

**FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE**  
**Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Diagnóstico Molecular**

**MICHELLE DA SILVA BARROS**  
**ÉRICK VIEIRA SOUZA**

**Projeto: Avaliação dos Receptores de TNF- $\alpha$  na Cardiopatia  
Chagásica Crônica**

**Recife**  
**2015**

**MICHELLE DA SILVA BARROS**  
**ÉRICK VIEIRA SOUZA**

**Projeto: Avaliação dos Receptores de TNF- $\alpha$  na Cardiopatia  
Chagásica Crônica**

Trabalho de Conclusão de Curso em forma de projeto de pesquisa, apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Diagnóstico Molecular da Faculdade Pernambucana de Saúde, para a obtenção do Título de Especialista.

**Orientador: Prof. Msc. Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho**  
**Co-Orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena**

**Recife**  
**2015**

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARROS, Michelle da Silva; SOUZA, Érick Vieira.

Título: Projeto: Avaliação dos Receptores de TNF- $\alpha$  na Cardiopatia Chagásica  
Crônica

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade Pernambucana de Saúde  
para obtenção do título de Especialista em Diagnóstico Molecular.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Banca Examinadora

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, ressaltando a expansão da doença para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios.

A evolução clínica dos indivíduos não é previsível, onde 20-30% desenvolvem a forma cardíaca, 8-10% apresentam a forma digestiva, mas a maioria dos pacientes (cerca de 50-60%) permanecem na forma indeterminada (sem sinais e sintomas) Nesse sentido, investigações que elucidem o potencial evolutivo da doença de Chagas por meio do desenvolvimento de marcadores biológicos ou clínicos devem ser assumidas a fim de contribuir com novos estudos de condutas terapêuticas, melhorando a qualidade de vida dos doentes.

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune desta infecção e seguramente estão envolvidas na imunopatogênese da doença de Chagas. O TNF- $\alpha$  é um mediador importante de inflamação e consequentemente das respostas celulares frente aos microrganismos com múltiplas funções biológicas incluindo citotoxicidade às células tumorais e células infectadas por vírus, ações imunomodulatórias, atividade antiviral e início dos mecanismos de respostas inflamatórias.

Estudos mostram que camundongos deficientes em TNFR1 e infectados pelo *T. cruzi* apresentam maior parasitemia e mortalidade cumulativa quando comparado aos animais do grupo controle, reafirmando o papel benéfico do TNF- $\alpha$  na infecção aguda. Por outro lado, esses animais também apresentam uma exacerbação do quadro inflamatório. Outro estudo demonstrou que os níveis de TNF- $\alpha$  e sTNFR2 estão elevados e associados à parasitemia em camundongos infectados, indicando que receptores estejam regulando a atividade da citocina.

Apesar de avanços sobre os mecanismos de atuação e regulação dos receptores de TNF, pouco se conhece sobre o papel dessas moléculas na imunopatogênese doença e acreditamos que a expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  nas células da resposta imune, bem como a presença de formas solúveis desses receptores, possa ter papel relevante na manutenção dos mecanismos regulatórios exercidos pelos indivíduos portadores da forma indeterminada da doença de Chagas

crônica. A partir disso, temos por objetivo, avaliar a expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  na cardiopatia chagásica crônica.

Serão selecionados 60 portadores crônicos da doença de Chagas atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Osvaldo Cruz (HUOC), da Universidade de Pernambuco (UPE) e 20 indivíduos não portadores da doença. . Avaliaremos no contexto *ex vivo* a frequência de receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) na superfície de linfócitos T CD4, CD8 e de monócitos CD14 por citômetria de fluxo. Além disso, quantificaremos os receptores solúveis de TNF (TNFR1 e TNFR2) e a citocina TNF- $\alpha$  em amostras de soro por *Cytometric Bead Array* (CBA). Os dados da expressão de mTNFR e sTNFR e da citocina TNF- $\alpha$  serão correlacionados com os graus de gravidade da cardiopatia chagásica pelo percentual da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE).

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz-PE. Os experimentos serão realizados no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia do CPqAM. Este estudo faz parte de um subprojeto, coordenado pela pesquisadora Virginia Maria Barros de Lorena (CPqAM/Fiocruz) e possui financiamento do CNPq (DECIT/CNPq 40/2012 Pesquisa em Doenças negligenciadas - 403979/2012-9).

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; citocinas; TNF- $\alpha$

# Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	Geral .....	11
3.2	Específicos.....	11
4	METODOLOGIA .....	11
4.1	População de estudo.....	11
4.2	Coleta de sangue .....	12
4.3	Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
4.4	Avaliação <i>ex vivo</i> da frequência de Receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) em linfócitos T CD4, CD8 e monócitos CD14 .....	13
4.5	Quantificação de receptores solúveis de TNF (TNFR1 e TNFR2) e TNF- $\alpha$ em amostras de soro por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	13
4.6	Análises estatísticas.....	14
4.7	Aspectos éticos .....	14
5	VIABILIDADE.....	14
6	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO .....	15
7	REFERÊNCIAS .....	16

## 1 INTRODUÇÃO

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

Apesar dos 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas continua sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, acarretando, assim, um importante problema de saúde pública, com uma estimativa de indivíduos infectados no mundo em torno de 8 milhões de pessoas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009; SCHOFIELD *et al.*, 2006). Entretanto, tem-se evidenciado o aumento no número de infectados em muitas partes da Europa e do oeste do Pacífico, ressaltando a expansão da doença para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS, 2007).

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

A evolução clínica dos indivíduos portadores da doença de Chagas não é previsível. Cerca de 20-30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca (CARD), caracterizada pela cardiopatia chagásica, e 8-10% apresentam a forma digestiva (DIG), caracterizada por vários graus de alterações anatômicas e

funcionais do esôfago e/ ou do cólon (DIAS, 1989). Por outro lado, a maioria dos pacientes (cerca de 50-60%) são portadores da forma indeterminada (IND), e não apresentam sinais e sintomas relacionados com o coração e o sistema digestivo, podendo ou não evoluir para as formas clínicas sintomáticas descritas acima. Isto vem despertando grande interesse entre médicos e pesquisadores, pois talvez seja nesta fase que se elucide a determinação da evolução do indivíduo. Muitos são os mecanismos envolvidos que levam às formas graves da doença e sua morbidade. A ausência de sintomatologia pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune anti-*T. cruzi*. Entretanto, devido à complexidade da resposta imunológica na doença de Chagas, esse processo pode também contribuir para os danos inflamatórios causados pela doença (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Este aspecto da evolução clínica ainda é muito obscuro e por isso, existe a carência de um manejo clínico específico (conduta de acompanhamento clínico e de terapêutica universais) para os pacientes portadores da forma IND. Nesse sentido, investigações que elucidem o potencial evolutivo da doença de Chagas através de estudos longitudinais em pacientes infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, por meio do desenvolvimento de marcadores biológicos ou clínicos, devem ser assumidas por grupos de pesquisas, a fim de contribuir com novos estudos de condutas terapêuticas, melhorando a qualidade de vida dos doentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Porém, esses mecanismos imunológicos que levam aos danos tissulares nos indivíduos que possuem as formas clínicas sintomáticas ainda são pouco conhecidos, bem como para a ausência de sintomatologia em indivíduos portadores da forma IND.

A resposta imune do tipo Th1, tem sido descrita por contribuir para o controle dos níveis de parasitemia e aumento da sobrevivência de camundongos infectados (ALIBERTI et al., 1996; MARTINS, 1999). Por outro lado, as citocinas do tipo Th2, são relatadas por sustentar o parasitismo e por tornar o camundongo mais susceptível à infecção chagásica (REED et al., 1994; ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Porém, a divisão dos aspectos protetores e lesivos no paradigma Th1 x Th2 nunca chegou a ser estabelecido na doença de Chagas humana.

Não há dúvidas que as citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e seguramente estejam envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia das doenças. O fator

de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  é um mediador importante de inflamação e conseqüentemente das respostas celulares frente aos microrganismos com múltiplas funções biológicas incluindo citotoxicidade às células tumorais e células infectadas por vírus, ações imunomodulatórias, atividade antiviral e início dos mecanismos de respostas inflamatórias (VILCEK; LEE, 1991). O TNF exerce suas funções através de sua ligação a dois diferentes receptores: TNFR1 (CD120a), que é constitutivo, presente em baixos níveis de expressão em todas as células nucleadas; e o TNFR2 (CD120b), que é regulado e é expresso em células da linhagem mielóide, células T periféricas e macrófagos e linfócitos alveolares (GEHR et al., 1992; ZOLA; FLEGO; WEEDON, 1993). Os receptores de TNF- $\alpha$  são produzidos como uma proteína transmembrana (mTNFR), que sendo clivada por proteases liberam os ligantes solúveis (sTNFR) (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). O TNFR1 pode ser ativado por ambas as formas de TNF (mTNFR e sTNFR), enquanto que o TNFR2 é eficientemente ativado apenas por mTNFR, apesar de se ligar ao sTNFR com alta afinidade (GRELL et al., 1995).

Por outro lado, os receptores solúveis de TNF apresentam-se constitutivamente no soro, mas seus níveis se elevam significativamente em condições inflamatórias, ou seja, eles são desprendidos da superfície celular em resposta ao mesmo estímulo inflamatório que induz a produção do TNF- $\alpha$  (PORTEU; NATHAN, 1990). Alterações na expressão de receptores de TNF na superfície das células não apenas modifica a responsividade das células ao TNF- $\alpha$ , mas também altera a disponibilidade dos receptores solúveis. É importante destacar que as formas solúveis dos receptores podem atuar de duas maneiras ao ligar-se com o TNF- $\alpha$ . Em altas concentrações, os receptores inibem a bioatividade do TNF- $\alpha$  por competir com os receptores presentes na membrana das células. Em baixas concentrações, eles podem estabilizar a estrutura da citocina, aumentando seu tempo de meia-vida e agindo como um reservatório de TNF- $\alpha$  (DEROUICH-GUERGOUR et al., 2001). Camundongos deficientes em TNFR1 e infectados pelo *T. cruzi* apresentam maior parasitemia e mortalidade cumulativa quando comparado aos animais do grupo controle, reafirmando o papel benéfico do TNF- $\alpha$  na infecção aguda (CASTANOS-VELEZ et al., 1998). Mas, esses animais também apresentam uma exacerbação do quadro inflamatório. Outro estudo demonstrou que os níveis de TNF- $\alpha$  e sTNFR2 estão elevados e associados à parasitemia em camundongos infectados, resultando na formação de um complexo receptor-citocina, onde níveis

de neutralização da atividade da citocina foram detectados, indicando que receptores estejam regulando a atividade da citocina (TRUYENS et al., 1999).

Apesar de avanços sobre os mecanismos de atuação e regulação dos receptores de TNF, pouco se conhece sobre o papel dessas moléculas na imunopatogênese doença de Chagas humana.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Embora os mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas não estejam bem esclarecidos e, conseqüentemente, pouco foi estabelecido sobre a evolução dos indivíduos da forma IND para as formas clínicas sintomáticas da doença, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a resposta celular, visando a identificação de marcadores biológicos que pudessem auxiliar no prognóstico da doença. Um estudo longitudinal com seguimento do grupo de indivíduos da forma IND se faria necessário se este perfil de resposta imune diferenciado fosse devidamente confirmado. Desta forma, mecanismos capazes de bloquear ou amenizar o desenvolvimento das formas mais graves da doença, como por exemplo, estratégias de tratamento durante a fase crônica da doença, poderiam melhorar a qualidade vida dos pacientes. Estratégias terapêuticas visando a regulação da resposta imune celular e da modulação de componentes inflamatórios, associado à única droga anti-parasitária disponível, o Benzonidazol, possuem favoráveis expectativas para terapia dos indivíduos portadores da doença.

Devido aos poucos achados na literatura sobre o papel dos receptores de TNF- $\alpha$  na infecção chagásica, esperamos entender a atuação do TNFR1 (CD120a) e TNFR2 (CD120b) em células da resposta imune de sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas IND e CARD com graus distintos de insuficiência cardíaca. Acreditamos que a expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  nas células da resposta imune, bem como a presença de formas solúveis desses receptores, possa ter papel relevante na manutenção dos mecanismos regulatórios exercidos pelos indivíduos portadores da forma IND da doença de Chagas crônica. Estudos com essa finalidade são recomendados pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005) e pelo Programa Integrado em Doença de Chagas (PIDC/Fiocruz), do qual nosso grupo é participante ativo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  na cardiopatia chagásica crônica.

#### **3.2 Específicos**

- a) Identificar a frequência dos receptores de membrana do TNF (mTNF) (TNFR1 e TNFR2), em linfócitos T CD4+ e CD8+, bem como em monócitos CD14+ em portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD através de citometria de fluxo no contexto *ex vivo*;
- b) Detectar os níveis de receptores solúveis de TNF (sTNF) (TNFR1 e TNFR2) e da citocina TNF- $\alpha$  em amostras de soro de portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD através de *Cytometric Bead Array (CBA)*;
- c) Correlacionar os níveis de mTNF e sTNF com os graus de gravidade da cardiomiopatia chagásica.

### **4 METODOLOGIA**

#### **4.1 População de estudo**

Serão selecionados 60 portadores crônicos da doença de Chagas atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Osvaldo Cruz (HUOC), da Universidade de Pernambuco (UPE). Atualmente, o ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos pacientes portadores da doença de Chagas. Para sua inclusão no estudo, os pacientes preencherão 3 critérios: realização dos exames clínicos (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago) para a classificação clínica, sorologia reagente para a infecção chagásica, segundo o Ministério da Saúde (2005) e não ter sido submetido ao tratamento etiológico. Assim, os indivíduos serão incluídos no estudo de acordo com os estágios de envolvimento

cardíaco: A (n=20), B1 (n=20) e C (n=20), estabelecidos pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Os valores de fração de ejeção ventricular esquerda serão adquiridos através da realização do ecocardiograma. A avaliação dos critérios de inclusão será realizada em conjunto com médicos colaboradores deste projeto, sendo estes responsáveis pelo acompanhamento e tratamento dos portadores da doença de Chagas. Além disso, 20 indivíduos não portadores da doença de Chagas serão incluídos no estudo.

#### **4.2 Coleta de sangue**

Nove mililitros de sangue serão coletados em tubos contendo heparina sódica para realização de fenotipagem celular. Além disso, cinco mililitros de sangue serão coletados em tubo seco para obtenção de soro. Após retração do coágulo, os tubos serão centrifugados (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente [TA]) e alíquotas de soro serão devidamente identificadas e armazenadas a -20°C na soroteca de doença de Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz.

#### **4.3 Confirmação da sorologia para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Serão utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica com registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial *Test Elisa Chagas III* (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile). Sua microplaca é sensibilizada com lisado total das cepas de *T. cruzi* Tulahuén e Mn, incluindo antígenos de membrana altamente imunogênicos. E o outro, denominado Elisa recombinante, kit comercial *Imuno-Elisa Wama* (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil), que utiliza antígenos recombinantes purificados. A metodologia será realizada conforme orientações dos fabricantes. Os resultados serão interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentarem reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentarem reatividade (Ministério da Saúde, 2005). Amostras que se mantiverem discordantes mesmo após repetição dos testes serão interpretadas com inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

#### **4.4 Avaliação *ex vivo* da frequência de Receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) em linfócitos T CD4, CD8 e monócitos CD14**

Serão depositados 100µl do sangue total em tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados, contendo os anticorpos monoclonais de superfície (anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD14 conjugados a FITC, anti-TNFR1 conjugados a APC e anti-TNFR2 conjugados a PE) previamente titulados, por 30' a TA. Após a incubação, os eritrócitos serão lisados e uma lavagem com PBS + BSA 0,5% seguida de centrifugação (300 x g por 5 minutos a TA) será realizada. As células serão fixadas com 200µL de BD Cytotfix™ (BD Biosciences®). Os tubos serão estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises serão realizadas através do *Software* Cell Quest Pro (Beckton Dickson)

#### **4.5 Quantificação de receptores solúveis de TNF (TNFR1 e TNFR2) e TNF-α em amostras de soro por *Cytometric Bead Array* (CBA)**

Os níveis de receptores solúveis de TNF (TNFR1 e TNFR2) e TNF-α serão quantificados através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) Flex, seguindo as instruções do fabricante (Beckton Dickson). Primeiramente, 25 µL da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais (anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti- TNF-α) serão transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Em seguida, 25 µL das amostras de soro serão adicionados por 3h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente serão adicionados 25 µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugadas à *Phycoerythrin* por 2h à TA e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* serão lavadas e 300 µL de solução tampão serão adicionados para ressuspender às esferas. As *beads* serão adquiridas dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises serão realizadas através do *Software* FCAP Array versão 3.01 (Beckton Dickson).

#### **4.6 Análises estatísticas**

A análise estatística será realizada através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). Para confirmação do pressuposto de homogeneidade utilizaremos o teste de Bartlett. Desta forma, para amostras homogêneas com curva de distribuição normal, a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, serão realizados para comparação das médias de expressão de moléculas de superfície (Receptores de TNF) e de TNF- $\alpha$  entre os grupos. Quando diante da heterogeneidade das amostras, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns, serão realizados. A avaliação das correlações entre TNFR1, TNFR2 e TNF- $\alpha$  será realizada através do teste de correlação de Pearson. Todas as conclusões serão tomadas ao nível de significância de 5%.

#### **4.7 Aspectos éticos**

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do CPqAM/Fiocruz-PE. Os dados que os identifiquem serão mantidos em absoluto sigilo e, ao invés do nome, o material biológico recebeu um código numérico, mantendo, desta forma, a confidencialidade dos dados.

### **5 VIABILIDADE**

Os experimentos serão realizados no Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC), localizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE). Este Serviço de Referência realiza diagnóstico de alta complexidade e atende a demanda de hospitais e centros de saúde de Recife/PE e região metropolitana, tendo como principal demandante o Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) da UPE, local de referência regional para avaliação e tratamento da endemia. Todos os insumos necessários para a coleta de sangue e estocagem do soro estão disponíveis em nosso laboratório. Além disso, Os marcadores de superfície CD4, CD8 e CD14 também já estão disponíveis, bem como uma parte da quantidade suficiente dos receptores mTNFR1 e mTNFR2. Também já adquirimos o CBA Flex para avaliação dos receptores de sTNF e da citocina TNF- $\alpha$ . Este projeto faz parte de um subprojeto, coordenado pela

pesquisadora Virginia Maria Barros de Lorena (CPqAM/Fiocruz) intitulado “Identificação de Biomarcadores de progressão/prognóstico em portadores da doença de Chagas crônica”, inserido em um projeto maior intitulado “Cardiomiopatia chagásica crônica: prospecção de biomarcadores de progressão em portadores da doença de Chagas, testes pré-clínicos de novas drogas tripanossomicidas e efeitos terapêuticos da associação de medicamentos”, coordenado pela pesquisadora Joseli Lannes Vieira (IOC/Fiocruz), com financiamento do CNPq (DECIT/CNPq 40/2012 Pesquisa em Doenças negligenciadas - 403979/2012-9).

## 6 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	2016				2017			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Seleção dos pacientes	X	X	X	X	X	X		
Realização do diagnóstico sorológico		X	X	X	X	X		
Avaliação <i>ex vivo</i> da frequência de Receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) em linfócitos TCD4, TCD8 e monócitos CD14			X	X	X	X		
Quantificação de receptores solúveis de TNF e TNF- $\alpha$ em amostras de soro					X	X		
Análise dos dados					X	X	X	
Elaboração de relatórios e artigos científicos					X	X	X	X
Redação da Dissertação					X	X	X	X

## 7 REFERÊNCIAS

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

ALIBERT, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 64 (5): 1961-1967, 1996.

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

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

CASTANOS-VELEZ et al. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect Immun* 66: 2960-2968, 1998.

DEROUICH-GUERGOUR et al. Tumour necrosis factor  $\alpha$  receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J. Parasitol* 33: 763-769, 2001.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* 22 (3): 147-156, 1989.

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

DUTRA, O. D.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Cur. Opin. Infect. Dis.* 21: 287-292, 2008.

GEHR, G. Et AL., Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. *J. Immunol* 149: 911-917, 1992.

GRELL, M. et al. The transmembrana form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80KDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802, 1995.

MARTINS, G. A. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of

*Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. Infect. Immun. 67 (3):3864-3871, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Rev Soc. Bras. Med. Trop. 38, supl. III, 29p. 2005.

PORTEU, F.; NATAN, C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. J. Exp. Med. 172: 599-607, 1990.

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

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 153: 3135-3140, 1994.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, supl. 1, p. 75-85, 2007.

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

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

TRUYENS, C. et al. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 67: 5579-5586, 1999.

VILCEK, J.; LEE, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J. Biol. Chem 266: 7313-7316, 1991.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor Necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 10: 45-65, 2003.

ZOLA H; FLEGO, L.; WEEDON, H. Expression of membrane receptor for tumor necrosis factor on human blood lymphocytes. Immunol Cell Biol 71: 281-288, 1993.