTM) medium. PBMCs were then counted in Neubauer's chamber using Trypan Blue (SigmaTM) and adjusted to the concentration of 10⁶ cells / ml.

Co-culture between PBMC, *T. cruzi* CCol and addition of Bz treatment - To define the best times of co-culture in the cytokine dosage, we performed a kinetic time versus response, where the 24h, 5d and 10d times were chosen for cultivation. In 48-well polystyrene plates, 1 ml of PBMC (adherent and non-adherent cells) were added at a concentration of 1×10^6 cells / ml in complete RPMI 1640 (Sigma™) medium and incubated for 1h for adhesion of adherent cells / monocytes (37 °C / 5% CO₂). After incubation, the non-adherent cells / lymphocytes were removed by washing and stored in the oven at 37 °C and 5% CO₂. Thereafter, adherent / monocyte cells were infected by the trypomastigote forms of Col in the ratio of 10 parasites per monocyte, at a concentration of 2.5×10^5 per well, in complete RPMI 1640 (Sigma™) medium. The preparation was incubated (37 °C and 5% CO₂) for 2h for internalization of the parasites. After incubation, the parasites that failed to internalize were removed by lavage, the lymphocytes were readmitted into the wells and the treatment with Bz at the concentration of 1 µg / ml and 2 µg / ml was added. After the co-culture time, the culture supernatant was collected and immediately stored at -20 °C for subsequent dosages.

Detection of cytokine levels in culture supernatant by CBA - Cytokine levels were measured in the culture supernatant of the co-culture through the Cytometric Bead Array system (CBA-BD Biosciences), following the methodology suggested by the manufacturer with adaptations. First, 22 µL of the capture beads blend labeled with monoclonal antibodies (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- with different intensities of fluorescence are added in polystyrene tubes (BD Systems™ - 5mL), then 22 µL of the culture supernatant and 22 µL of the detection reagent were added. After this step, the samples were incubated for 3 hours at room temperature (RT) and protected from light. Then 1 mL of the wash buffer was added and the tubes centrifuged at 200 g for 5 min. Then the supernatant was discarded, and 300 µL of wash buffer was added to resuspend the beads and later read the samples in the Technological Platforms of Flow Cytometry, located in the Nucleus of Technological Platforms (NPT) / IAM / Fiocruz, through the FACScalibur flow cytometer (Becton Dickson Immunocytometry Systems), with the CellQuestPro software (Beckton Dickson) and analyzed in the FCAP 3.1 software.

Immunophenotyping for surface molecules on lymphocytes and monocytes from co-culture between PBMC, T. cruziCCol and addition of Bz treatment-

After 24h of co-culture, cells were removed using PBS-Wash (PBS containing bovine serum albumin 0.5% and 1% sodium azide). After removal, the cells were placed in polystyrene tubes (BD Systems™ - 5mL) and centrifuged at 400 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the monoclonal antibodies added were: CD4 / PerCP (1.5 µL - Invitrogen), CD8 / FITC (1.5 µL - Invitrogen), CD28 / PE (1.5 µL Invitrogen) and CTLA-4 / APC (1.5 µL - Invitrogen), CD86 / APC (1.5 µL - Invitrogen), HLA-DR / PerCP (2.5 µL - Invitrogen) for lymphocytes, and CD14 / FITC (2.5 µL - Invitrogen), the monocytes being incubated for 30 minutes protected from light. After incubation, a centrifugation (400 x g for 5 min at RT) was performed and the supernatant discarded. After, the cells were fixed with 150 µl BD Cytofix™ (BD Biosciences®) for a period of 15 min at 4°C. Subsequently, a centrifugation (400 x g for 5 min at RT) was performed, and the supernatant was discarded again. Then 300µL of PBS-Wash was added to the tubes and they were stored at 4°C until acquisition on the FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickson).

Acquisition and analysis of lymphocytes and monocytes on the flow cytometer

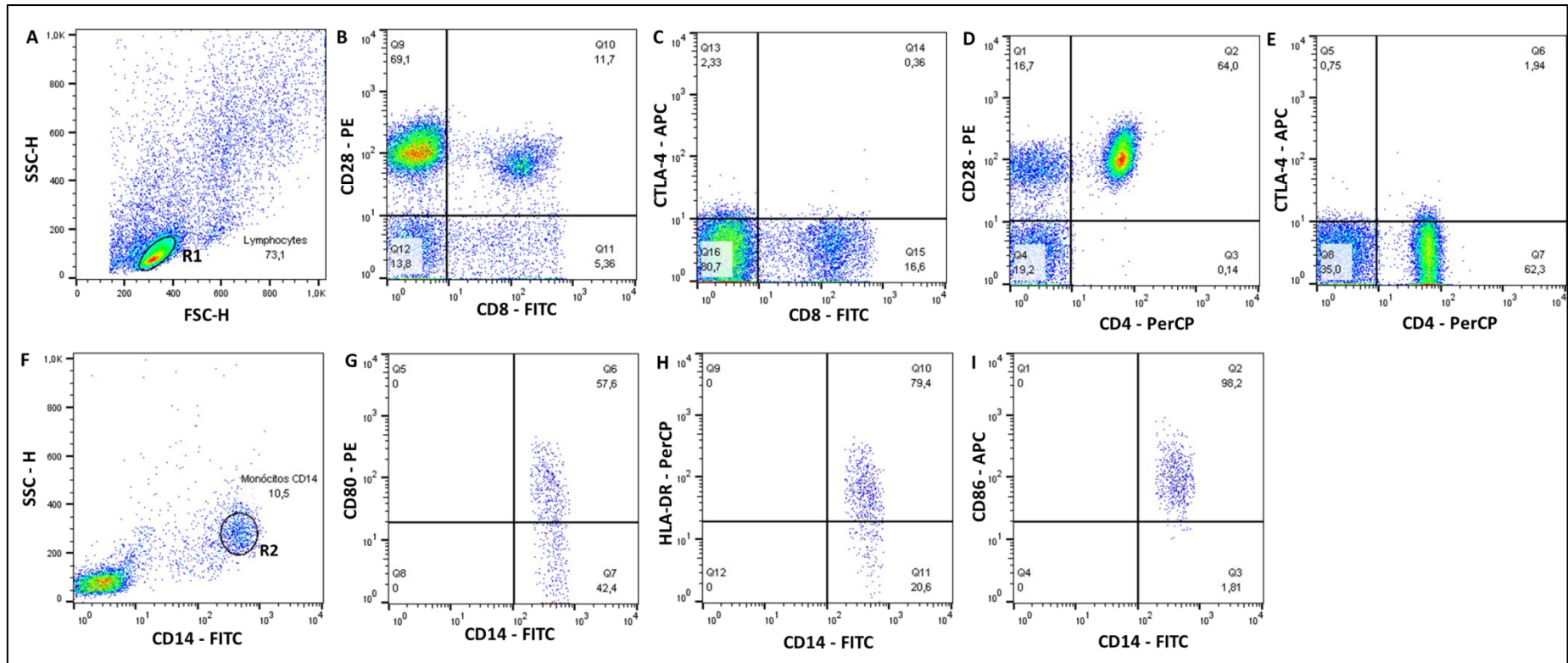
- was performed at the Technological Platforms of Flow Cytometry, located in the Nucleus of Technological Platforms (NPT) /IAM / Fiocruz. The lymphocyte population was selected through FSC vs SSC dot plot, with 20.000 events being acquired within the R1 window of lymphocytes and monocytes were selected through FCS versus FL1, and 1.000 events were acquired within window R2. After selecting the window of interest (R1) and (R2), CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and CD14+ monocytes, as well as the molecules were analyzed by obtaining two-dimensional graphs of fluorescence point distribution through FlowJo® software (figure 1).

Statistical analyzes - The results were evaluated by comparing the culture conditions. Statistical analyzes of cytokine production data on the culture supernatant and frequency of surface molecules as well as MIF on CD4, CD8 and CD14 T lymphocytes were performed using PRISM 5.0 Windows® software (U.S.A.). The results were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. The conditions that assumed normal distribution in the normality test were analyzed through the paired t-

test, and those that did not assume normal distribution were analyzed through the Wilcoxon test. All conclusions were taken at the significance level of 5%.

Ethical considerations - The approaches used in the study were approved by the Research Ethics Committee of IAM / Fiocruz (CAEE: 07511612.2.0000.5190). All participating individuals responded to a research form and voluntarily signed the Free and Informed Consent Form.

Figure 1- Acquisition and analysis of lymphocytes and monocytes.



Legend: A - Dotplot of the lymphocyte population selected for an analysis; B - Two-dimensional CD8 / FITC graph by CD28 / PE; C- Two-dimensional CD8 / FITC plot by CTLA-4 / APC; D - Two-dimensional CD4 / PerCP graph by CD28 / PE; E - Two-dimensional CD4 / PerCP graph by CTLA-4 / APC; F - Dotplot of the monocyte population selected for analysis; G - Two-dimensional CD14 / FITC graph by CD80 / PE; H- Two-dimensional CD14 / FITC graph by HLA-DR / PerCP; I - Two-dimensional CD14 / FITC graph by CD86 / APC.

Results

Detection of cytokines in the culture supernatant

Our results show that in the experimental conditions where the cells were infected with the CCol of *T. cruzi* we verified a greater production of cytokines compared to the uninfected culture conditions. We observed a statistically higher production of IFN- γ in the 24 h time, in the experimental condition C + T + BZ1, when compared to the C + T + BZ2 condition (Fig. 2A). In addition, it was observed that the C + BZ2 condition produced less IFN- γ than condition C, at the time of 5d (Fig. 2D).

When we observed the TNF dosages, we noticed that in 24h the production was slightly higher in experimental conditions infected with *T. cruzi* (Fig. 2B); in contrast, from the 5d and 10d times, a decrease of the TNF production occurs in the conditions infected with *T. cruzi*, compared to controls observed without infection (Fig. 2E, 2H).

In the IL-10 cytokine dosage, experimental conditions infected by CCol (C + T, C + T + BZ1 and C + T + BZ2) show a higher production of IL-10 in the 24h, 5d and 10d times, when compared to uninfected controls C and C + BZ1 (Fig. 2C, 2F, 2I). In addition, although not statistically significant, the medians of the experimental condition C + T + BZ2, at all evaluated times, are slightly higher than the culture conditions infected with CCol.

In general, IL-6 (Fig. 3A, 3D, 3G) showed higher cytokine production under experimental conditions infected with the trypomastigote form of CCol (C + T, C + T + BZ1, C + T + BZ2) when uninfected conditions (C, C + BZ1 and C + BZ2) were compared at all evaluated times. However, although it did not present statistical difference, IL-6 production in the C + T + BZ2 condition was slightly lower than in the other culture conditions infected by CCol.

Figure 2- Detection of cytokine production of IFN- γ , TNF, IL-10, in the culture supernatant of adherent and non-adherent cells obtained from the co-cultivation between PBMC, *T. cruzi* CCol infection and Bz treatment.

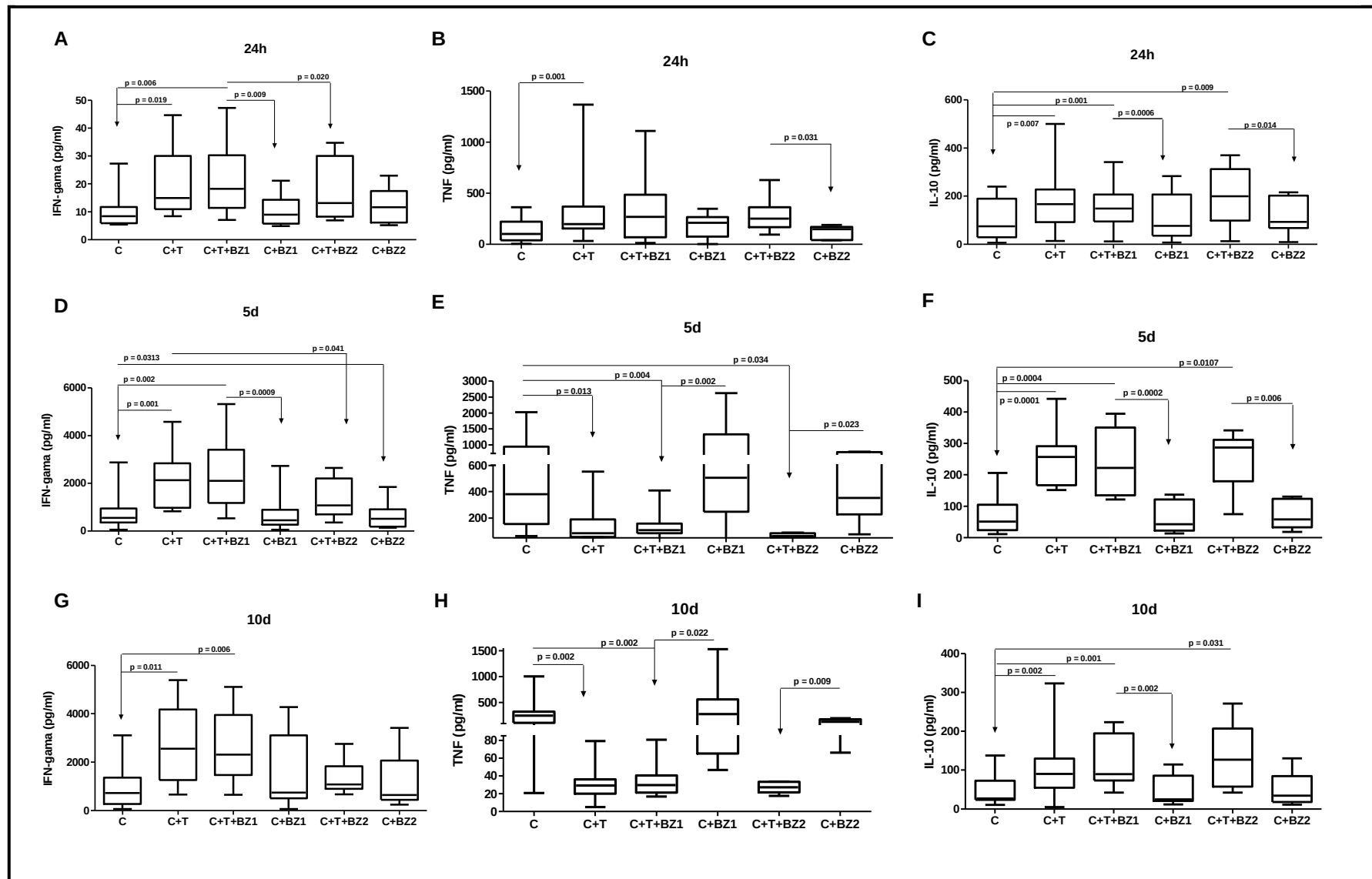
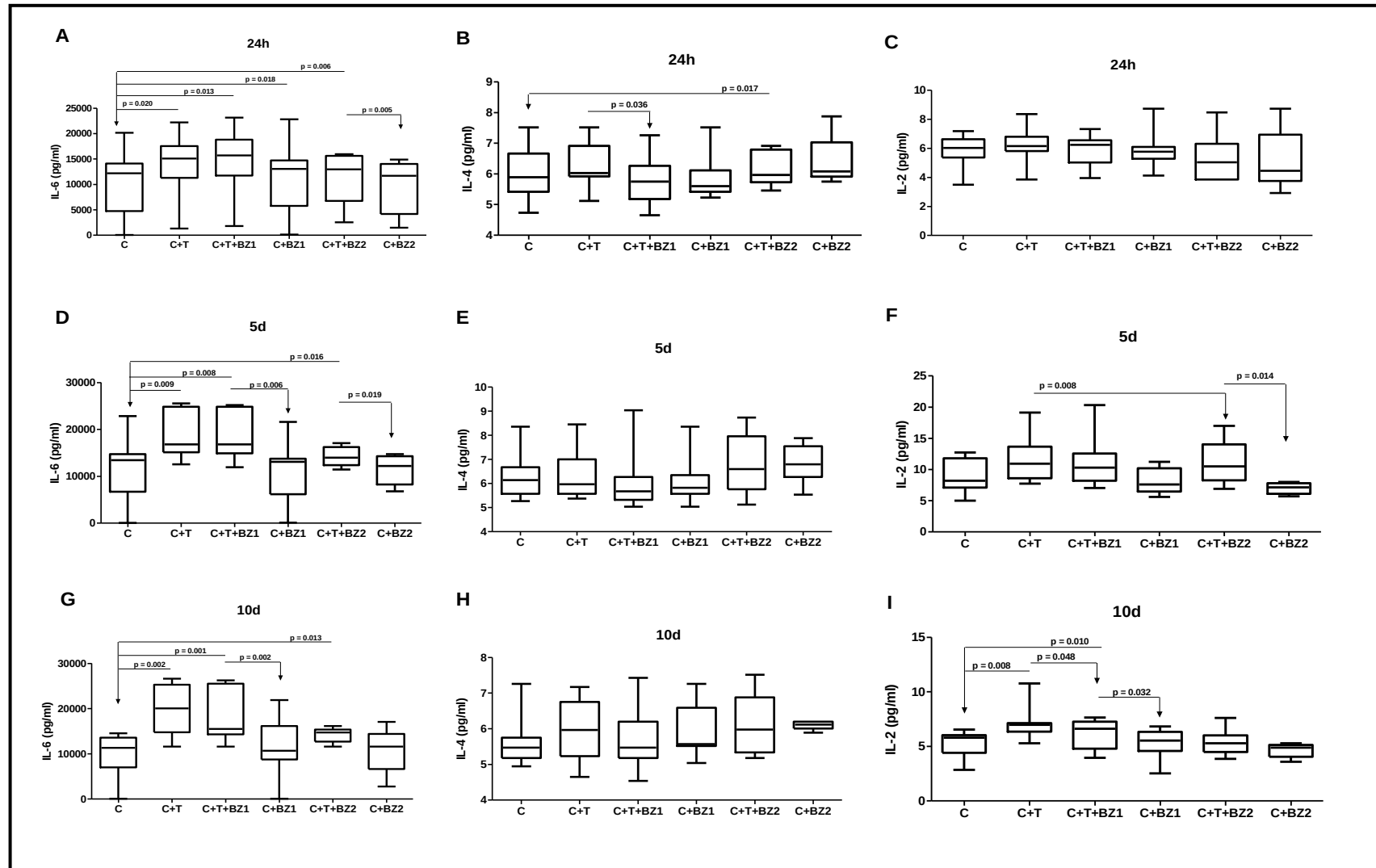


Figure 3- Detection of IL-6, IL-4 and IL-2 cytokine production in the culture supernatant of adherent and non-adherent cells obtained from co-cultivation between PBMC, *T. cruzi* CCol infection and Bz treatment.



Legend: C - Cell; C + T - Cell + Tripomastigote; C + T + BZ1 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 1µg / mL; C + BZ1 - Cell + Benzonidazole 1µg / mL; C + T + BZ2 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 2µg / mL; C + BZ2 - Cell + Benzonidazole 2µg / mL. The horizontal bars represent the arithmetic mean and the standard deviation. Significant differences with $p \leq 0.05$ for comparisons between the conditions of each growing time are indicated by arrows.

The detection of IL-4 was similar in the observed culture conditions (Fig. 3B, 3E and 3H), except for 24 h where IL-4 production in the experimental condition C + T was statistically higher than in the condition C + T + BZ1 (Fig. 3B). In addition, although the median IL-4 production at 5d and 10d times (Fig. 3E, 3H), in the experimental condition C + T was higher than in the C + T + BZ1 condition, it was not statistically significant. however was similar to that of the C + T + BZ2 condition.

The IL-2 cytokine dosages at 24 h (Fig. 3C) showed similarity between culture conditions. In contrast, at the time of 5d and 10d (Fig. 3F and 3I) a higher production of IL-2 in experimental conditions infected with *T. cruzi* CCol was verified when compared to conditions without infection. In addition, it was observed that the experimental condition C + T produced a statistically higher amount of IL-2 than conditions C + T + BZ1 and C + T + BZ2 at times 5 days and 10d.

Evaluation of the expression of CD28 + and CTLA-4 + molecules in CD4 + and CD8 + T lymphocytes

When we evaluated the expression of CD28 + molecules in CD4 + and CD8 + T lymphocytes, the expression of these molecules behaved in a similar manner in all culture conditions observed in 24 h (Table 1). Regarding the expression of CTLA-4 + molecules in CD4 + and CD8 + T lymphocytes, in the 24 h time, it was observed that the greatest expression occurred in the C + T + BZ1 culture condition, in both cell populations. However, the same did not occur for CD4 + in culture conditions that presented Bz at 2 µg / mL (BZ2), where a slight decrease in CTLA-4 expression was observed when compared to the other culture conditions (Table 1). The data obtained by the mean fluorescence intensity (MIF) showed that in the C + T experimental conditions, followed by C + T + BZ1 and C + T + BZ2, a larger number of CD4 + T cells occurred, but the presence of CD8 + T cells higher in the C + T + BZ2 condition. In addition, MIF of CD28 + demonstrated that this molecule is more expressed in conditions C + T, C + T + BZ1 and C + BZ1, when compared to the other culture conditions, but no statistical difference was observed. According to the analysis of double

labeled cells, the highest number of CTLA-4 + molecules expressed occurred in the C + T + BZ1 condition.

Evaluation of the expression of CD80 +, CD86 + and HLA-DR + molecules in CD14 +

When we evaluated the mean expression of CD80 + molecules in CD14 + monocytes, we observed that the highest expression of this costimulatory molecule was in the C + T + BZ1 condition, followed by C + T, but with no statistical difference. In addition, there was a slight decrease in the means of C + BZ1 and C + BZ2 when compared to culture C (Table 2), but without significant difference. The expression of CD86 + molecules in CD14 + lymphocytes occurred in a similar manner in all culture conditions, except for the discrete decrease of C + T + BZ1 in relation to the other culture conditions evaluated (Table 2).

The expression of HLA-DR + molecules in CD14 + monocytes was higher in the experimental condition C + T, being statistically significant when compared to condition C ($p = 0.041$), the phenomenon was repeated when we evaluated the MIF of CD14 + HLA-DR + monocytes, meanwhile. although not statistically significant, HLA-DR + expression also occurred expressively in the C + T + BZ2 condition when compared to the other culture conditions (Table 2).

Table 1. Median expression and mean fluorescence intensity of surface molecules on lymphocytes.

Marcações	C	C+T	C+T+BZ1	C+BZ1	C+T+BZ2	C+BZ2
%CD4 ⁺ CD28 ⁺	48.65	52.70	52.55	52.75	48.25	48.85
%CD8 ⁺ CD28 ⁺	13.55	13.77	14.35	14.40	14.40	14.60
%CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	0.82	1.09	1.44	1.13	0.91	0.77
%CD8 ⁺ CTLA-4 ⁺	0.34	0.33	0.39	0.32	0.29	0.34
MIF CD4 ⁺	54.45	56.95	55.60	55.35	55.60	55.00
MIF CD8 ⁺	26.95	24.90	27.15	27.30	27.60	26.30
MIF CD28 ⁺	64.75	66.95	67.05	67.00	66.20	64.90
MIF CTLA-4 ⁺	2.00	2.10	2.70	2.10	1.90	1.50

Legend: MIF - Mean fluorescence intensity. C - Cell; C + T - Cell + Tripomastigote; C + T + BZ1 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 1µg / mL; C + BZ1 - Cell + Benzonidazole 1µg / mL; C + T + BZ2 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 2µg / mL; C + BZ2 - Cell + Benzonidazole 2µg / mL

Table 2. Median expression and mean fluorescence intensity of surface molecules in monocytes.

Marcações	C	C+T	C+T+BZ1	C+BZ1	C+T+BZ2	C+BZ2
% CD14 ⁺ CD80 ⁺	67.25	75.00	77.55	68.70	58.90	61.20
%CD14 ⁺ CD86 ⁺	99.55	99.65	99.25	99.60	99.90	99.80
%CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	75.80	89.65*	78.70	77.00	85.00	82.30
MIF CD14 ⁺ CD80 ⁺	67.50	75.70	77.80	68.90	60.10	61.50
MIF CD14 ⁺ CD86 ⁺	99.80	99.90	99.40	99.65	99.90	100
MIF CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	77.25	90.05*	79.40	77.55	85.40	83.10

Legend: MIF - Mean fluorescence intensity. C - Cell; C + T - Cell + Tripomastigote; C + T + BZ1 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 1µg / mL; C + BZ1 - Cell + Benzonidazole 1µg / mL; C + T + BZ2 - Cell + Tripomastigote + Benzonidazole 2µg / mL; C + BZ2 - Cell + Benzonidazole 2µg / mL. Significant differences (p≤0.05) when compared to C are indicated by (*).

Discussion

In the present study we investigated the production of cytokines and the frequency of surface molecules present in the mononuclear cells of individuals after in vitro monocyte infection with CCol and Bz treatment. The aim of the study was to evaluate the possible modulations of the immune response induced by infection with a Bz resistant *T. cruzi* strain, such as CCol, after treatment with the drug under study.

Our results showed that IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ cytokines increased in culture conditions where there was an infection within the first 24 h of culture and in life cycles up to 10 days of culture, indicating that a CCol triggers a strong cellular response. Interestingly, however, there is no marked increase in TNF under the experimental conditions where a CCol was present. On the other hand, under culture conditions and conditions where CCol-infected cells showed lower TNF production when compared to culture conditions without infection. In a previous study of our group, we found that *T. cruzi* Y strain (susceptible to Bz treatment) also induced higher levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ and also TNF.¹⁸ TNF is produced primarily by activated macrophages, but also by NK cells, T lymphocytes, endothelial cells, among other cell populations. In addition, it exerts a range of biological activities such as proliferation and differentiation, apoptosis, cytotoxicity, inflammation and immunomodulation.¹⁹ In DC, TNF acts synergistically with IFN- γ in mechanisms that lead to parasite clearance and protection against acute phase morbidity. In addition, paracrine and autocrine mechanisms can stimulate infected cells to release nitric oxide and control multiplication of *T. cruzi*.^{20,21} In addition, it has been shown in several studies that TNF plasma levels are correlated with the level of cardiac dysfunction in patients with chronic chagasic cardiomyopathy, suggesting that the participation of this cytokine in the formation of chronic cardiac inflammation and cardiac injury²²⁻²⁴.

An investigation into the effects after monocyte infection from PBMC from healthy individuals with different strains of *T. cruzi*, strain Y (DTU II) and CCol (DTU I) showed that CCol induces lower production of TNF when compared to strain Y.²⁵ Thus, such data corroborate with our study, evidencing that the production of TNF may be different when the cells of the immune response are infected with strains of different DTU's. This hypothesis was also raised in the study by Poveda et al. (2014)²⁶ where when assessing the cytokine profile of individuals with Chagas' cardiomyopathy with the profile of patients infected with different DTUs, it was demonstrated that the groups infected with TcII and mixed strains had higher levels of cytokines when compared to infected groups with TcI strains, it is therefore speculated that the absence of a specific profile associated with a DTU is probably due to the pleiotropic, and often redundant, effect of some cytokines.

In view of this, the low TNF production suggests that CCol acts by decreasing the Th1 response, pointing to a mechanism of escape of the immune system for its survival, as already observed in the literature, when some glyco-inositol-phospholipids, found in the cell membrane of epimastigote and trypomastigotes-metacyclic forms, presented suppressive function in the activation of APCs, inhibiting the secretion of cytokines such as TNF and IL-12.²⁷⁻²⁹

In our results, a large production of IFN- γ was demonstrated at all time points under conditions infected with CCol. However, the C + T + BZ2 condition produced a statistically lower amount of cytokine when compared to C + T + BZ1 in time of 24h, and C + T in the time of 5d. Interestingly, it was also observed that the C + BZ2 culture condition had lower IFN- γ levels than the C condition in the time of 5d and 10d, suggesting a negative modulation of this cytokine induced by Bz. IFN- γ is produced by CD4 + Th1 cells, NK cells and CD8 + T cells, and is a crucial element in the control of parasitemia and activation of macrophages, its absence determines a drastic increase in parasitemia, tissue parasitism, leukocyte infiltrate in heart and striated muscles and also mortality.³⁰

Laucella et al. (2009)³¹ after studying PBMCs from chronic Chagas' disease carriers treated with Bz found that there was a decrease in IFN- γ production by specific T cells following the 12-month treatment with the drug. Thus, we believe that this decrease in IFN- γ is due to the establishment of a control of parasite replication induced by Bz. It is believed that indeterminate individuals who have produced a greater amount of IFN- γ are promising candidates for the development of cardiomyopathy compared to low-producer, demonstrating that IFN- γ exacerbation needs to be balanced with IL-10 production to not be so harmful.³² D'Ávila et al. (2009)³³ evaluated the production of IFN- γ , IL-10 in serum of chronic and cardiac carriers of the indeterminate form and it was demonstrated that in the indeterminate form there is a positive correlation between IFN- γ and IL-10 production, there is no such correlation, indicating an uncontrolled inflammatory response, reinforcing the hypothesis that a regulation between ineffective IFN- γ and IL-10 may lead to clinical worsening. Based on the studies described previously, our data agree with that of Gomes et al. (2003) and D'Ávila et al. (2009), although in spite of a

large IFN- γ production occurring at all evaluated times, IL-10 levels also increased with the course of cell culture, especially in culture conditions infected with CCol.

Our results regarding IL-2 production have demonstrated that cytokine levels are statistically lower under culture conditions in which cells were infected and treated with Bz as compared to the condition of infected cells. IL-2, which is produced by T cells, acts on the proliferation and differentiation of effector and memory T cells, is linked to the development, survival and functions of regulatory T cells; in NK cells also acts on proliferation and activation, in addition to promoting the proliferation and synthesis of in vitro B-cell antibodies.³⁴ Our results indicate that the treatment with Bzin in vitro of cells infected with CCol by decreasing IL- induces a decrease in T cell differentiation and proliferation.

In our study, the frequencies of the CD28+ and CTLA-4+ molecules did not show significant differences between the culture conditions. However, it was found that the frequency of CTLA-4 + was higher in the C + T + BZ1 condition, in CD4+ and CD8+ T cells, although there was no statistical difference. According to our study, our research group in another study of the group identified that CTLA-4 frequency was higher in the C + T + BZ condition in CD8 + T cells.¹⁸ Activation of T lymphocytes involves the T lymphocyte receptor (TCR), the CD28 receptor, which binds the co-stimulatory molecules CD80 (B71) and CD86 (B72) expressed in the activated APCs and the regulation of this activation is exerted by the CTLA-4 molecule, the inhibitory signal. The CD28 molecule provides positive signals that promote and support T cell responses, whereas the CTLA-4 molecule regulates the responses of these lymphocytes.^{34,35} During antigen processing, APCs need to increase the expression of costimulatory molecules such as CD80 and CD86 that are important in promoting the activation and differentiation of T lymphocytes.^{34,36} The CD86 molecule is constitutively expressed and therefore is more abundant on the surface of monocytes than CD80, which is expressed only after antigenic stimulation.^{37,38} Thus, in our study, although we did not find significant differences in the percentage of MIF, the CD14 + CD80 + cell frequency was higher in the conditions where the cells were infected. On the other hand, it

seems that the Bz2 concentration decreased the expression of this molecule, although we did not observe statistically significant differences.

Magalhães et al. (2015)³⁹ demonstrated that monocytes from individuals infected in vitro with CCol exhibit greater expression of CD80 and CD86 after 72h of infection compared to monocytes infected with the T. cruzi Y strain, these results demonstrate that the genetic profile of the strain T. cruzi may also be related to the expression of costimulatory molecules and, as a consequence, to their clinical spectrum. In this same study the expression of CD14 + HLA-DR + monocytes was similar in both strains studied. HLA-DR molecules are MHC class II glycoprotein antigens, which are constitutive of APCs. These molecules stimulate the adaptive immune response through the presentation of peptides to CD4 + T lymphocytes.⁴⁰ It has also been demonstrated that in adherent and whole blood mononuclear cells of indeterminate carriers, there was a lower expression of HLA-DR +, suggesting that the activation of T cells may be more controlled at this stage of the disease.⁴¹

Our results showed that infection with CCol induced a high increase of HLA-DR in CD14 + cells, thus confirming this robust activation of the cellular response. However, in another study of the group, observing the frequency of CD14 + HLA-DR + cells in PBMCs infected in vitro with the Y strain demonstrated that the expression of these cells was similar in all culture conditions, 42 suggesting that infection with CCol promotes a more intense response to MHC II than strain Y. On the other hand, in vitro treatment with Bz could be negatively modulating the expression of this molecule, since the CD14 + HLA-DR + frequency, as well as MIF of HLA-DR, were lower when compared to controls, but without presenting a statistically significant difference.

In summary, our study demonstrated that Bz induced a control of cell activation in CD4 + and CD8 + T cells by enhancing CTLA-4 expression and by promoting the decrease of HLA-DR in monocytes, in addition to reducing the production of IL-2 and IFN- γ in PBMCs infected in vitro with CCol. However, the negative modulation of cellular activation may also play a beneficial role in controlling the exacerbated activation of these cells, which would be causing tissue damage. In contrast, due to the heterogeneity of genetic profiles of T. cruzi strains, each strain can trigger different immune responses in association with the host's immune background. Therefore, our work suggests that T. cruzi

DTU study may be a tool important to guide the therapy associated with monitoring the patient's immunological status, since the association of these variables may contribute to a more effective treatment.

Acknowledgement

This work was supported financially by the National Council for Technological Development (CNPq) (Universal / CNPq 474926 / 2012-5) and Program of Excellence in Research of the Foundation of Support to Science and Technology of Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11 / 15). We thank Mr. Mineo Nakazawa for the technical support, and Dr. Yara Gomes of the Immunology Department of the Aggeu Magalhães Institute - IAM / Fiocruz, for ceding the CCol of *T. cruzi*. We would also like to thank the Aggeu Magalhães Institute for providing all the necessary infrastructure to carry out this work.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

1. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015 Nov 5;373(19):1882.
2. Dias JCP. Chagas disease: still a challenge around the World. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015 Jul-Aug;48(4):367-9.
3. Zingales B, Milles MA, Campbell DA et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):240-53.
4. Tibayrenc M, Ayala FJ. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Tropica*. 2015 Nov;151:156-65.
5. Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.*, 2014 Aug;36(8):377-87.

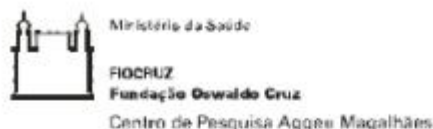
6. Zingales B, Andrade SG, Briones MR et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):1051-4.
7. Pinazo M-J, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*. 2015, 151:16-20.
8. Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res*. 1985, 18(4): 499-506.
9. Andrade LO, Galvão LM, Meirelles MdeN et al. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Sep;105(6):834-7.
10. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strain to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):755-9.
11. Camandaroba EL, Campos RF, Magalhães JB et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Mar-Apr;34(2):151-7.
12. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5022-7.
13. Viotti R, Vigliano C, Lococo B et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Mar;7(2):157-63.
14. Cevey AC, Mirkin GA, Penas FN. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2015 Dec 12;6(1):12-22.
15. Molina I, Gómez IPJ, Salvador F. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014 May 15;370(20):1899-908.

16. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan;97(1):3-24.
17. Sather-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Elói-Santos SM et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with trypanosome cruzi antigens. *BMC Infect Dis*. 2012 May 24;12:123.
18. Neves PAF. *Avaliação do efeito do benzonidazol sobre linfócitos, de portadores crônicos da doença de Chagas, submetidos à exposição ao Trypanosoma cruzi*. 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.
19. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw*. 1996 Apr-Jun;7(2):93-124.
20. Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH et al. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 1997 Feb;65(2):457-65.
21. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000 Dec 12;102(24):3003-8.
22. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Apr;98(3):407-11.
23. Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*. 2003 Mar;33(3):293-9.
24. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 1;38(7):943-50.
25. Magalhães LMD. *Avaliação dos efeitos da infecção com diferentes cepas de Trypanosoma cruzi em características fenotípicas e funcionais de monócitos e linfócitos humanos*. Dissertação (Mestrado Acadêmico

- em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
26. Poveda C, Fresno M, Girones N et al. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS One*. 2014 Mar 7;9(3):e91154.
 27. Silva JS, Aliberti JC, Martins GA et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Jan;31(1):111-5.
 28. Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V et al. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and co-stimulatory molecules. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):4033-40.
 29. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC et al. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol*. 2002 Jun;18(6):272-8.
 30. Marinho CRF, Nuñez-Apaza LN, IFN- γ , But Not Nitric Oxide or Specific IgG, is Essential for the In vivo Control of Low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* Parasites. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):297-308.
 31. Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-Specific Immune Responses after Treatment: Surrogate Markers of Treatment Efficacy. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1675-84.
 32. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1185-93.
 33. D'Ávila DA, Guedes PM, Castro AM et al. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL -10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Feb;104(1):100-5.
 34. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 592p, 2012.

35. Rudd C E, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):12-26.
36. Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E et al. Monocytes from patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):5283-91.
37. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA et al. Trypanosoma cruzi Infection Induces Differential Modulation of Costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease. *Infect Immun.* 2007 Apr;75(4):1886-94.
38. Lenschow DJ, Sperling AI, Cooke MP et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol.* 1994 Sep 1;153(5):1990-7.
39. Magalhães LM, Viana A, Chiari E et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of Trypanosoma cruzi. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jul 6;9(7):e0003816.
40. La Famme AC, Kahn SJ, Rudensky AY et al. Trypanosoma cruzi infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class antigen presentation. *Eur J Immunol.* 1997 Dec;27(12):3085-94.
41. Molica AM. Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
42. Soares AKA. Avaliação in vitro da ação do Benzonidazol sobre células aderentes de portadores crônicos da doença de Chagas submetidas à interação com o Trypanosoma cruzi - Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2017.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o Voluntário



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Não Portador da doença de Chagas

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

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

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

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

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

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

Consentimento Pós-Informação

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

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

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

Data: ____/____/____

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena
CPqAM/Fiocruz
Pesquisadora Responsável

APÊNDICE C - Cinética tempo x resposta das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF

Para a escolha do melhor tempo a ser avaliado no co-cultivo entre PBMC, CCol e adição de Bz, foi realizada inicialmente uma cinética tempo x resposta, observando os tempos de cultivo de 24h, 72h, 5 dias, 10 dias e 15 dias, para a dosagem de citocinas por CBA. Foram utilizados 5 indivíduos saudáveis para a obtenção das PBMC utilizadas nos ensaios. Logo ao realizar o primeiro co-cultivo decidimos excluir o tempo de 15 dias, pois após 10 dias as células já se encontravam muito sofridas e o meio de cultura já bastante consumido para prosseguir com o cultivo celular. Para definirmos os tempos padrão que seriam adotados, observamos a produção de citocinas na condição de cultivo Célula + Tripomastigota + Benzonidazol 1 μ g/mL (C+T+BZ) nos tempos de 24h, 72h, 5 dias e 10 dias, bem como a produção de cada citocina nos tempos estabelecidos em todas as condições de cultivo Célula (C), Célula + Tripomastigota (C+T), Célula + Tripomastigota + Benzonidazol (C + T + BZ) e Célula + Benzonidazol (C + BZ).

Na dosagem da citocina IL-2 foi observado na figura 1A, a produção na condição experimental C + T + Bz nos tempos estabelecidos na cinética tempo x resposta de 24h, 72h, 5d e 10d e ao analisar o gráfico foi demonstrado uma maior produção de IL-2 nos tempos de 72h e 5d. Foi observado também que o tempo de 24h é diferente estatisticamente do tempo de 72h, e esse diferente estatisticamente do tempo de 10d. Nas figuras 1B, 1C, 1D e 1E foram observados os níveis de IL-2 nos tempos avaliados em todas as condições experimentais testadas. De forma geral, a IL-2 teve um padrão de produção regular entre os tempos e condições experimentais observadas, exceto pelo tempo de 10d que apresentou diferenças estatísticas nas condições: C em relação a C + T, e C + T + Bz em relação a condição experimental tratada com Bz, a C + Bz.

Na dosagem da citocina IL-4 foi observado que tanto ao analisarmos apenas a condição experimental C + T + Bz nos tempos estipulados (Fig. 2A), como também em todas as condições experimentais observadas por tempo (Fig. 2B, 2C, 2D, 2E), a produção da citocina foi constante em todos os tempos e condições analisadas. Em contrapartida, apenas na figura 2B, no tempo de

24h, foi observada que a condição tratada com Bz, o C + T + Bz demonstrou uma diminuição na produção de IL-4, se comparada a condição C + T, apesar de não ter diferença estatística.

Na dosagem para a citocina inflamatória IL-6 foi demonstrado na figura 3A que a produção desta ocorreu de maneira crescente no decorrer dos tempos analisados, sendo observada a maior produção de IL-6 no tempo de 10d e apresentando diferenças estatísticas no tempo de 24h em relação aos demais tempos, e no tempo de 5d se comparado ao tempo de 10d. Ao observarmos as figuras 3B, 3C, 3D e 3E foi demonstrado que a produção de IL-6 ocorre de maneira mais pronunciada nas condições experimentais que têm a presença do tripomastigota, as condições C + T e C + T + Bz, principalmente a partir dos tempos de 5d e 10d.

Já na citocina IL-10 foi observado que na condição C + T + Bz ocorreu a maior produção citocina anti-inflamatória no tempo de 5d, se comparado aos demais tempos, demonstrado na figura 4A. Ao avaliarmos as condições experimentais separadas por tempo de cultivo (Fig. 4B, 4C, 4D e 4E) foi possível notar que a partir do tempo de 72h ocorre uma maior produção de IL-10 nas condições experimentais que têm a presença do tripomastigota (C + T e C + T + Bz), se comparada as condições que não foram infectadas (C e C + Bz).

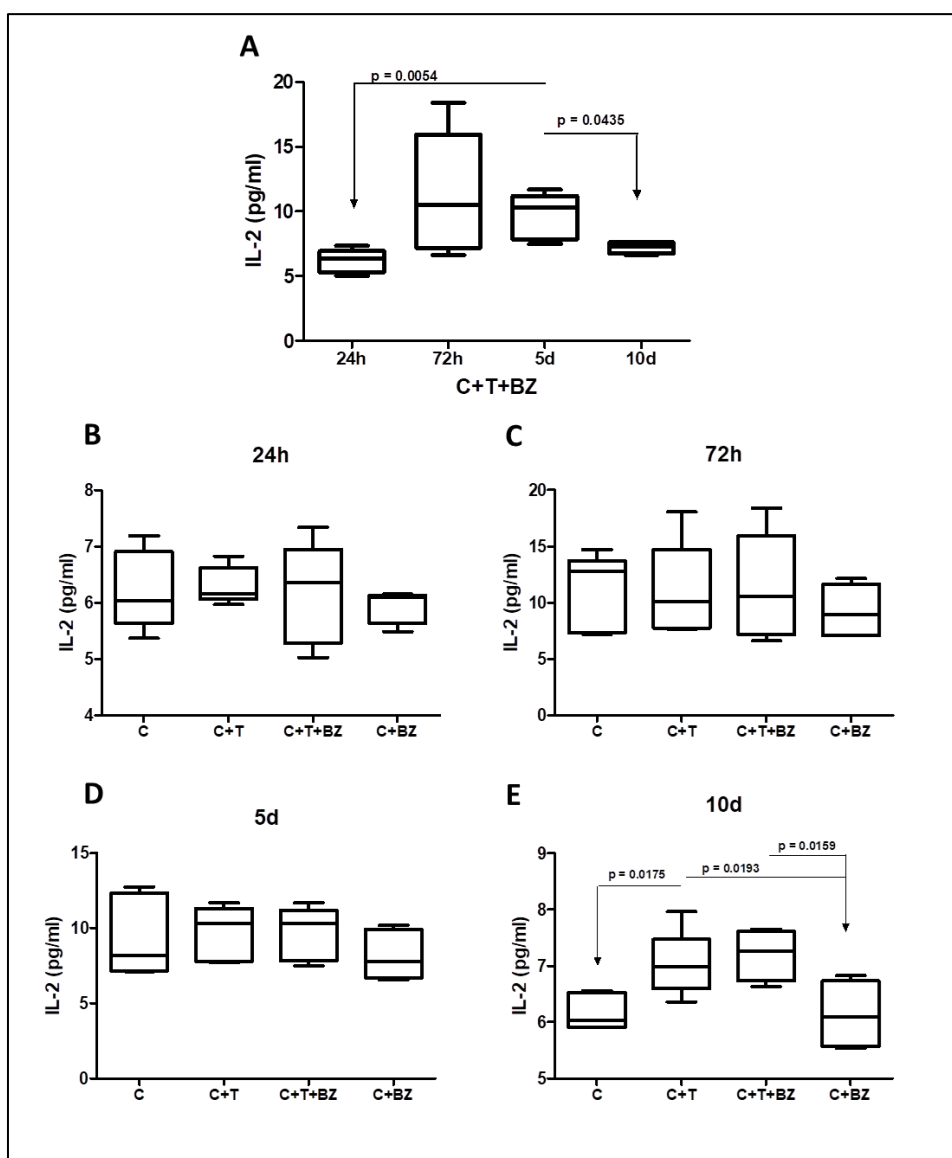
Na dosagem do IFN- γ foi demonstrado na condição experimental C + T + Bz (Fig. 5A) que a produção da citocina assumiu um padrão crescente no decorrer dos tempos avaliados, ocorrendo a maior produção nos tempos de 5d e 10d. Ao avaliarmos as condições de cultivo entre os tempos observados, demonstrado nas figuras 5B, 5C, 5D e 5E, foi possível notar que ocorre uma maior produção IFN- γ a partir do tempo de 72h, principalmente naquelas infectadas com a forma tripomastigota do *T. cruzi*, se comparada com as que não receberam esse tratamento.

Ao avaliarmos a citocina TNF na condição experimental C + T + Bz, nos tempos de cultivo verificados (Fig. 6A), foi observado que ocorreu um padrão decrescente na produção da citocina, alcançando a maior produção no tempo de 24h, se comparado aos demais tempos avaliados. Na observação das condições de cultivo durante os tempos observados (Fig. 6B, 6C, 6D e 6E) o

padrão de produção do TNF foi decrescente com o decorrer do tempo de cultivo, conforme já verificado na figura 6A.

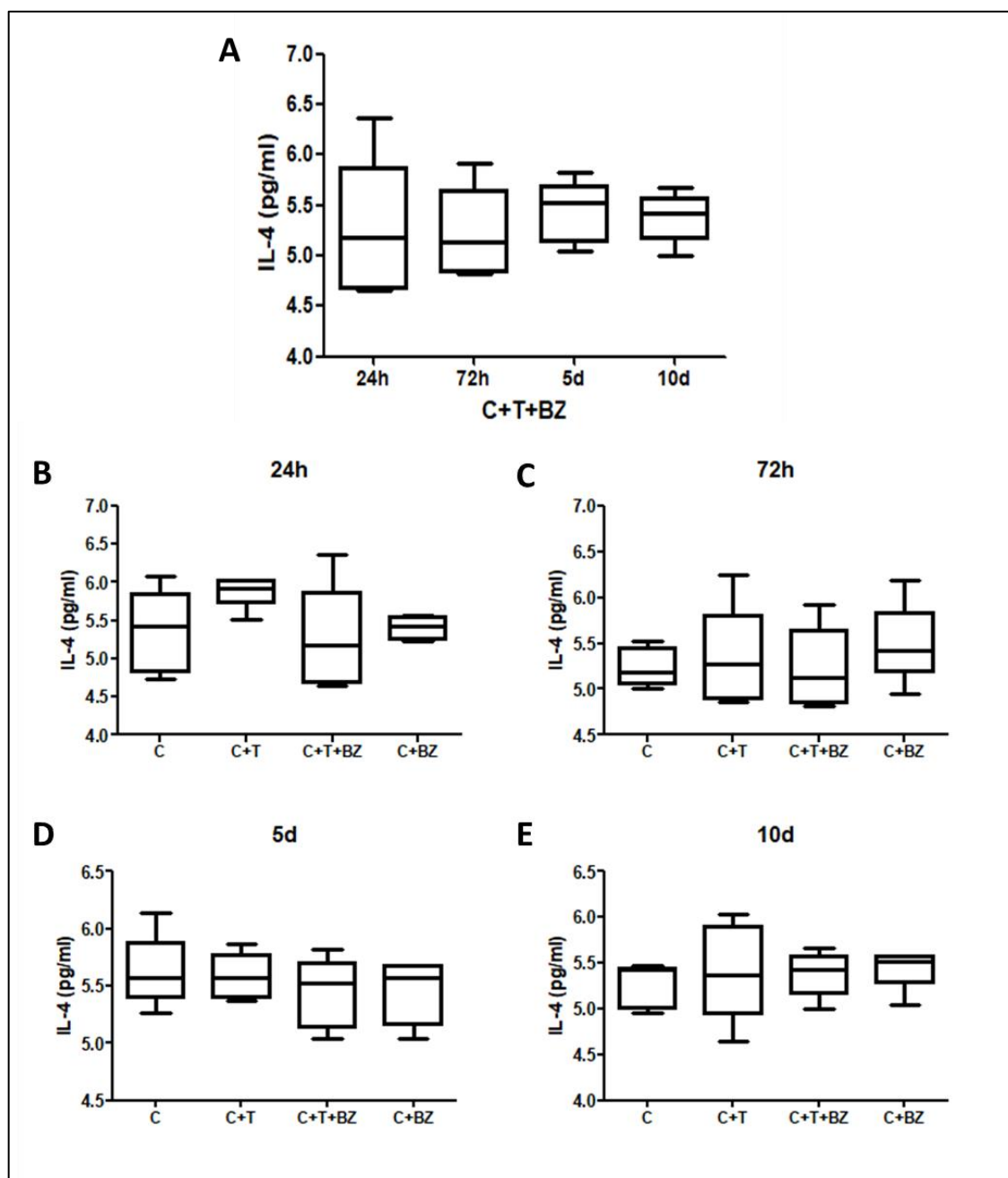
Após a análise dos resultados obtidos definimos com tempo padrão para os demais experimentos os tempos de 24h, 5d e 10d. Além disso, verificamos que a adição do Bz na condição de cultivo infectada pela CCol do *T. cruzi*, produziu manifestações imunológicas semelhantes as da condição não tratada, portanto adicionamos uma concentração com o dobro de Bz para verificar a resposta imunológica da CCol frente a uma concentração superior a da preconizada por Romanha et al. (2010).

Figura 1. Cinética tempo x resposta da citocina IL-2 no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



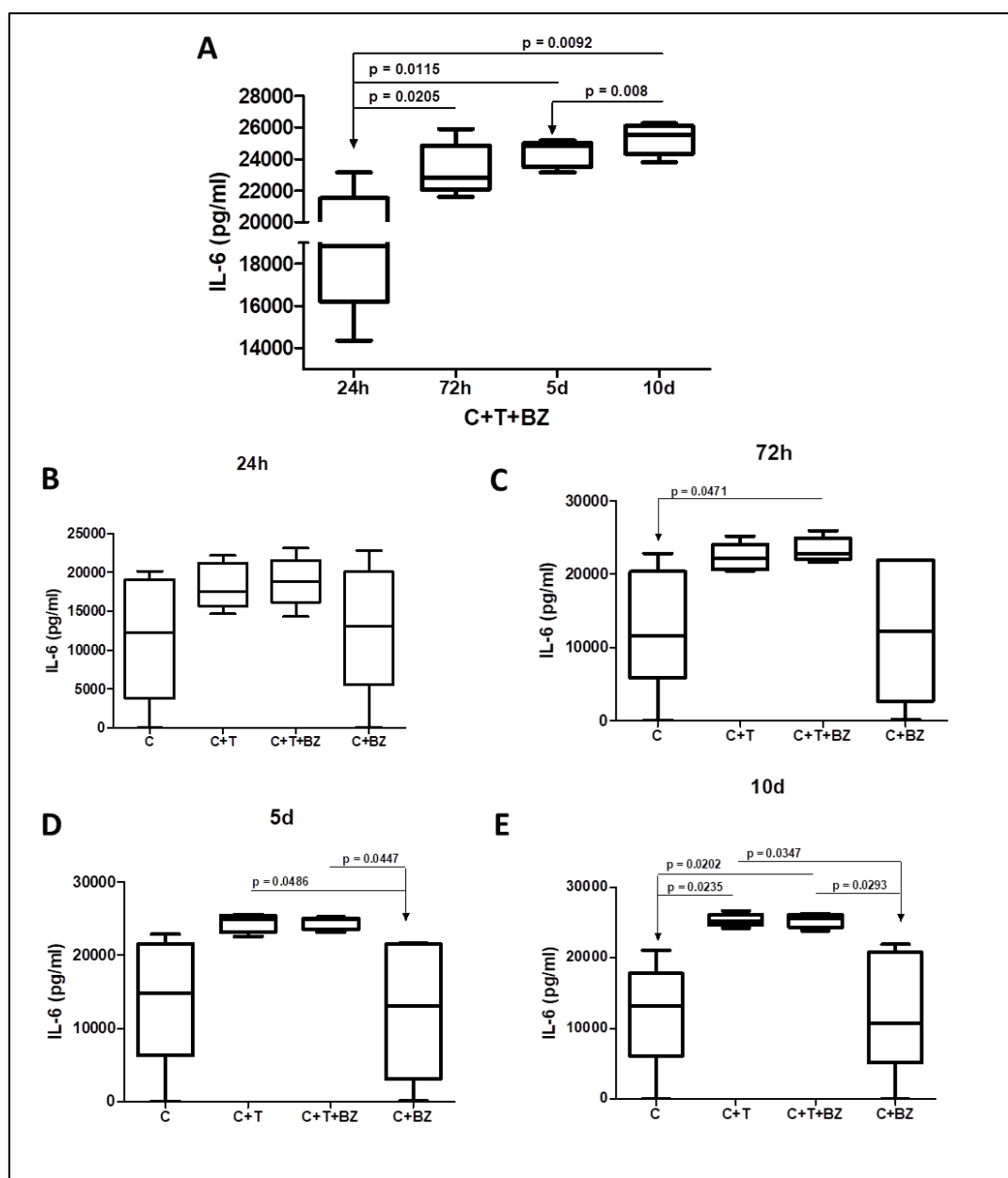
Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benzimidazol na concentração de 1µg/mL; C + BZ – Célula + Benzimidazol na concentração de 1µg/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

Figura 2. Cinética tempo x resposta da citocina IL-4 no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



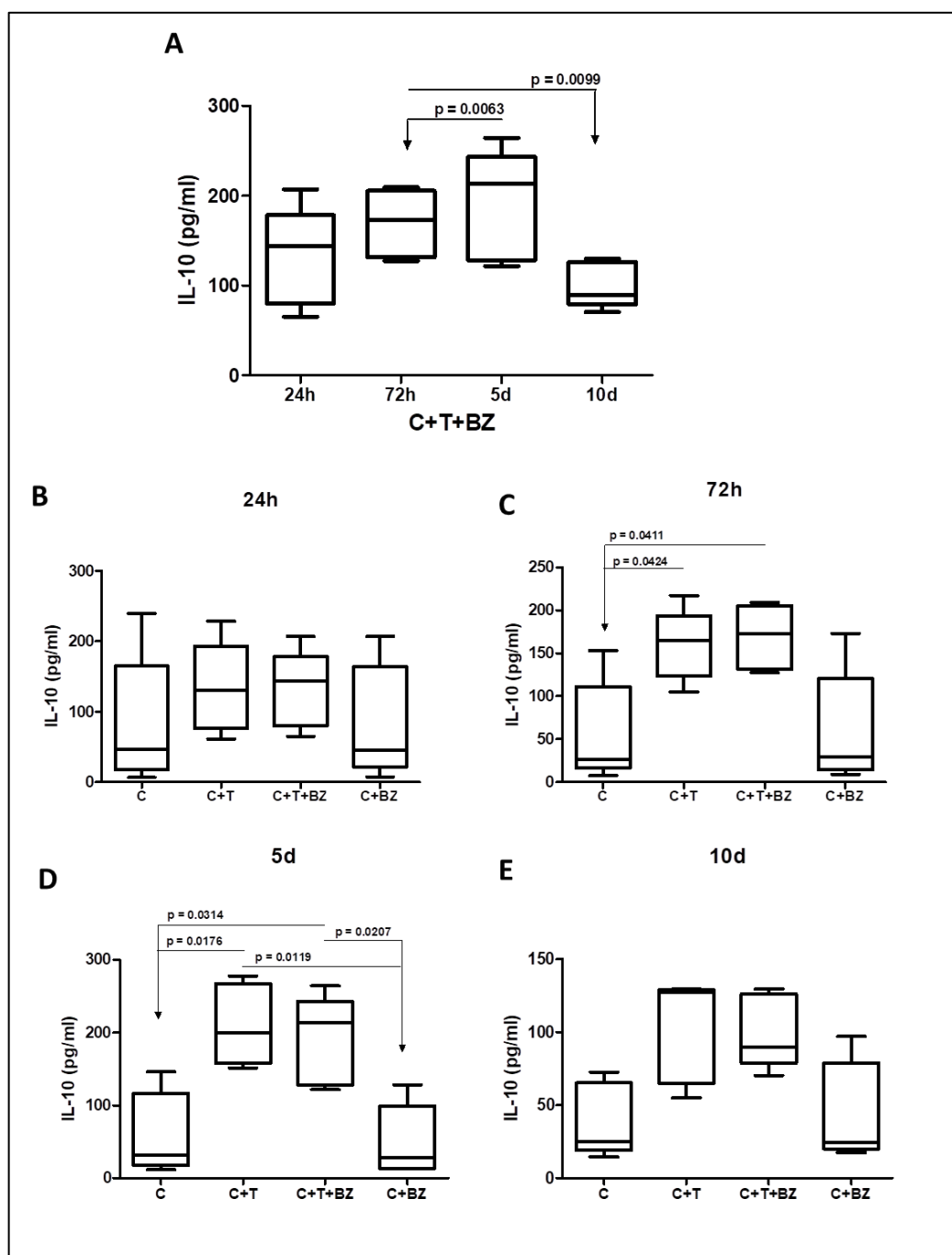
Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benznidazol na concentração de 1 μ g/mL; C + BZ – Célula + Benznidazol na concentração de 1 μ g/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.

Figura 3. Cinética tempo x resposta da citocina IL-6 no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



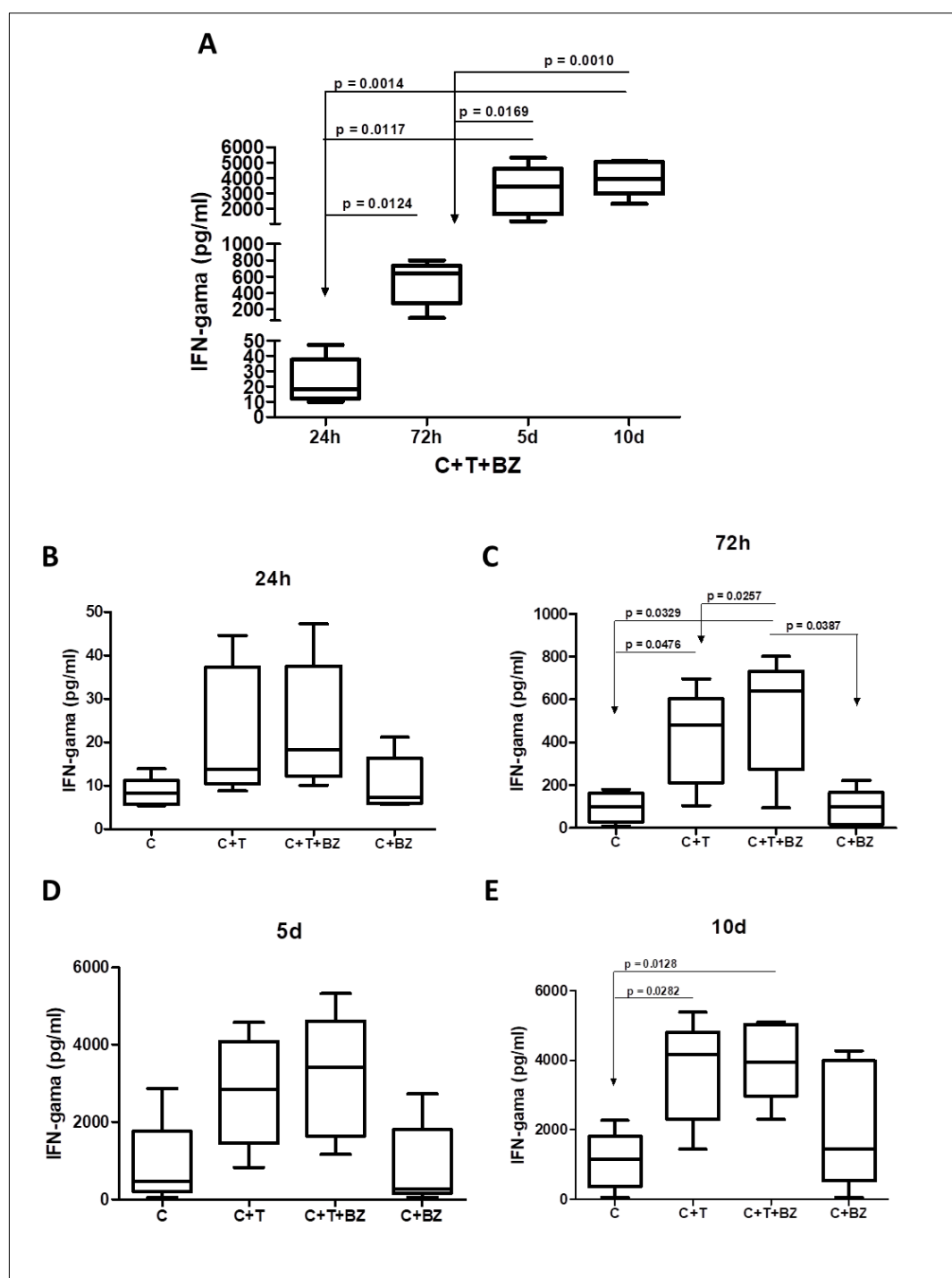
Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benzimidazol na concentração de 1 μ g/mL; C + BZ – Célula + Benzimidazol na concentração de 1 μ g/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

Figura 4. Cinética tempo x resposta da citocina IL-10 no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



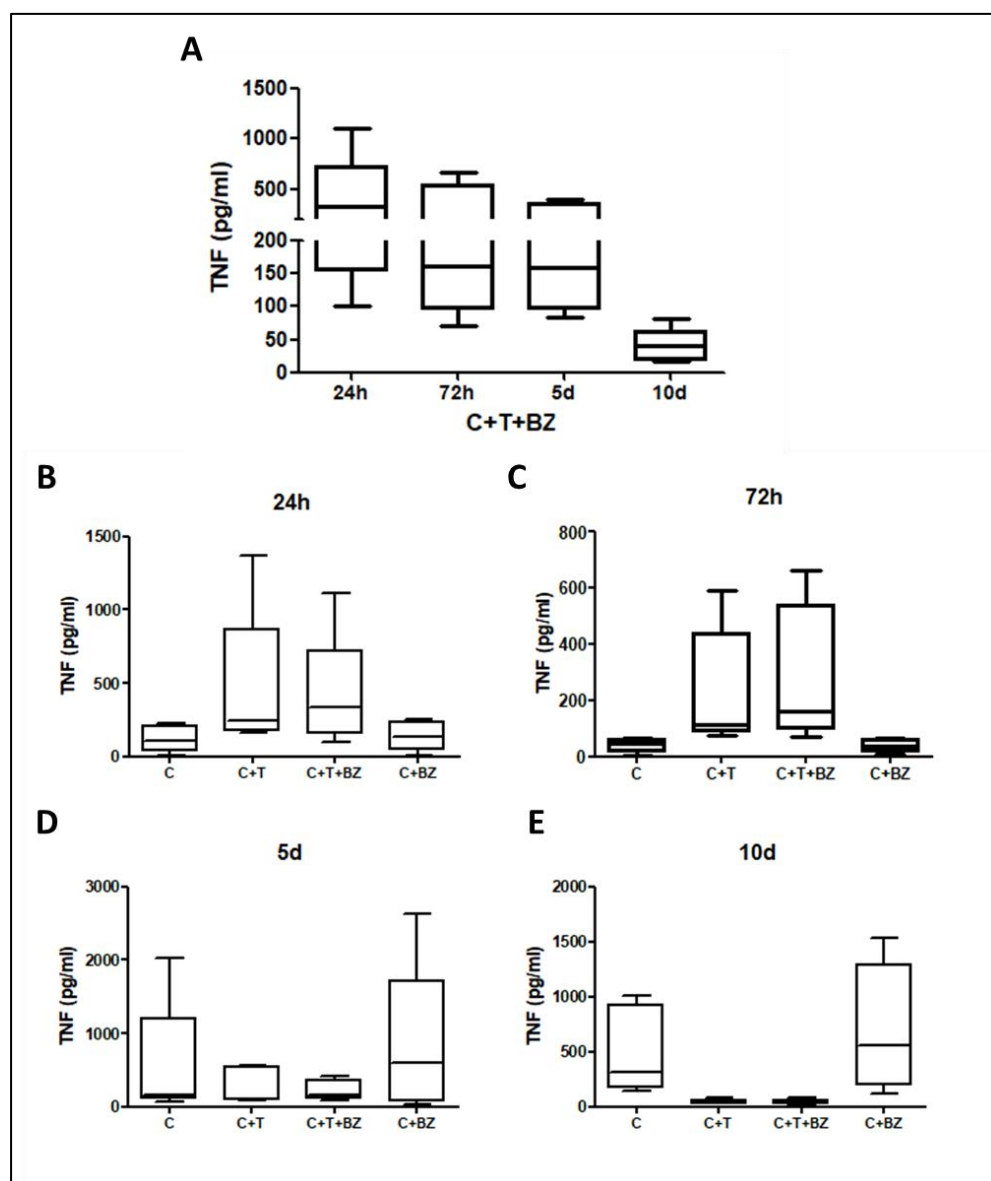
Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benzonidazol na concentração de 1 μ g/mL; C + BZ – Célula + Benzonidazol na concentração de 1 μ g/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

Figura 5. Cinética tempo x resposta da citocina IFN- γ no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benznidazol na concentração de 1 μ g/mL; C + BZ – Célula + Benznidazol na concentração de 1 μ g/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições de cada tempo de cultivo são indicadas por setas.

Figura 6. Cinética tempo x resposta da citocina TNF no sobrenadante de cultura do co-cultivo entre PBMC, tripomastigota da CCol e adição do tratamento com Bz..



Legenda: C – Célula; C+T – Célula + Tripomastigota; C+T+BZ – Célula + Tripomastigota + Benzonidazol na concentração de 1 μ g/mL; C + BZ – Célula + Benzonidazol na concentração de 1 μ g/mL. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/IAM

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

Pesquisador responsável: Virginia Maria Barros de Lorena.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 10/09/12

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 29/12

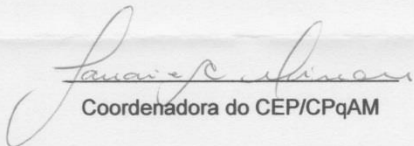
Registro no CAAE: 07511612.2.0000.5190

PARECER Nº 26/2013

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

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

Recife, 05 de junho de 2013.



Coordenadora do CEP/CPqAM

Observação:**Anexos:**

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

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

