



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

Kamila Kássia dos Santos Oliveira

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VENENO DE *Bothrops erythromelas* EM CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS COM *Trypanosoma cruzi*

RECIFE-PE
2018

Kamila Kássia dos Santos Oliveira

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VENENO DE *Bothrops erythromelas* EM CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS COM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena
(Instituto Aggeu Magalhães - IAM/Fiocruz)

Co-orientadora: Dr^a Karla Patrícia de Oliveira Luna
(Universidade Estadual da Paraíba - UEPB)

RECIFE-PE
2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- O48i Oliveira, Kamilla Kássia dos Santos.
 Investigação da resposta imune induzida por veneno de *Bothrops erythromelas* em cultura de células mononucleares infectadas com *Trypanosoma cruzi* / Kamilla Kássia dos Santos Oliveira. – 2018.
 107 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.
- Inclui referências, apêndices e anexos.
1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Veneno. 3. Citocinas. 4. Imunidade celular.
 I. Lorena, Virginia Maria Barros de (Orientadora). II. Título.

616.9363

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-158)



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

KAMILA KÁSSIA DOS SANTOS OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VENENO DE *Bothrops erythromelas* EM CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES INFECTADAS COM *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovada em: 22/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Vláudia Maria de Assis Costa
Departamento de Medicina Tropical/UFPE
(Examinadora Interna)

Prof^ª. Dr^ª. Leuridan Cavalcante Torres
Departamento de Saúde Integral do Instituto Medicina Integral Prof. Fernando Figueira/IMIP
(Examinadora Externa)

Prof^ª. Dr^ª. Taciana Mirely Maciel Higino
Centro Especializado em Reabilitação/CER/FAV
(Examinadora Externa)

*A rainha da minha vida: minha mãe Kátia.
A meu pai Janduir Oliveira (in memorian), pelo alicerce que eles construíram em
minha vida acadêmica e profissional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Pelas suas bênçãos derramadas em minha vida. Por estar sempre ao meu lado protegendo, guiando, iluminando e dando discernimento necessário em toda minha trajetória de vida. Obrigada, Jesus!

A minha mãe Kátia,

Pela sua dedicação. Por fazer o seu melhor sempre. Pelos ensinamentos e renúncias muitas vezes só para ver um sorriso em meu rosto. Sem tantas palavras, porque simplesmente eu te amo dia a dia. Te amo mais que tudo!

Ao meu eterno paiinho Janduir,

Por todos ensinamentos acadêmicos e de vida. Minha eterna inspiração e exemplo de grande mestre (*in memoriam*).

A Zeliclécio,

Por me ensinar pacientemente a encarar a vida com perseverança e coragem. Por todo incentivo e ajuda quando eu preciso. Amo-te.

A todos professores que me ajudaram a chegar até aqui,

Em especial a professora/amiga Joelma Souza, pelas orientações desde a graduação. Por ensinar muito mais que conhecimentos imunológicos, mas principalmente ensinar a enxergar o caminho que hoje estou percorrendo. Sem sua ajuda, com certeza nada disso teria acontecido. Amo você, Jo.

A minha queridíssima orientadora Virginia Lorena,

Por me acolher com tanto amor, dedicação e presteza.

Por ser essa orientadora amiga que tantos querem ter. Com você tudo foi mais simples e sem dificuldades. Nos momentos que pensei que não iria conseguir, você me mostrou a simplicidade das soluções. Aprendi como lição de vida! Pois é, que sorte é a minha dividir esse momento da vida científica com você. Amo-te, Vivi.

A minha segunda orientadora, Karla Luna (Kaly),

Por confiar no meu empenho e ajudar a desenvolver esse projeto lindo e desafiador;

Por fornecer sempre que precisamos, o material biológico para a pesquisa. Por toda orientação, você foi essencial para o sucesso do trabalho. Sou eternamente grata.

A Mineo Nakazama,

Pela colaboração na rotina de trabalho e pelo incentivo diário.

A minha amiga Leyllane Moreira,

Simplesmente pela sua amizade verdadeira. Quando eu precisei, você esteve ao meu lado, apoiando, incentivando e motivando. Leyllinha, por todos ensinamentos compartilhados, também agradeço. Por todos abraços, por chorar junto comigo, por compartilhar os momentos mais ímpares deste trabalho. Com você tudo foi mais fácil. Sua amizade é o prêmio valioso dessa jornada. Amo muito!

A Michelle Barros,

Por compartilhar esse momento em minha vida e sempre ser disposta a ajudar através de palavras ou ações. Pela sua sinceridade e amizade. Amo você, Mish.

Ao Grupinho Chagas,

Pelas discussões científicas e momentos de descontração. Com vocês meus dias se tornaram mais suaves. Em especial a Diego Lira, pela contribuição nos experimentos.

A todos colegas da turma de mestrado,

Em especial ao nosso representante Jorge Belém, pelos momentos compartilhados em sala de aula, seminários, discussões, almoços e momentos de descontração.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Vladia Costa, Dra. Clarice Moraes e Dra. Camila Carvalho,

Pelas valiosas críticas e sugestões.

A toda minha família,

Pelo apoio e incentivo.

A meu tio Carlos Gomes e família (Maisa, Estevão e João Paulo),

Por me acolherem em sua casa. Conviver esses anos com vocês foi de grande amadurecimento pessoal. Amo vocês!

A todos amigos,

Pelas orações, palavras de fé e incentivo.

Ao Laboratório de Pesquisa Translacional e aos colegas,

Pela oportunidade de contribuir e aprender fazer ciência.

Pelo incentivo de cada um, desde o momento decisivo em fazer a pós-graduação; Por dividir experiências e compartilhar comigo a vitória da aprovação no mestrado.

A Universidade Federal de Pernambuco,

Pela oportunidade em conhecer um pouco mais sobre as doenças tropicais.

Ao Museu vivo répteis da caatinga,

Por ceder o veneno para o estudo.

Instituto Aggeu Magalhães – IAM/FIOCRUZ, Pernambuco,

Por toda infraestrutura e recursos fundamentais para realização do estudo.

CNPq,

Pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

Muito obrigada!

*Nada é pequeno se feito com amor.
(Santa Teresinha do Menino Jesus)*

OLIVEIRA, Kamila Kássia dos Santos. **Investigação da resposta imune induzida por veneno de *Bothrops erythromelas* em cultura de células mononucleares infectadas com *Trypanosoma cruzi***. 2018. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que é transmitido aos seres humanos e a outros mamíferos por insetos triatomíneos contaminados. A única terapia disponível para o tratamento da DC no Brasil é o Benzonidazol (Bz), porém, a eficácia desse fármaco é variável, pois induz uma resposta inflamatória e causa efeitos colaterais aos pacientes. Por outro lado, o Bz associado com outras drogas é capaz de aumentar a eficácia do tratamento. Neste contexto, o veneno de serpentes tem mostrado atividades tripanocidas, todavia, os mecanismos imunológicos ainda não foram esclarecidos. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) sobre a resposta imune induzida em cultura de células mononucleares infectadas com formas tripomastigotas do *T. cruzi* e tratadas *in vitro* com o veneno da serpente através da detecção de citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias). Sangue de indivíduos não portadores da doença de Chagas foi coletado em tubos de heparina para centrifugação por gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque onde as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram separadas e infectadas com formas tripomastigotas Cepa Y de *T. cruzi*, seguida de adição do Bz e veneno de *B. erythromelas* às culturas. Após o tempo de cultivo, os sobrenadantes foram estocados para posterior análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF por *Citometric Beads Array* (CBA). As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ (em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) e das moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ (em monócitos CD14⁺). Quanto à produção de citocinas os resultados mostraram que o veneno diminuiu a expressão de citocinas em todas as condições de ensaio em comparação aos controles. Porém, o tratamento com veneno induziu aumento da expressão de CD28⁺ em linfócitos TCD4⁺; e em monócitos CD14⁺, aumento da expressão das moléculas de ativação CD80⁺ e HLA-DR⁺ demonstrando que o veneno induz ativação dessas células. Por outro lado, o veneno induziu aumento da expressão de CTLA-4⁺ em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ indicando que pode conduzir a um controle da ativação exacerbada dessas células.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma cruzi*. Veneno. Citocinas. Imunidade celular.

OLIVEIRA, Kamila Kássia dos Santos. **Investigation of the immune response induced by *Bothrops erythromelas* venom in cultured of mononuclear cells infected with *Trypanosoma cruzi*.** 2018. Dissertation (Master in Tropical Medicine) – Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, 2018.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is an infection caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which affects human beings and other mammals by contaminated triatomine. The only therapy available for CD disease is the Benzonidazol (Bz), although the efficacy of this drug varies, because it induces an inflammatory response and cause collateral effects to the patients. On the other side, Bz associated to other drugs is capable of raising the efficacy of the treatment. In this context, snake venoms have already been shown tripanosomide activities, although the immunological mechanisms are still to be enlightened. The present work aimed to investigate the effect of the venom of the snake *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) on the immune response induced in cultured mononuclear cells infected with trypomastigotes forms of *T. cruzi*, and treated *in vitro* with the venom, through the detection of cytokines (pro-inflammatory and anti-inflammatory). Blood of healthy individuals was collected in tubes with heparine for centrifugation under density gradient, using Ficoll-Hypaque, mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) were separated and infected with tripomastigotas forms, Cepa Y of *T. cruzi*, followed by the addition of Bz and the venom of *B. erythromelas* to the cell cultures. After the period of culture, supernatants were kept for posterior analysis of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF by *Citometric Beads Array* (CBA). Cells were evaluated by flow citometry as the expression of CD28⁺ and CTLA-4⁺ (in T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes), and CD80⁺, CD86⁺ and HLA-DR⁺ (in CD14⁺ monocytes). Related to cytokine production, results showed that the venom diminished their expression in all conditions tested, compared to the controls. However, the treatment with the venom induced a raise in the expression of CD28⁺ in TCD4⁺ lymphocytes; and in CD14⁺ monocytes, augmentation of the expression of CD80⁺ and HLA-DR⁺, demonstrating that the venom induces activation of those cells. On the other hand, the venom induced a raise of the expression of CTLA-4⁺ in TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes, indicating that it can control the exacerbate activation of those cells.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*. Poison. Cytokines. Immunity cellular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa do número de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em países não endêmicos	18
Figura 2 – Evolução clínica da doença de Chagas humana	20
Figura 3 – Envolvimento de citocinas, produzidas por populações celulares específicas, no desenvolvimento da doença de Chagas	23
Figura 4 – Serpente <i>B. erythromelas</i>	27
Figura 5 – Microscopia de células Vero infectadas com <i>T. cruzi</i>	34
Figura 6 – Obtenção de PBMC após centrifugação	36
Figura 7 – Representação esquemática do co-cultivo	38
Figura 8 – Estratégica de aquisição e análise de linfócitos	41
Figura 9 – Estratégia de aquisição de análise de monócitos	42
Figura 10 – Estratégia de aquisição e análise da média de intensidade de fluorescência (MIF)	43
<i>Figura 1</i> – Representação esquemática do co-cultivo	47
<i>Figura 2</i> – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Y em adição de diferentes concentrações de veneno de <i>B. erythromelas</i> no tempo de 1 hora e 24 horas.	51
<i>Figura 3</i> – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença do Benzonidazol e/ou em associação de diferentes concentrações de veneno de <i>B. erythromelas</i> no tempo de 1 hora e 24 horas.	53
<i>Figura 4</i> – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa Y, Benzonidazol e diferentes concentrações de veneno de <i>B. erythromelas</i> no tempo de 1 hora e 24 horas.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo.	40
<i>Tabela 1</i> – Expressão das moléculas CD28 ⁺ e CTLA-4 ⁺ dos linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ e níveis de intensidade média de fluorescência	58
<i>Tabela 2</i> – Expressão das moléculas CD80 ⁺ , CD86 ⁺ e HLA-DR ⁺ dos monócitos CD14 ⁺ e níveis de intensidade média de fluorescência	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
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>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsufóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FC	Forma Cardíaca
FD	Forma Digestiva
FI	Forma indeterminada
HAI	Hemaglutinação indireta
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
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 auxiliar secretores de citocinas do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliar secretores de citocinas do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas	17
2.2 Aspectos clínicos da Doença de Chagas	19
2.3 Aspectos laboratoriais da Doença de Chagas	20
2.4 Aspectos imunológicos das formas clínicas da Doença de Chagas	21
2.5 Tratamento Etiológico da Doença de Chagas	23
2.6 Venenos ofídicos	25
2.7 O gênero <i>Bothrops</i> e a espécie <i>B. erythromelas</i> : composição e ações do veneno	26
2.8 Veneno de serpentes: aplicações no campo médico-científico	28
3 PERGUNTA CONDUTORA	30
4 JUSTIFICATIVA	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo geral	32
5.2 Objetivos específicos	32
6 MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1 Obtenção do veneno	33
6.2 Obtenção do <i>T. cruzi</i>	33
6.2.1 Cultivo das células Vero para manutenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	33
6.2.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	33
6.3 População do estudo	34
6.4 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)	35
6.5 Ensaio de citotoxicidade – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] – 2,5 – difeniltetrazólio)	36
6.6 Co-cultivo direto de PBMC e <i>T. cruzi</i> com adição de tratamento com veneno e Benzonidazol	37
6.7 Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	39
6.8 Imunofenotipagem de linfócitos e monócitos do co-cultivo de PBMC, <i>T. cruzi</i> , Bz e veneno	39
6.9 Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos por citometria de fluxo	40
6.10 Análise estatística	43
6.11 Aspectos éticos	43
7 RESULTADOS	44
<i>Artigo original</i> : Modulação da resposta imune induzida pelo veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> em células mononucleares infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
8 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A – Original article	76

APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa	98
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Não Portador da Doença de Chagas	99
APÊNDICE D – Padronizações	101
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/IAM	107

1 INTRODUÇÃO

Estudos demonstraram o veneno de serpentes como inibidor do crescimento da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo considerado uma potencial ferramenta para a prospecção de novas alternativas de tratamento (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005). Outro estudo, verificou que veneno bruto de *Bothrops moojeni* (jararaca) inibe fortemente a taxa de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania spp* (TEMPONE et al., 2001). No estudo de Luna et al., (2011), verificaram em cultura de esplenócitos murinos que o veneno de *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) induziu a produção de citocinas (IFN- γ e IL-6) e de óxido nítrico, apresentando um perfil pró-inflamatório. Não há estudos que contemplem a investigação da resposta imune associada a ação de venenos de serpentes em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

FERNANDEZ-GOMES et al. (1994) encontraram forte efeito inibitório no crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* em culturas tratadas com dose dependente de veneno de *Cerastes cerastes* e *Naja haje*. A inibição do crescimento de formas epimastigotas também foi verificada em culturas tratadas com veneno de *Bothrops jararaca* (jararaca) (GONÇALVES et al., 2002). Outro estudo, utilizando o tratamento em cultura com veneno de *Bothrops jararaca* verificou que há inibição do crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como, alterações ultraestruturais (inchaço mitocondrial e desorganização do cinetoplasto) nas formas tripomastigotas e epimastigotas (DEOLINDO et al., 2005). Logo, esses trabalhos sugerem que o uso do veneno de serpentes podem atuar na inibição do crescimento do *T. cruzi*, sem induzir importantes efeitos citotóxicos em células do hospedeiro. Entretanto, a investigação imunológica frente a ação dos venenos não foi avaliada na infecção com o *T. cruzi*.

Outras pesquisas utilizaram venenos de serpentes do gênero *Bothrops* visando do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, uma vez que uma gama de ações farmacológicas dessas substâncias já foi descrita (PASSERO et al., 2007). Dessa maneira, o estudo dos venenos tem proporcionado elucidar diversos mecanismos farmacológicos, porém o entendimento imunológico é incipiente (LUNA et al., 2011).

Diante do exposto, o presente estudo pretende investigar a resposta imune induzida pelo veneno de *B. erythromelas* em cultura de células mononucleares infectadas com *T. cruzi* através da detecção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Esta investigação é necessária para o entendimento dos eventos imunológicos que ocorre durante a exposição da forma infectante do parasito (tripomastigota) e veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Dessa forma, este trabalho poderá contribuir para o entendimento da ação do sistema imune frente a células humanas infectadas com *T. cruzi* e o veneno de *B. erythromelas*.

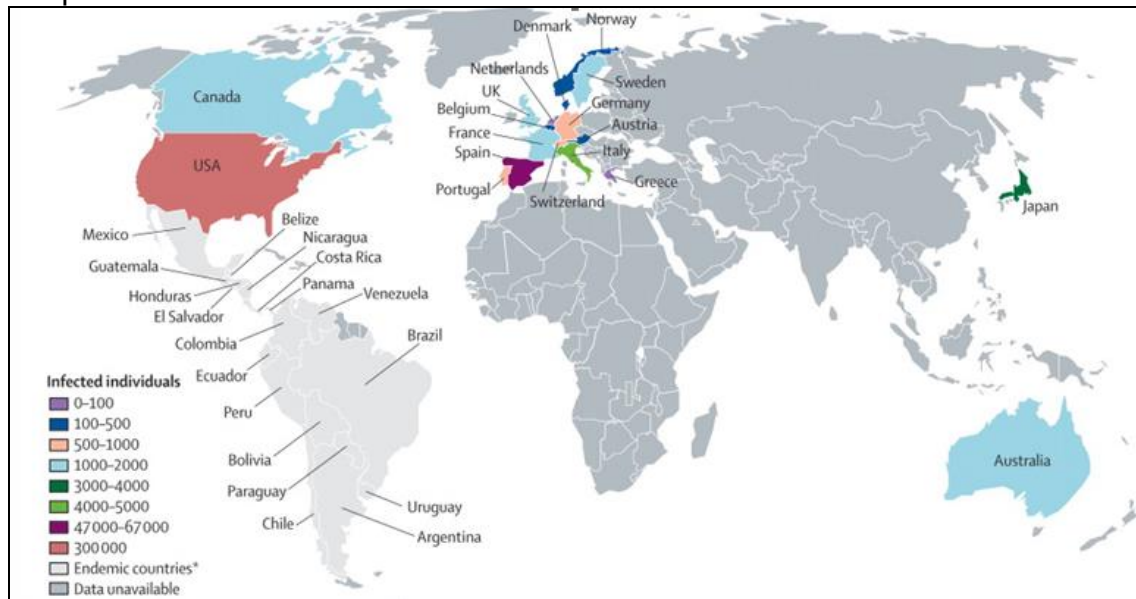
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma infecção tecidual e hematológica, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que é transmitido aos seres humanos e a outros mamíferos por insetos triatomíneos contaminados. Estes insetos são hematófagos e pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, o vetor mais importante da doença. A DC é um sério problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas na América Central, na América do Sul e atualmente vem aumentando na América do Norte e em outros continentes, devido ao intenso fluxo migratório (Figura 1). A DC persiste como uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, com um número de infectados no mundo de aproximadamente 8 milhões de pessoas (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006; WHO, 2009; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O Brasil possui de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A prevalência de infecção pelo *T. cruzi* no Brasil é inferior a 0,2%, sendo o perfil do portador da DC o de um indivíduo adulto, de origem rural, de baixo nível de instrução e como também vivendo em centros urbanos (DIAS, 2008). A média nacional de internações pela DC foi de 0,99 por 100 mil habitantes no período de 1995 a 2008. Em Pernambuco, neste mesmo período, a DC foi responsável por uma média de internações de 0,39 por 100 mil habitantes, sendo as maiores taxas concentradas no interior do estado. Em relação ao número de óbitos, o estado de Pernambuco tem demonstrado uma tendência estacionária (BRAZ et al., 2011).

Figura 1 - Estimativa do número de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos.



Fonte: RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010

2.2 Aspectos clínicos da Doença de Chagas

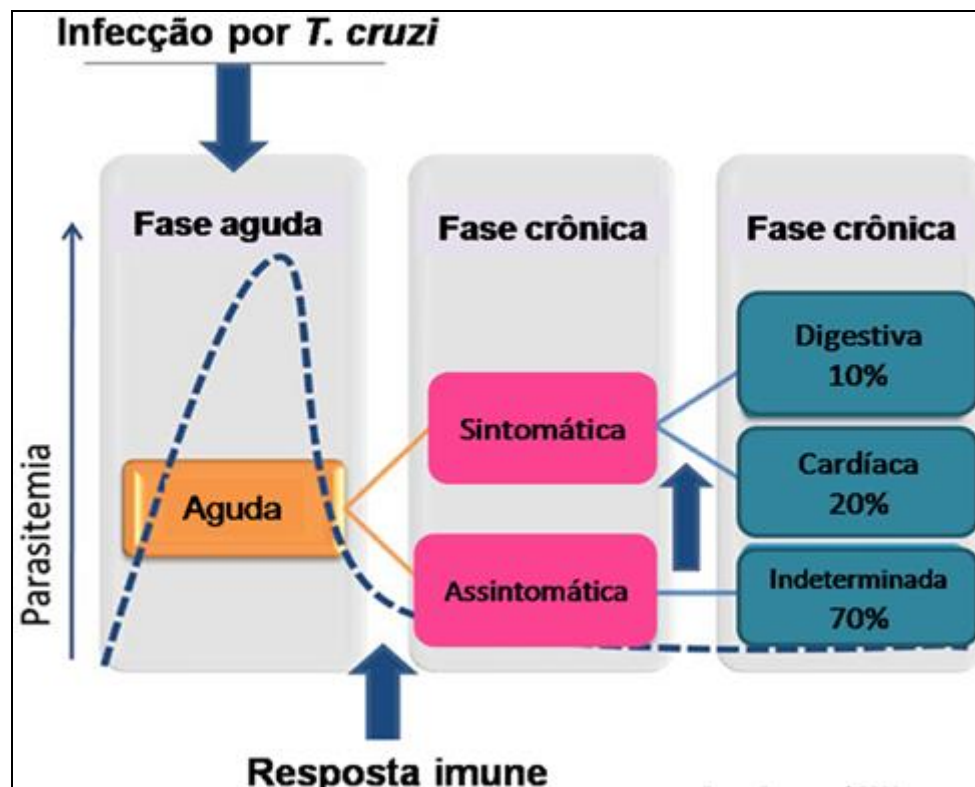
Clinicamente a doença de Chagas apresenta duas fases distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda apresenta-se sintomática ou assintomática. Esta é seguida por uma fase crônica que, na maioria dos casos se apresenta como a forma indeterminada (assintomática, com resultados normais de eletrocardiograma e raio-x do coração, esôfago e cólon), que pode evoluir para as formas clínicas sintomáticas afetando o tecido cardíaco (forma cardíaca) ou megaesôfago e megacólon (forma digestiva), ou ainda uma forma mista, na qual o indivíduo apresenta concomitantemente alterações cardíacas e digestivas da doença (COURA, 2007).

A fase aguda pode durar de 1 a 3 meses após a infecção e é caracterizada por uma intensa parasitemia (Figura 2). Esta fase tem início após o período de incubação que varia de quatro a dez dias quando a transmissão é vetorial (DUTRA et al. 2009). Na fase aguda a parasitemia é evidente em exame direto do sangue. Na maioria dos casos não há sintomas, mas em casos sintomáticos há sinais no local de porta de entrada do parasito (chagoma de inoculação ou sinal de Romana) com febre, mal-estar, linfadenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006; COURA, 2007). No entanto, nos indivíduos mais afetados, todas as manifestações clínicas da fase aguda desaparecem 8 a 4 semanas depois de terem iniciado (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). Entretanto, a fase aguda da DC em muitos indivíduos é imperceptível devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas.

A fase crônica da doença de Chagas começa no momento em que as manifestações clínicas da fase aguda (quando ocorrem) desaparecerem (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). A fase crônica é caracterizada por uma redução do número de tripomastigotas na corrente sanguínea dos indivíduos e pelos elevados títulos de anticorpos da classe IgG, que este pode ser detectado por muitos anos após a infecção (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006; DUTRA; GOLLOB, 2008). Pelo menos 50% dos indivíduos infectados têm alguns parasitas viáveis circulantes na corrente sanguínea por vários anos após a infecção, embora estes só possam ser detectáveis usando testes parasitológicos com alta sensibilidade, tais como xenodiagnósticos, hemocultura ou ensaios baseados em PCR (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006).

A maioria dos pacientes crônicos, aproximadamente 60-70%, permanece na forma indeterminada (FI), caracterizada por ausência de manifestações clínicas significativas, como as eletrocardiográficas ou radiológicas. Dos indivíduos infectados, aproximadamente 30-40% irão desenvolver uma das formas sintomáticas da doença: cardíaca (FC) (20-30%) e digestiva (FD) (8-10%) que é caracterizada por lesões teciduais de intensidade variável na rede neuronal mioentérica, o que origina diversos graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e/ou do cólon (Figura 2). (DUTRA et al., 2009; RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 2- Evolução clínica da doença de Chagas humana.



Fonte: Figura modificada de Dutra et al., 2009

2.3 Aspectos laboratoriais da Doença de Chagas

O diagnóstico laboratorial da doença de Chagas compreende técnicas parasitológicas e sorológicas, sendo apoiado através da epidemiologia, clínica e etiologia. Os métodos de diagnóstico podem basear-se na detecção direta do parasito ou na detecção da resposta do hospedeiro ao parasito levando em consideração a fase da infecção (LUQUETTI, 1995).

Na fase aguda da infecção, o diagnóstico etiológico pode ser realizado através de métodos parasitológicos convencionais diretos (esfregaços, gota espessa, exame a fresco). Caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados métodos de concentração, tais como micro hematócrito, teste de Strout ou QBC (*Quantitative Buffy Coat*) (MATSUMOTO et al., 1993; MENDES et al., 1997).

Os testes sorológicos são os procedimentos laboratoriais utilizados para o diagnóstico durante a fase crônica da doença de Chagas. O diagnóstico na fase crônica é baseado na sorologia convencional Imunofluorescência indireta (IFI), Hemaglutinação indireta (HAI), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou métodos parasitológicos indiretos (Xenodiagnóstico e Hemocultura). Os métodos parasitológicos indiretos são altamente específicos e apresentam baixa sensibilidade (20-50%) (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009). Os testes (IFI, HAI e ELISA) constituem os chamados testes convencionais no diagnóstico da doença de Chagas, com os quais há grande experiência em todos os países da América Latina (LUQUETTI et al., 2009). Uma regressão sorológica para a negatividade é o principal critério utilizado para definir cura parasitológica em pacientes tratados (NEGRETTE et al., 2008). As técnicas sorológicas ainda podem ser associadas ao diagnóstico molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os testes moleculares têm apresentado resultados promissores, permitindo que sejam usados como testes confirmatórios (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; HERNANDEZ et al., 2010; ANDRADE; MARIN NETO et al., 2011).

De acordo com o Consenso (2005) o Ministério da Saúde recomenda a utilização de pelo menos dois testes sorológicos com preparações antigênicas diferentes ou de princípios metodológicos diferentes, podendo ser o ELISA, IFI e/ou a HAI.

2.4 Aspectos imunológicos das formas clínicas da Doença de Chagas

Compreender o papel da resposta imune sobre a infecção causada pelo *T. cruzi* ainda é um desafio (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999). A participação do sistema imune é fundamental para a redução da carga parasitária do indivíduo infectado pelo *T. cruzi*. Por outro lado, a ativação do sistema imune pode estar associada ao aparecimento de manifestações crônicas observadas em alguns pacientes. Tanto indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos apresentam resposta imunológica contra o parasito (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000). Dessa

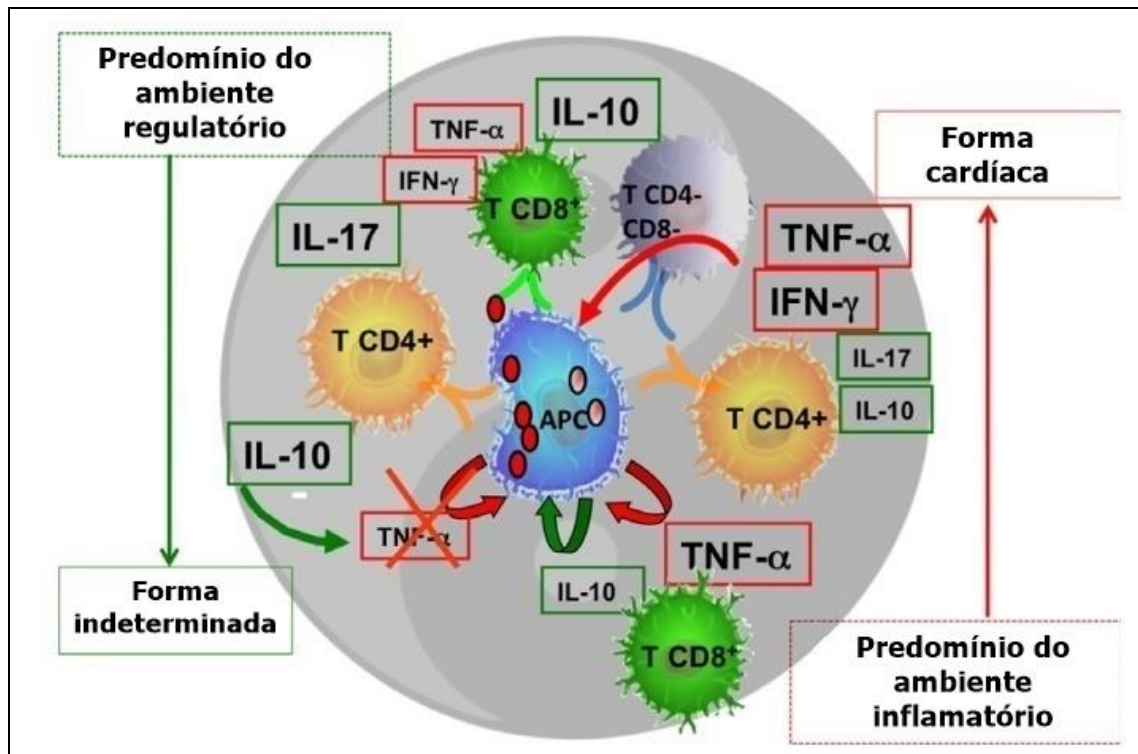
maneira, durante a infecção pelo *T. cruzi*, o sistema imune do hospedeiro controla o crescimento do parasita, desencadeando simultaneamente mecanismos da resposta imune inata e adaptativa para eliminar o patógeno invasor e controlar sua reprodução (SATHLER-AVELAR et al., 2006).

As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e são envolvidas tanto na resistência a infecção quanto nos mecanismos relacionados à evolução da doença de Chagas (BRODSKY; BARRAL-NETO, 2000). Portanto, em relação aos perfis de citocinas na forma crônica da DC, vem sendo demonstrado que citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na geração do infiltrado inflamatório e no dano tecidual. Dessa maneira, nos portadores da fase crônica há um aumento da resposta Th1 com produção de citocinas IFN- γ e TNF quando comparados aos portadores da FI da doença, o que resulta em um predomínio de um “ambiente inflamatório” (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al., 1997; CUNHA-NETO et al., 1998; DUTRA et al., 2014) (Figura 3). Em contrapartida, nos portadores da FI há produção da citocina regulatória IL-10, que tem papel de controlar a resposta inflamatória resultando em um predomínio de um “ambiente regulatório” (MENEZES et al., 2004; DUTRA et al., 2014).

Na fase inicial da forma indeterminada, os indivíduos infectados são capazes de reduzir o número de parasitos e possuem mecanismos regulatórios que limitam o desenvolvimento da doença. Porém, indivíduos que desenvolvem a doença cardíaca, são capazes de controlar a parasitemia, entretanto podem não ser capazes de elaborar uma resposta imunoregulatória eficiente, persistindo uma resposta inflamatória exacerbada no tecido cardíaco (DUTRA; GOLLOB, 2008).

Gomes et al. (2003) sugeriram que pacientes portadores da FI são capazes de manter níveis baixos de IFN- γ e altos níveis de IL-10. Dessa maneira poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da FI contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas.

Figura 3 - Envolvimento de citocinas, produzidas por populações de células específicas, no desenvolvimento da doença de Chagas.



Fonte: Figura modificada de Dutra et al., 2014

Souza et al. (2004) quando estimularam células aderentes obtidas de PBMC com formas tripomastigotas, observaram que monócitos de pacientes com a FI e FC estão relacionados, respectivamente, com a produção de IL-10 e TNF. Além disso, os níveis elevados de IFN-γ estão correlacionados diretamente com o envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução para a FC (CORRÊA-OLIVEIRA, 1999; GOMES et al., 2003). O sucesso no controle da infecção pelo *T. cruzi* e da doença de Chagas envolve um equilíbrio da resposta imune, devendo esta ser suficiente para controlar a infecção e regulação da mesma, a fim de prevenir a destruição excessiva de tecidos dos hospedeiros (MARTINS et al., 2004).

2.5 Tratamento Etiológico da Doença de Chagas

Na América Latina, há dois fármacos nitro-heterocíclicos, Nifurtimox e Benzonidazol (BZ), introduzido em meados dos anos 1960 e 1970, respectivamente, que demonstraram atividades tripanocidas nas fases aguda e crônica recente da infecção. O tratamento da doença de Chagas é mais eficaz na fase aguda, mas nem

sempre o parasita é erradicado completamente durante a fase crônica (MAYA et al., 2007).

O Benzonidazol é a única terapia disponível para o tratamento etiológico que possui ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigota intracelulares. Porém a eficácia desse fármaco é variável, dependendo da duração do tratamento, idade do paciente, dose administrada, fase da doença ou ainda dos testes utilizados para avaliar a depuração do parasita (MARIN-NETTO et al., 2008). Na fase aguda foram relatadas taxas de cura parasitológica em torno de 60% a 80% e na fase crônica, existe uma discordância sobre a utilidade da terapia devido às reações adversas, baixas taxas de cura e à ausência de critérios para avaliação de cura (COURA, 1997; COURA; CASTRO, 2002; MARIN-NETTO et al., 2009).

O esquema terapêutico do BZ em adultos é realizado na dosagem de 5-7mg/kg de peso corpóreo por dia, durante 60 dias, duas vezes ao dia, geralmente de 12 em 12 horas. Apesar da sua atividade tripanocida, o BZ pode causar várias reações adversas indesejáveis, que variam de leves incômodos gerais e digestivos a efeitos colaterais mais graves, como reações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (CANÇADO, 1997). Embora frequentes, os efeitos adversos geralmente desaparecem quando o tratamento é interrompido (BERN et al., 2007).

Existe na literatura alguns estudos que avaliaram a resposta imune do paciente portador da DC, quando o Bz é administrado. No estudo de Bahia-Oliveira et al. (2000) foi relatado níveis elevados de IFN- γ em PBMC de indivíduos considerados curados após o tratamento com Bz, comparados com pacientes não tratados e/ou cronicamente infectados. Por outro lado, Laucella et al., (2009) verificaram que pacientes submetidos ao tratamento com Bz apresentaram uma diminuição de IFN- γ após 12 meses de tratamento. Os autores acreditam na hipótese que esta mudança na resposta imune induzida pelo Bz esteja relacionada com uma mudança de fenótipo de linfócitos T efetores para células de memória, sugerindo que a utilização do Bz na fase crônica seria importante na resposta imune específica ao parasita e que esta poderia ser considerada um indicativo de eficácia de tratamento e cura.

Um estudo com crianças infectadas e que foram tratadas com BZ direcionou uma resposta imune do perfil Th1, sofrendo modulação da citocina anti-inflamatória

IL-10, sendo elemento chave para controlar o dano tecidual deletério que eventualmente pode ocorrer devido à resposta pró-inflamatória mediada pelo IFN- γ observada durante o tratamento com o fármaco (SATHLER-AVELAR et al., 2006).

2.6 Venenos ofídicos

Os venenos ofídicos constituem um recurso biológico que contém vários componentes de potencial valor terapêutico (RIVERO, 2010). Esses venenos são misturas complexas de proteínas, nucleotídeos e íons inorgânicos. Os peptídeos e polipeptídeos são responsáveis por uma variedade de propriedades tóxicas do veneno. Dessa forma, esses componentes podem apresentar muitas aplicações na biomedicina (KOH; ARMMGAM; JEYASEEIAN, 2006).

Os venenos ofídicos possuem componentes proteicos e não proteicos. A parte não proteica compreende ânions e cátions inorgânicos, lipídeos, carboidratos, pequenos peptídeos e aminoácidos (STOCKER, 1990). Os componentes proteicos dos venenos ofídicos foram agrupados em diferentes categorias baseadas em suas funções hemostáticas: 1) enzimas que coagulam fibrinogênio; 2) enzimas que degradam fibrinogênio; 3) ativadores de plasminogênio; 4) ativadores de protrombina; 5) ativadores de fator V da coagulação; 6) ativadores de fator X da coagulação; 7) enzimas com atividade anticoagulante incluindo inibidores da formação do complexo protrombinase, inibidores de trombina, fosfolipases e ativadores de proteína C; 8) enzimas com atividade hemorrágica; 9) enzimas que degradam inibidores de serino-proteinases plasmáticas; 10) ativadores da agregação plaquetária incluindo enzimas de ação direta, componentes não enzimáticos e agentes que necessitam de cofator; 11) inibidores da agregação plaquetária, isto é, fibrinogenases, 5'-nucleotidases, fosfolipases e desintegrinas. Embora muitas peçonhas de serpentes contenham vários componentes hemostaticamente ativos, é importante ressaltar que uma única peçonha não contém todos esses componentes descritos (MARKLAND, 1998). Essas proteínas são responsáveis pelas quase totalidades dos efeitos biológicos encontrados, dentre as quais se destacam a ação enzimática e a presença de toxinas com efeitos específicos (KOH; ARMMGAM; JEYASEEIAN, 2006).

2.7 O gênero *Bothrops* e a espécie *B. erythromelas*: composição e ações do veneno

O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae, compreende mais de 30 espécies de serpentes, e tem esta denominação decorrente da língua grega: “Bothros” significa fosseta ou cavidade e “ops”, significa olho ou face, localizada entre a narina e os olhos destas serpentes (CARRASCO et al., 2012). No Brasil, ocorrem aproximadamente 20-30.000 casos notificados por ano com uma letalidade de 0,45% (BRASIL, 2001; KASTURIRATNE et al., 2008). A maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na América Latina são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, responsáveis por 90% dos acidentes notificados, tornando-se as serpentes de maior importância do ponto de vista médico (SINAN, 2015) e a mais estudada clinicamente e imunologicamente (LUNA et al., 2011).

A espécie *B. erythromelas* (figura 4) é conhecida, popularmente, como jararaca-da-seca, jararaca-malha de cascavel ou jararaquinha e encontra-se amplamente distribuída na região nordeste do Brasil (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), e também no norte de Minas Gerais (ROMANO-HOGE, 1990; UETZ et al., 2015). Há relatos da presença dessa serpente em brejos de altitudes ou regiões de mata remanescente do estado de Pernambuco (SOARES, 2001). A *B. erythromelas* apresenta cor castanho-avermelhada, hábitos terrestres e fornece cerca de 20-30mg de peçonha por extração (VELLARD, 1938). Essa espécie possui um comprimento rostro-cloacal médio de 55 centímetros, se alimenta de rãs, lagartos, mamíferos, e centopeias (CARDOSO, 2003).

Figura 4 – Serpente *B. erythromelas*



Foto: Museu vivo répteis da caatinga, PB (2018).

O veneno botrópico é uma mistura complexa de substâncias bioativas de natureza orgânica e inorgânica (MEBS, 2001; SALDARRIGA et al., 2003; HARVEY, 2006; LALLOO, 2010). Aproximadamente 90 a 95% do peso seco dessa peçonha correspondem a proteínas e peptídeos, principalmente as fosfolipases A₂, as metaloproteases, as lectinas do tipo C e peptídeos potenciadores de bradicinina (HARVEY, 2006; CUNHA, 2012). O veneno da *B. erythromelas* é predominantemente composto por proteínas ácidas. Os principais constituintes inorgânicos são: Sódio, Cloro, Potássio, Cálcio e Zinco em ordem decrescente de concentração (VASCONCELOS, 1996).

O veneno botrópico tem capacidade de ativar fatores de coagulação sanguínea, consumindo fibrinogênio e formando uma fibrina intravascular, induzindo a incoagulabilidade sanguínea. A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possuem toxinas capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X da coagulação. São também descritos fatores com atividade sobre a agregação plaquetária. Pode ocorrer trombocitopenia nas primeiras horas, persistindo por até alguns dias (CARDOSO, 2003).

O veneno de *B. erythromelas* possui quatro componentes isolados e caracterizados, são eles: peptídeo potenciador da bradicidina (ROCHA et al. 1949), fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente mediando o efeito

hipotensor (AZEVEDO et al., 2001), metaloproteinase da classe PIII conhecida como Berythracivase apresentando atividade coagulante (SILVA et al., 2003) e uma Fosfolipase A₂ ácida relacionada com o efeito antiplaquetário, antiinflamatório e indutora de liberação de prostaglandina I₂ com baixa atividade miotóxica (SILVA et al., 1991; ALBUQUERQUE et al., 2013).

2.8 Veneno de serpentes: aplicações no campo médico-científico

No Brasil, os venenos mais estudados do ponto de vista imunológico e do ponto de vista clínico, pertencem ao gênero *Bothrops* (LUNA et al., 2011). Algumas drogas disponíveis no mercado são derivadas do veneno de serpentes. O primeiro medicamento a ser descoberto foi o Captopril, a partir do veneno de *Bothrops jararaca* os pesquisadores Rocha e Silva et al. (1949), descobriram a bradicidina, que orientou a formulação do Captopril, utilizado no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca, insuficiência congestiva e doença arterial coronariana (CARDOSO, 2003). Outros exemplos, o Defibrase que é um inibidor de trombina e protombina utilizado na prevenção do infarto cerebral agudo e foi sintetizado a partir do veneno de *Bothrops moojeni*; o Reptilase que é importante no diagnóstico de tratameto da coagulação sanguínea e foi sintetizado a partir do veneno de *Bothrops jararaca*; e também o Hemocoagulase que é utilizado no tratamento e prevenção de hemorragias sintetizado a partir do veneno de *Bothrops atrox* (KOH; ARMMGAM; JEYASEELAN, 2006). Além desses, pode-se destacar na medicina os antiagregantes Eptifibatide (Integrilin) e Tirofiban (Aggrastat) produzidos a partir de toxinas das serpentes *Sistrurus miliarius barbouri* (cascavel-anã) e *Echis carinatus* respectivamente (KOH; KINNI, 2012).

Foi demonstrado em uma estudo, que o veneno bruto da *Bothrops moojeni* inibe fortemente a taxa de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania spp* (Tempone et al., 2001). Outros pesquisadores, DEOLINDO et al. (2010) mostraram que a enzima L-aminoácido oxidase, encontrada no veneno da serpente *Bothrops jararaca*, induz morte por apoptose, na forma epimastigota do *T. cruzi*.

Um estudo avaliando o efeito tripanocida e efeitos tóxicos celulares nos venenos de cinco espécies de serpentes contra duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Cepa Jennifer e CL) foi realizado. Os venenos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* e *Atropoides picadoi*

mostraram evidente ação tripanocida contra epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas; Os venenos de *Bothrops asper*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis schlegelii* foram os mais ativos contra os epimastigotas de cepas diferentes; Os venenos de *Bothrops asper* e *Bothriechis schlegelii* exibiram a maior atividade contra amastigotas de ambas as cepas de *T. cruzi*; Cada um dos venenos dessas espécies apresentam efeitos tóxicos, que foram mensurados pelo grau de apoptose, necrose e proliferação celular que produziram; sendo diretamente relacionado com o tipo do veneno, concentração e tempo de exposição (CASTILLO-VIGIL et al., 2008).

Portanto, os venenos de serpentes constituem produtos animais estudados com o intuito de desenvolver novas abordagens terapêuticas, uma vez que uma gama de ações farmacológicas destas substâncias já foi descrita (KOH; ARMMGAM; JEYASEELAN, 2006), bem como sobre a ação do veneno de serpente no contexto tripanocida (PASSERO, 2007). Dessa maneira, o estudo dos venenos tem proporcionado elucidar diversos mecanismos farmacológicos importantes para área da medicina.

Venenos animais tem constituído ferramentas farmacológicas importantes para a prospecção de fármacos. A exemplo disso são os fármacos comercializados na Europa e Estados Unidos, como anti-trombóticos, anestésicos, ativadores da cascata de coagulação, entre outros. Apesar desses dados, venenos atuando como antiparasitários ainda é uma área pouco estudada. Considerando que venenos ofídicos são fonte de enzimas – 90% de seu peso total – infere-se que os mesmos possam contribuir para a destruição de parasitas, mesmo que intracelulares, uma vez que fosfolipases destroem a membrana celular permitindo a entrada de toxinas nas células. Essas toxinas podem ter ação direta sobre o parasita. Assim, conhecer os eventos imunológicos decorrentes da ação *in vitro* do veneno de *B. erythromelas*, associado ou não com o benzonidazol, de PBMCs, poderia contribuir para o delineamento de estratégias terapêuticas na doença de Chagas.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Existem diferença entre a expressão de marcadores de superfície celular e alterações na produção de citocinas em culturas de células mononucleares infectadas com *T. cruzi* e submetidas ao tratamento *in vitro* com veneno?

4 JUSTIFICATIVA

Apesar de muitas drogas e/ou compostos terem sido testados para o tratamento da doença de Chagas, poucos progressos foram feitos no sentido de desenvolvimento de novas drogas. Considerando que o veneno de serpentes pode inibir a multiplicação de *T. cruzi* sendo uma possível ferramenta para a prospecção de novas alternativas de tratamento e sabendo que o Benzonidazol induz uma resposta inflamatória pela exposição de antígenos do parasito, acreditamos que é importante estudos que possam investigar a modulação imunológica induzida pelos venenos de serpentes.

O veneno de *B. erythromelas* em cultura de células esplênicas de camundongos induziram uma resposta dicotômica através da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-6) e de óxido nítrico, bem como induziu um efeito anti-inflamatório, através da produção de IL-10, respectivamente. Isso nos encoraja a pensar que o veneno de *B. erythromelas*, utilizados isolados ou associado com o Benzonidazol poderiam estar induzindo efeitos modulatórios do sistema imune, sem provocar importantes efeitos citotóxicos em células do hospedeiro quando utilizados em doses viáveis.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do veneno de *B. erythromelas* sobre a resposta imune induzida em cultura de células mononucleares infectadas com *T. cruzi* e tratadas *in vitro* com o veneno da serpente.

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF) no sobrenadante de cultura de PBMC submetidas à infecção tratadas com veneno de *B. erythromelas* e/ou com Benzonidazol;
- b) Avaliar a expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ obtidos de PBMC submetidos à infecção tratadas com veneno de *B. erythromelas* e/ou com Benzonidazol;
- c) Avaliar a expressão das moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ em monócitos CD14⁺ obtidos de PBMC submetidos à infecção tratadas com veneno de *B. erythromelas* e/ou com Benzonidazol.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Obtenção do veneno

Os venenos das serpentes *B. erythromelas* foram obtidos através da ordenha de espécimes de cativeiro, provenientes do museu vivo Répteis da Caatinga, localizado em Campina Grande, PB. Foram selecionados animais adultos de ambos os sexos. O veneno, após extração, foi mantido sob refrigeração (-4°C) até o momento de sua utilização. As concentrações proteicas de cada veneno foram determinadas através da reação pelo método de Bradford (1976).

6.2 Obtenção do *T. cruzi*

6.2.1 Cultivo das células Vero para manutenção de tripomastigotas de *T. cruzi*

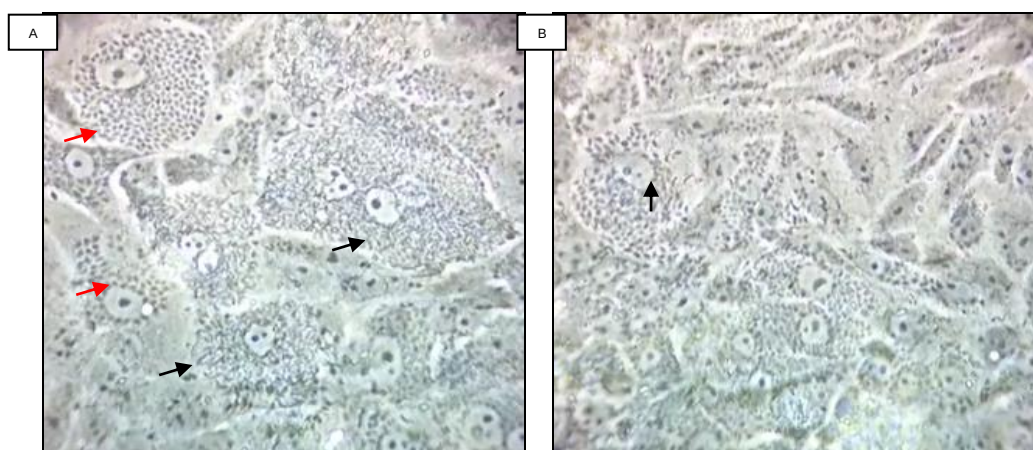
Células Vero criopreservadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com soro bovino fetal (SBF, Sigma™) a 10% e 1% de penicilina/ estreptomicina (RPMI 1640 completo) e contendo DMSO (Sigma™) a 20% foram descongeladas em banho-maria, ressuspensas em 5mL de RPMI 1640 suplementado e centrifugadas a 400 x g, a temperatura de 22°C, durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as células foi ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado. A suspensão celular foi depositada em frascos de cultura de 25 cm² e/ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 completo e incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e com 5% de 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.

6.2.2 Infecção das células Vero para obtenção de tripomastigotas de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas da cepa Y criopreservadas (10⁷ tripomastigotas/mL) foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Posteriormente, a suspensão foi adicionada em frascos de cultivo contendo as células Vero e incubadas a 37°C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂, *overnight* para interiorização

dos tripomastigotas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado para remoção dos parasitos que não penetraram nas células e, em seguida, foi adicionado meio RPMI 1640 suplementado e os frascos de cultura foram incubados novamente por 5 a 7 dias. Diariamente, os frascos de cultura foram observados no microscópio invertido para avaliação da multiplicação dos parasitos no interior do citoplasma celular bem como manutenção dos tripomastigotas para utilizá-los nos ensaios de cultivo celular (Figura 5). Ao se interiorizarem nas células Vero, as formas tripomastigotas evoluem para a forma amastigota (Figura 5A), se multiplicam em tripomastigotas e rompem a membrana das células Vero (Figura 5B). Em seguida os tripomastigotas foram coletados, lavados e utilizados para infecção de novas células Vero e de células aderentes humanas. O meio de cultura contendo as formas tripomastigotas foi depositado em tubos de fundo cônico (15 mL ou 50 mL) e centrifugados (2500 x g a 20°C, por 10 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as formas tripomastigotas contado em câmara de Neubauer, utilizando uma diluição de 1:10 com *Trypan Blue*, para verificar a viabilidade celular dos tripomastigotas para o ensaio de co-cultivo.

Figura 5 – Microscopia de células Vero infectadas com *T. cruzi*.



Legenda: Células Vero após 5 dias de infecção com a Cepa Y do *T. cruzi*. (A) Setas vermelhas indicam ninho de formas evolutivas amastigotas e setas pretas indicam ninho de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. (B) Seta preta indica um *T. cruzi* após eclosão do ninho. Imagem captada de microscópio invertido no limite de ampliação de 40x.

Foto: Da autora (2017).

6.3 População do estudo

Um total de quatorze indivíduos sem infecção chagásica foram selecionados utilizando os critérios de inclusão: possuir sorologia não reagente para infecção pelo *T. cruzi*, não ser de área endêmica e não ter recebido transfusão sanguínea. Os

testes sorológicos para confirmação da sorologia para DC foram realizados pelo Serviço de Referência em Doença de Chagas do IAM/ Fiocruz-PE, conforme recomendações do Ministério da Saúde (DIAS et al. 2015).

Inicialmente, sangue de três indivíduos foi coletado para realização do ensaio de citotoxicidade celular do veneno de *B. erythromelas* através do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] – 2,5 – difeniltetrazólio) e utilizando as PBMCs. Em outro momento do estudo, sangue de mais três indivíduos foi coletado para isolamento das PBMC e definição da cinética de tempo de cultivo x resposta e concentração do veneno x resposta através da mensuração de citocinas. Os resultados dessas cinéticas estão apresentados no Apêndice B. Após definição da concentração e do tempo “ótimos”, selecionamos mais oito indivíduos ao estudo para realização de co-cultivo com formas tripomastigotas e tratamento *in vitro* com veneno e/ou Bz visando estudar a produção de citocinas e as moléculas de ativação e inibição celular em linfócitos e monócitos.

6.4 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Quarenta mililitros de sangue foram coletados através do sistema à vácuo, em tubos contendo heparina sódica para obtenção das PBMC e utilização nos ensaios de cultivo celular. O sangue foi adicionado a tubos cônicos de 50mL (BD™), seguido da adição da solução *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril (pH 7,2) na proporção de 1:2. Essa solução foi adicionada em tubos de polipropileno (50mL) contendo 10mL de Ficoll-Hypaque PLUS™(Amersham Biosciences). O sangue foi centrifugado (900 x g por 30 minutos a 25 °C) em gradiente de densidade através do Ficoll-Hypaque para obtenção do anel de PBMC (Figura 6) e em seguida, foi removido e colocado em tubos de polipropileno (15 mL). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação em meio RPMI 1640 completo, sendo posteriormente contadas em câmara de Neubauer com auxílio do corante Azul de Trypan em uma diluição de 1:10. O valor obtido foi ajustado para a concentração desejada de 10⁶ células/mL.

Figura 6 – Obtenção de PBMC após centrifugação



Legenda: Após centrifugação, os eritrócitos e granulócitos descem através do Ficoll-Hypaque formando um sedimento (pellet) no fundo do tubo. As células mononucleares (linfócitos e monócitos) ficam na interface “anel leucocitário” entre o plasma e o Ficoll.

Foto: Da autora (2017).

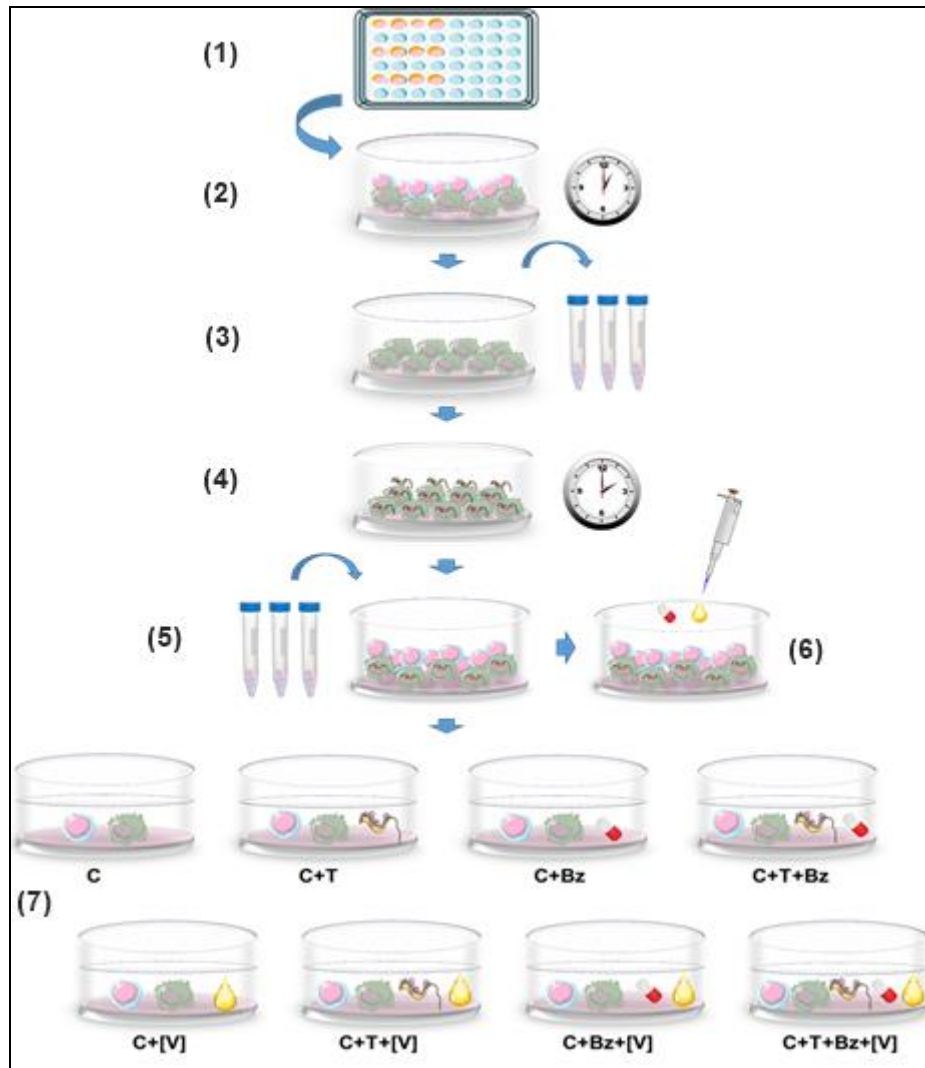
6.5 Ensaio de citotoxicidade – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] – 2,5 – difeniltetrazólio)

A citotoxicidade celular foi quantificada pela atividade de uma enzima mitocondrial (succinato desidrogenase) presente apenas em células vivas de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983). O substrato utilizado para essa enzima foi o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] – 2,5 – difeniltetrazólio (MTT). Sangue periférico foi coletado e as PBMCs (2×10^5 células/poço) foram isoladas e depositadas em placas de cultura de 96 poços na presença de 12 concentrações do veneno (100 – 0,04 $\mu\text{g/mL}$) diluído em meio RPMI 1640 + 10% de soro bovino fetal, em triplicata, e mantido a 37 °C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI (sem vermelho de fenol) contendo 5mg/mL do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e as placas foram incubadas por mais 3 horas. Em seguida, o MTT foi removido e 100 μL de dimetilsufóxido foram adicionados. O precipitado derivado da redução de MTT foi determinado espectofotometricamente a 540nm. A concentração capaz de causar a perda de citotoxicidade em 50% das células (CC50) foi estimada através de regressão linear utilizando o software SPSS v.18.

6.6 Co-cultivo direto de PBMC e *T. cruzi* com adição de tratamento com veneno e Benzonidazol

As PBMC (1×10^6 células/mL) foram depositadas em placas de poliestireno de 48 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF por 1 hora, onde em intervalos de 30 minutos a placa foi agitada gentilmente para adesão das células aderentes (monócitos). Em seguida, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas dos poços e separadas em tubos cônicos de 15mL a 37 °C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂. As formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço), foram adicionadas aos poços da placa, onde, durante 2 horas houve a interiorização dos parasitos às células na relação de 10 parasitos para cada monócito. Os parasitos que não penetraram nas células foram removidos através de lavagens com meio RPMI e os linfócitos foram readicionados em todos os poços do cultivo. As células foram incubadas por 1 hora e 24 horas na presença do Benzonidazol (1 µg/mL) e do veneno de *B. erythromelas* (11 ou 22 µg/mL). Nas condições experimentais, houve controles para comparação do co-cultivo, conforme observado na Figura 7. Após o tempo de incubação os sobrenadantes de cultura foram removidos e estocados a 20°C até o momento de sua utilização.

Figura 7 - Representação esquemática do co-cultivo



Legenda: (1) PBMC foram adicionadas em placas de cultura de 48 poços numa concentração de 1×10^6 células/mL. (2) As PBMC foram incubadas, por 1 hora, para adesão das células aderentes (monócitos). (3) Após o tempo de adesão, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas e armazenadas em estufa (37°C / $5\% \text{CO}_2$) em tubos de fundo cônico; (4) Formas tripomastigotas foram adicionadas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço) para infecção das células aderentes (monócitos), por 2 horas. Após o tempo de infecção, as formas tripomastigotas que não infectaram as células foram removidas através de lavagem utilizando meio RPMI completo. (5) Os linfócitos foram readicionados. (6) As condições experimentais foram tratadas com veneno e/ou Bz; (7) C – Células não aderentes (linfócitos) e aderentes (monócitos) da esquerda para direita, respectivamente; C+T – Células e Tripomastigotas; C +Bz - Células e Benzonidazol; C+T+Bz – Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C + [V] – Células e concentração de veneno; C + T + [V] – Células, Tripomastigotas e concentração de veneno; C + Bz + [V] – Células, Benzonidazol e concentração de veneno; C + T + Bz + [V] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e concentração de veneno.

Fonte: Elaborado pela autora.

6.7 Detecção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC por Cytometric Bead Array (CBA)

A técnica de CBA foi utilizada para a mensuração quantitativa de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences), conforme recomendado pelo fabricante. Esta técnica é um multiteste que emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência (fluorocromo detectado no canal FL4), recobertas com anticorpos específicos, que se ligam especificamente aos alvos na amostra. Esse imunocomplexo só poderá ser detectado após incubação com o reagente de detecção, outro anticorpo específico ao alvo conjugado a fluorocromo (detectado no canal FL2). Logo, 22 μ L da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ e anti-TNF para citocinas foram adicionadas em tubos poliestireno (BD Systems™- 5mL). Em seguida 22 μ L do sobrenadante de cultura e 22 μ L do reagente de detecção. Os tubos foram incubados por aproximadamente 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução tampão (*Wash Buffer*) e os tubos foram centrifugados a 200 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e 300 μ L 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 do co-cultivo de PBMC, *T. cruzi*, Bz e veneno

Após o tempo de incubação, placa de cultura foi centrifugada e em seguida foi coletado 700 μ L do sobrenadante e mantido congelado em Freezer. Após o tempo de 1 hora de co-cultivo, os linfócitos e monócitos foram removidos dos poços através de vigorosas lavagens utilizando PBS-Wash gelado (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™). Depois de retiradas, as células foram colocadas em tubos de poliestireno devidamente identificados (BD Systems™; 5 mL) com cerca de 3 mL de PBS-Wash para centrifugação a 1.500

r.p.m., 9 de aceleração, 0 de “brake” por 5 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfície para linfócitos para cada tubo: anti-CD4 (1,5 µL), anti-CD8 (1,5 µL), anti-CD28 (1,5 µL) e anti-CD152 (10 µL) e para monócitos: anti-CD14 (2,5 µL), anti-HLA-DR (2,5 µL), anti-CD80 (1,5 µL) e anti-CD86 (1,5 µL) conjugados a diferentes fluorocromos (Tabela 1). Após a incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, adicionou mais 1 mL de PBS Wash em cada tubo, centrifugou nas mesmas condições e desprezou o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução fixadora BD Cytofix™ (BD Biosciences®) e os tubos foram incubados por 20 minutos. Depois do período de incubação, as células foram lavadas novamente com 1 mL de PBS-Wash. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 300 µL de PBS-Wash e os tubos foram estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Tabela 1 – 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
CTLA4/ 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

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

Fonte: Elaborado pela autora.

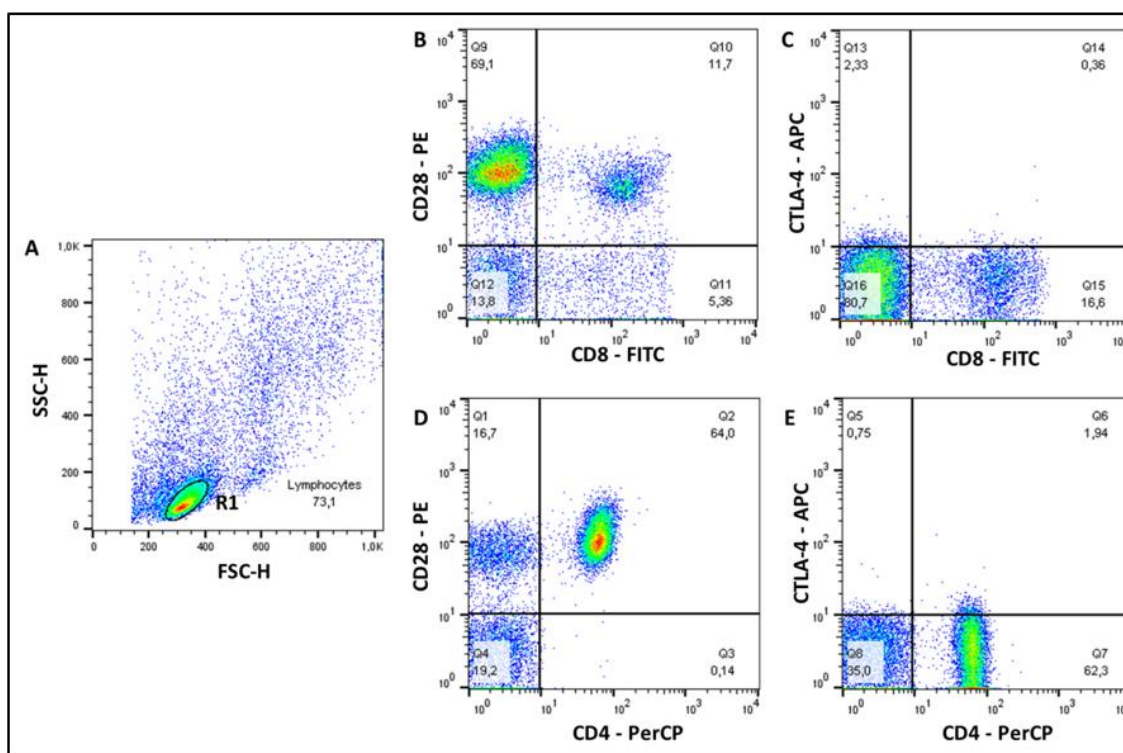
6.9 Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos por citometria de fluxo

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 Dickson Immunocytometry Systems) onde podemos avaliar o tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulidade das células (Side Scatter-SSC), além da fluorescência 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 (Figura 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) (Figuras 8B e 8C) e, FL3 (CD4/PerCP) *versus* FL2 (CD28/PE) ou FL4 (CTLA-4/APC) (Figuras 8D e 8E).

Figura 8 – Estratégica de aquisição e análise de linfócitos



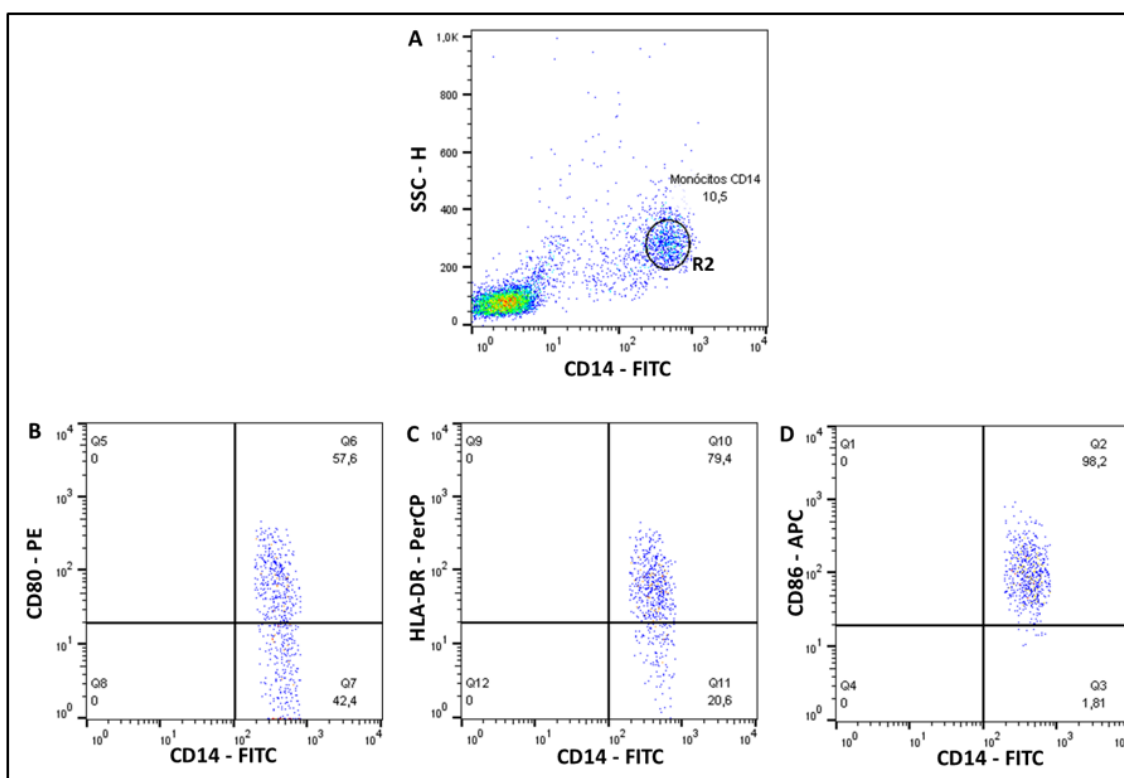
Legenda: A – Dot plot da população de linfócitos selecionada para a análise; B – Gráfico bidimensional CD8/FITC por CD28/PE; C– Gráfico bidimensional CD8/FITC por CTLA-4/APC; D – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CD28/PE; E – Gráfico bidimensional CD4/PerCP por CTLA-4/APC.

Fonte: Elaborado pela autora a partir do software FlowJo®

A população de monócitos foi selecionada através de dot plot SSC-H versus FL1, sendo adquiridos 1000 eventos dentro da janela de interesse (R2) (Figura 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) (Figura 9C) e FL1 (CD14/FITC) *versus* (CD86/APC) (Figura 9D).

Figura 9 – Estratégia de aquisição de análise de monócitos

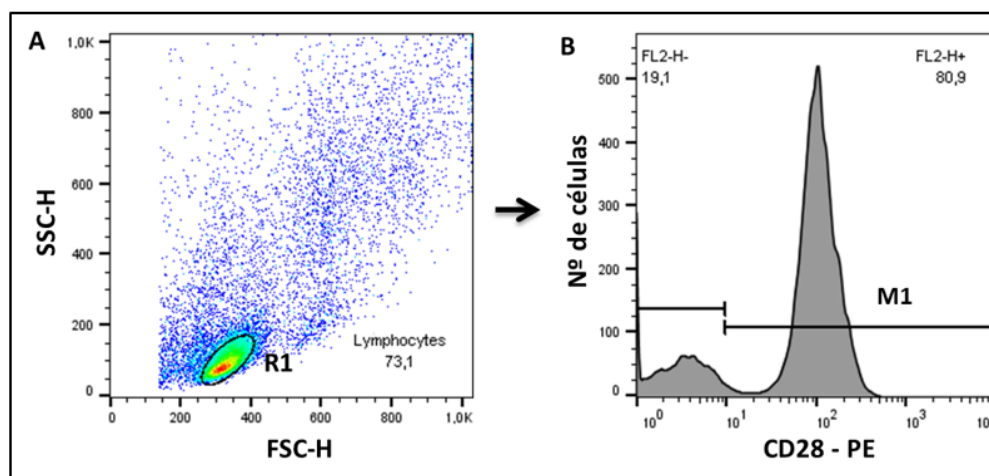


Legenda: A – Dot plot da população de monócitos selecionada para a análise; B – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD80/PE; C– Gráfico bidimensional CD14/FITC por HLA-DR/PerCP; D – Gráfico bidimensional CD14/FITC por CD86/APC.

Fonte: Elaborado pela autora a partir do software FlowJo®.

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 a amostra foi representada graficamente em histogramas de parâmetro único (Número de células x Fluorocromo). A região M1 foi estabelecida para determinar a MIF de cada molécula (Figura 10).

Figura 10 – Estratégia 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.

Fonte: Elaborado pela autora a partir do software FlowJo®.

6.10 Análise estatística

Todos os dados decorrentes das análises foram copiados em planilhas do Excel - 2013 onde foi construído um banco de dados. Os resultados de citotoxicidade celular foram analisados através de regressão linear utilizando o software SPSS versão 18. Os demais dados foram exportados para o software computacional Graphpad Prism versão 5.0 Windows® (E.U.A.). Os resultados das análises estatísticas de produção de citocinas, frequência celular e MIF, foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os 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%.

6.11 Aspectos éticos

As abordagens utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190) (Anexo). Todos os indivíduos participantes responderam a um formulário de pesquisa e assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B).

7 RESULTADOS

Artigo original

Modulação da resposta imune induzida pelo veneno de *Bothrops erythromelas* em células mononucleares infectadas com *Trypanosoma cruzi*

Introdução

A doença de Chagas (DC), infecção tecidual e hematológica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é transmitida aos seres humanos e a outros mamíferos por insetos triatomíneos hematófagos, sendo o *Triatoma infestans*, o vetor mais importante. A DC é um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O Benzonidazol (Bz) é a única terapia disponível para o tratamento no Brasil, entretanto a eficácia do fármaco é variável apresentando taxas de cura em torno de 60% a 80% na fase aguda, e, na fase crônica, existe uma discordância sobre a utilidade da terapia devido às reações adversas, baixas taxas de cura e à ausência de critérios para avaliação de cura (COURA, 1997; COURA; CASTRO, 2002; MARIN-NETO et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram que o veneno de serpentes podem atuar com ação tripanocida, sem induzir importantes efeitos citotóxicos em células do hospedeiro (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005). A *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) é uma jararaca encontrada amplamente na região Nordeste do Brasil. Em cultura de esplenócitos murinos o veneno de *B. erythromelas* induziu a produção de citocinas (IFN- γ e IL-6) e de óxido nítrico, apresentando um perfil pró-inflamatório, mas modulado pela produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (LUNA et al., 2011).

Contudo, venenos animais tem constituído ferramentas farmacológicas importantes para a prospecção de fármacos. A exemplo disso são os fármacos comercializados na Europa e nos Estados Unidos, como anti-trombóticos, anestésicos, ativadores da cascata de coagulação (ROCHA E SILVA et al., 1949; KOH; ARMMGAM; JEYASEELAN, 2006; KOH; KINI, 2012). Mesmo assim, os venenos com ação antiparasitária ainda é uma área pouco estudada. Considerando que venenos ofídicos são fonte de enzimas – 90% de seu peso total – infere-se que

os mesmos podem contribuir para a destruição de parasitas, mesmo que intracelulares, uma vez que fosfolipases destroem a membrana celular permitindo a entrada de toxinas nas células. Essas toxinas podem ter ação direta sobre o parasita. Entretanto, a investigação imunológica frente a ação dos venenos não foi avaliada na infecção com o *T.cruzi*. Assim, conhecer os fenômenos imunológicos decorrentes do tratamento *in vitro* de células mononucleares com veneno de *B. erythromelas*, associado ou não ao benzonidazol pode auxiliar o delineamento de estratégias terapêuticas na Doença de Chagas.

Materiais e Métodos

Obtenção do veneno – os venenos das serpentes *B. erythromelas* foram obtidos através da ordenha de espécimes de cativeiro, provenientes do Museu vivo Répteis da Caatinga, localizado em Campina Grande, PB. As concentrações proteicas de cada veneno foram determinadas através da reação pelo método de Bradford (1976).

Parasitas – Formas tripomastigotas da Cepa Y mantidas congeladas a -80°C, 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 RPMI completo) por 24 horas, em estufa de 5% 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 completo e as culturas incubadas por 5 a 7 dias. Diariamente, as células foram observadas ao 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 (200x g por 10 minutos a 20°C). Os tripomastigotas foram contados em câmara de Neubauer e ajustados para concentrações de uso.

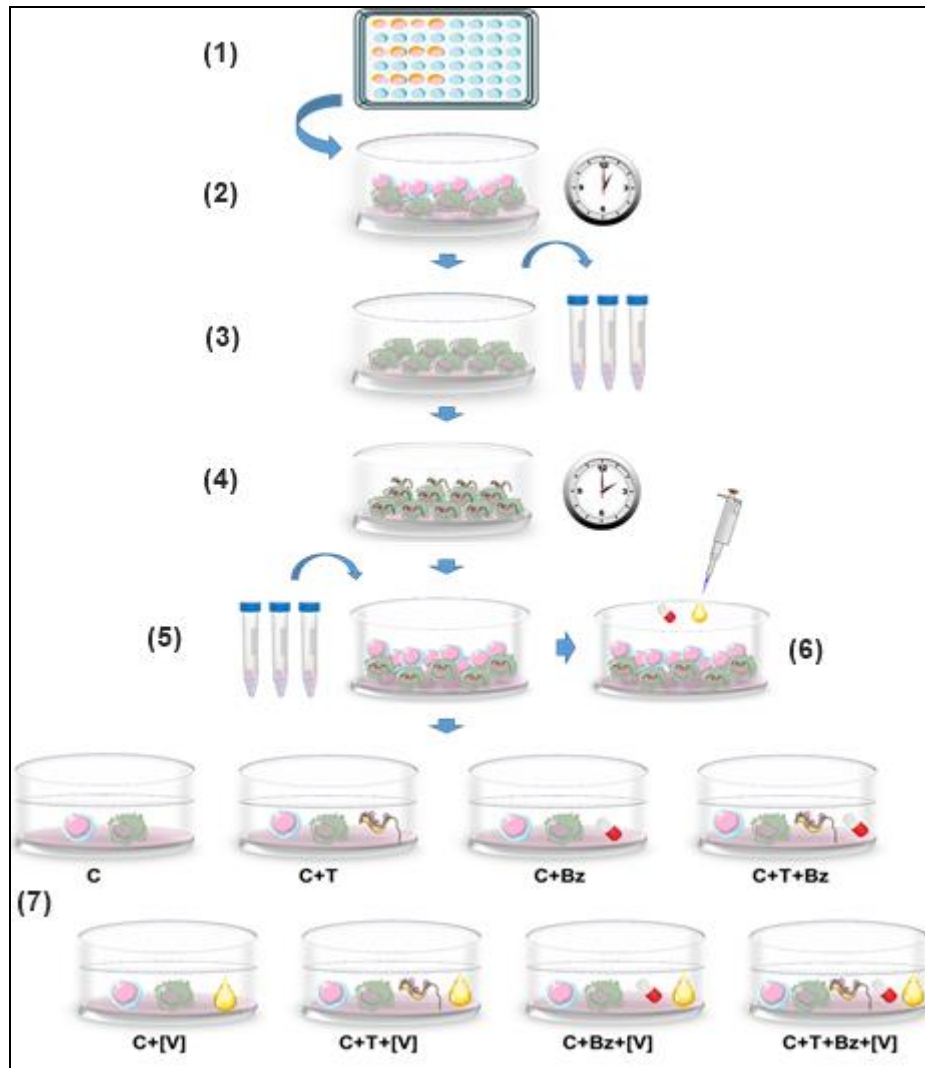
População de estudo - Sangue periférico de indivíduos sem infecção chagásica foi coletado em tubos de coleta a vácuo (Vacutainer®) contendo heparina sódica para obtenção das células mononucleares e utilização nos ensaios de citotoxicidade e cultivo celular e tubos seco para realização da sorologia da DC. Os critérios de

inclusão do estudo foram: possuir sorologia não reagente para infecção pelo *T. cruzi*, não ser de área endêmica e não ter recebido transfusão sanguínea.

Obtenção das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) – Sangue foi adicionado a tubos cônicos de 50mL (BD™) e diluídos em *Phosphate-buffered saline* (PBS) filtrado e estéril na proporção de 1:2. Essa mistura foi adicionada a tubos de prolipropileno (50mL) contendo Ficoll-Hypaque PLUS™ (Amersham Biosciences). Os tubos foram submetidos a centrifugação (900 x g por 30 minutos a 25 °C) e o anel de PBMC formado entre a interface do Ficoll e o plasma foi coletado. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g por 10 minutos a 25 °C), ressuspensas em meio RPMI completo, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio do corante Azul de Trypan (Sigma™) e ajustadas para a concentração de 10^6 células/mL.

Co-cultivo de PBMC e *T. cruzi* com adição de tratamento com veneno e Benzonidazol – O co-cultivo foi realizado, em placas de poliestireno de 48 poços. Um mililitro contendo PBMC (1×10^6 células/mL) em meio RPMI 1640 (Sigma™) completo, e incubado (37° C / 5% CO₂) durante 1h para a adesão das células aderentes (monócitos) ao poço da placa. Em seguida, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas dos poços e transferidas a tubos cônicos de 15mL (37° C / 5% CO₂). Após isso, os monócitos foram infectados com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço) por 2 horas. Os parasitos que não penetraram nas células foram removidos através de lavagens, e os linfócitos foram readicionados aos poços do cultivo. Por ultimo, foi adicionado o veneno de *B. erythromelas* em duas concentrações (11 ou 22 µg/mL) estabelecidas previamente através de ensaio de citotoxicidade, onde a CC50 (concentração citotóxica para 50% das células) foi estabelecida em 22 µg/mL. Além disso, as células foram tratadas em associação com o Bz (1 µg/mL). Essa preparação foi incubada por 1hora e por 24horas. A figura 1 representa o co-cultivo e todas as condições de cultivo utilizadas nesse estudo que serviram como controles.

Figura 1 - Representação esquemática do co-cultivo



Legenda: (1) PBMC foram adicionadas em placas de cultura de 48 poços numa concentração de 1×10^6 células/mL. (2) As PBMC foram incubadas, por 1 hora, para adesão das células aderentes (monócitos). (3) Após o tempo de adesão, as células não aderentes (linfócitos) foram removidas e armazenadas em estufa (37°C / $5\% \text{CO}_2$) em tubos de fundo cônico; (4) Formas tripomastigotas foram adicionadas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço) para infecção das células aderentes (monócitos), por 2 horas. Após o tempo de infecção, as formas tripomastigotas que não infectaram as células foram removidas através de lavagem utilizando meio RPMI completo. (5) Os linfócitos foram readicionados. (6) As condições experimentais foram tratadas com veneno e/ou Bz; (7) C – Células não aderentes (linfócitos) e aderentes (monócitos) da esquerda para direita, respectivamente; C+T – Células e Tripomastigotas; C +Bz - Células e Benzonidazol; C+T+Bz – Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C + [V] – Células e concentração de veneno; C + T + [V] – Células, Tripomastigotas e concentração de veneno; C + Bz + [V] – Células, Benzonidazol e concentração de veneno; C + T + Bz + [V] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e concentração de veneno.

Fonte: Elaborado pela autora.

Deteção dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura por *Cytometric Bead Array* (CBA) – Após 1h e 24h de cultivo, as placas foram centrifugadas ($400 \times g$ por 10 minutos a 25°C) e os sobrenadantes foram coletados e armazenados em microtubos devidamente identificados e armazenados a -20°C para dosagem das citocinas. Os níveis de citocinas foram mensurados através do sistema *Cytometric*

Bead Array (CBA – BD Biosciences), utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences San José, CA USA), conforme recomendado pelo fabricante. Primeiramente, 22 µL da mistura de microesferas 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 foram 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. Ao fim da incubação 1 mL da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e as Beads foram ressuspensas pela adição de 300µL de solução tampão (*Wash Buffer*). As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickson San José, CA USA), utilizando o software CellQuestPro (Beckton Dickson San José, CA USA). Os dados foram analisados e as dosagens das citocinas nas amostras foram estabelecidas por elaboração de uma curva-padrão utilizando o software FCAP 3.1.

Imunofenotipagem para moléculas de superfície em linfócitos e monócitos do co-cultivo de PBMC, *T. cruzi*, Bz e veneno – Após 1 hora de co-cultivo, os linfócitos e monócitos foram removidos utilizando PBS-Wash gelado contendo albumina sérica bovina a 0,5% - Sigma™ e azida sódica a 1% - Sigma™). As células foram transferidas para tubos de poliestireno (BD Systems™; 5 mL) e centrifugadas (400 x g por 5 minutos). Os sobrenadantes foram descartados e adicionados anticorpos monoclonais de superfície para linfócitos para cada tubo: anti-CD4/PerCP (1,5 µL - Invitrogen), anti-CD8/FITC (1,5 µL - Invitrogen), anti-CD28/PE (1,5 µL - Invitrogen) e anti-CD152/CTLA-4/ APC (10 µL - BD) e para monócitos: anti-CD14/FITC (2,5 µL - Invitrogen), anti-HLA-DR/PerCP (2,5 µL - Invitrogen), anti-CD80/PE (1,5 µL - Invitrogen) e anti-CD86/APC (1,5 µL - Invitrogen). Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS Wash por centrifugação (400 x g por 5 minutos). Em seguida, as células foram fixadas utilizando BD Cytofix™ (BD Biosciences®) conforme instruções do fabricante. Os tubos foram estocados a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Estratégia de aquisição e análise de linfócitos e monócitos por citometria de fluxo – A população de linfócitos foi selecionada através de dot plot (Forward Scatter-FSC) versus (Side Scatter-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®.

Análise estatística - Os dados foram exportados para o software computacional Graphpad Prism versão 5.0 Windows® (E.U.A.). Os resultados das análises estatísticas de produção de citocinas, frequência celular e MIF, foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os 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%.

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

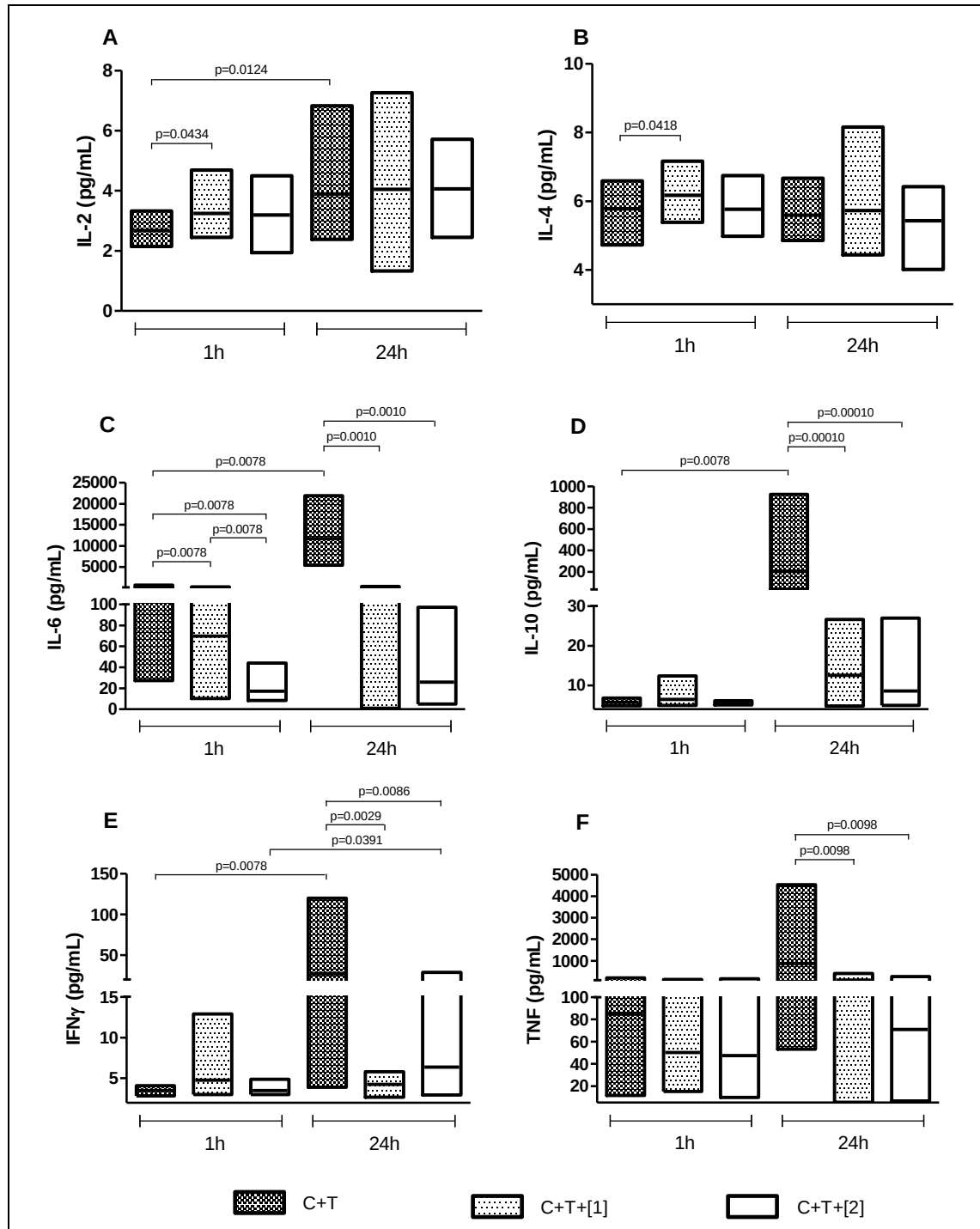
RESULTADOS

Efeito do veneno de *B. erythromelas* em células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* detecção de citocinas no sobrenadante do co-cultivo

Não observamos diferenças nos níveis de IL-2 e IL-4 entre as condições analisadas (Figura 2A e 2B, respectivamente). Nos tempos de 1 hora e 24 horas de cultivo houve uma menor detecção de IL-6 nas condições onde o veneno estava presente (C+T+[1] e C+T+[2]) em comparação ao controle C+T (Figura 2C). Para IL-10, pode-se observar que ao longo do tempo, ou seja quando comparamos 1h com 24h, houve um aumento dessa citocina na condição C+T+[2] (Figura 2D). Porém, os

níveis de IL-10 apresentam-se diminuídos quando comparamos com C+T no tempo de 24h. Resultados semelhantes foram vistos na avaliação dos níveis IFN- γ (Figura 2E). Quanto à TNF, podemos observar níveis menores quando analisamos as condições experimentais com a presença do veneno em comparação ao controle, no tempo de 24 horas (Figura 2F).

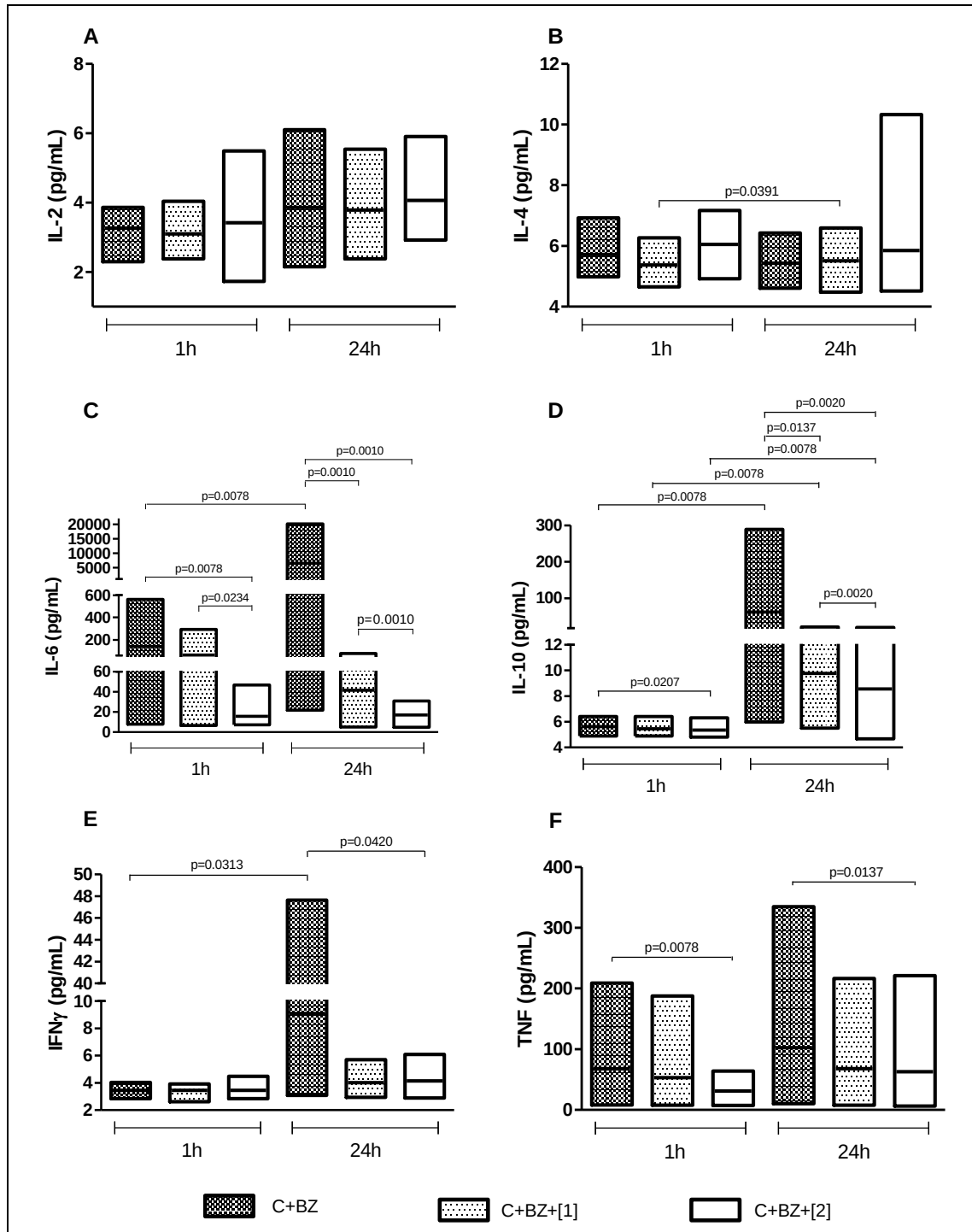
Figura 2 – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em adição de diferentes concentrações de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora e 24 horas.



Efeito da associação do veneno de *B. erythromelas* com Benzonidazol em PBMC

Não observamos diferenças de produção de IL-2 e IL-4 nas condições de cultivo analisadas (Figura 3A e 3B, respectivamente). A produção de IL-6 foi menor nas condições de cultivo onde o Bz foi associado ao veneno (C+Bz+[1] e C+Bz+[2]) quando comparado ao controle C+Bz, nos tempos de cultivo. Podemos observar ainda, que a condições C+Bz+[1] foi estatisticamente maior do que a condição C+Bz+[2], em 1 hora e 24 horas (Figura 3C). Com relação a produção de IL-10 houve uma diminuição da produção dessa citocina nas concentrações de Bz associado ao veneno (C+Bz+[1], C+Bz+[2]) quando comparamos com C+Bz, no tempo de 24 horas (Figura 3D). Vale destacar que ao longo do tempo, houve um aumento dessa citocina, na presença das duas concentrações do veneno. Verificamos uma diminuição da produção de IFN- γ nas condições de cultivo de Bz associado ao veneno quando comparamos com C+Bz, embora a diferença estatisticamente significativa foi observada apenas na condição C+Bz+[2] em 24 horas (Figura 3E). Para TNF observamos menores níveis na condição C+Bz+[2] nos tempos de 1 hora e 24 horas quando comparado com C+Bz (Figura 3F).

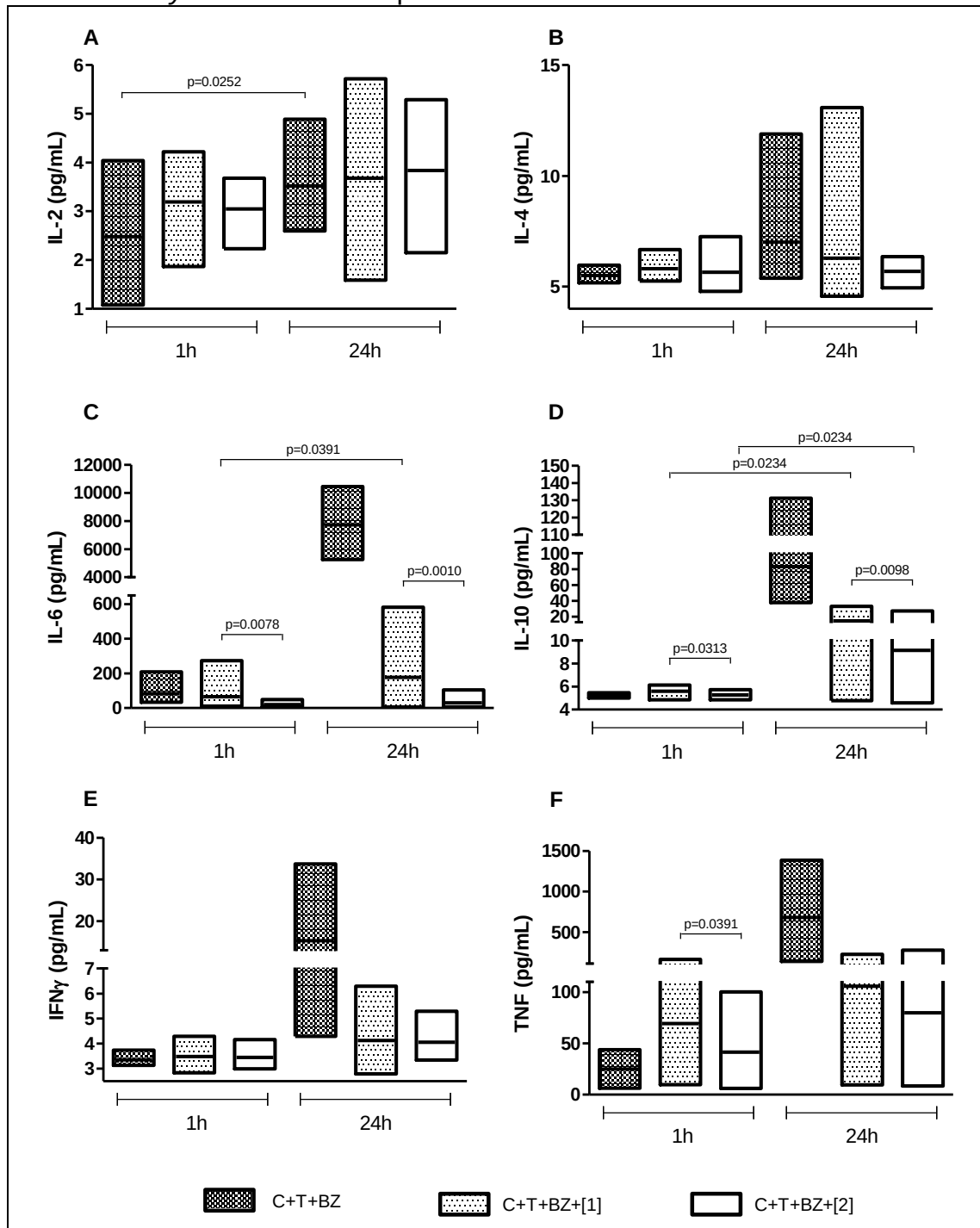
Figura 3 – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença do Benzonidazol e/ou em associação de diferentes concentrações de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora e 24 horas.



Efeito da associação do veneno de *B. erythromelas* com Benzonidazol em células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi*

Não observamos diferenças de produção de IL-2 e IL-4 nas condições de cultivo analisadas (Figura 4A e 4B, respectivamente). A produção de IL-6 aumentou ao longo do tempo na condição experimental C+T+Bz+[1]. Em 24h de cultivo, observamos níveis menores de IL-6 e IL-10 em C+T+Bz+[1] e C+T+Bz+[2] quando comparado ao controle C+T+Bz (Figura 4C e 4D, respectivamente). A produção de IL-10 aumentou ao longo do tempo na condição experimental C+T+Bz+[1] e C+T+Bz+[2] (Figura 4D). Observamos uma evidente diminuição de IFN- γ e TNF, nas condições C+T+Bz+[1], bem como C+T+Bz+[2], quando ao controle, em 24 horas de cultivo (Figura 4E e 4F, respectivamente), apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa.

Figura 4 – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, Benzonidazol e diferentes concentrações de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora e 24 horas.



Legenda: C+T+Bz – Células e tripomastigotas Cepa Y (controle) e benzonidazol; C+T+Bz+[1] – Células, tripomastigotas, benzonidazol e concentração de 11 μ g/mL de veneno; C+T+Bz+[2] – Células, tripomastigotas, benzonidazol e concentração de 22 μ g/mL de veneno de *B. erythromelas* nos tempos de 1 hora (N=8) e 24 horas (N=11). Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas em cada gráfico.

Fonte: Elaborado pela autora.

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

Nossos resultados mostraram que a expressão de CD28 em linfócitos TCD4⁺ foi maior em todas as condições experimentais na presença do veneno em comparação com C, C+T e C+Bz. Por outro lado, linfócitos TCD8⁺CD28⁺ verificamos que estas células estavam em menores frequências nas condições em que o veneno estava presente quando comparada aos controles C, C+T e C+Bz. Quanto à expressão da molécula CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺, verificamos aumento desta molécula nas condições C+T+[1] e C+T+[2] em comparação com C, C+T, C+T+Bz e C+Bz. Com relação à frequência de linfócitos T CD8⁺CTLA-4, verificamos níveis significativamente maiores dessas células na condição C+[1], C+[2], C+T+[1] e C+T+[2] quando comparado a C, C+T, C+Bz e C+T+Bz.

Com relação à Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) da molécula CD28⁺ na população de linfócitos não observamos diferenças estatisticamente significativas importantes entre as condições de cultivo. Porém, quanto à MIF de CTLA-4 observamos níveis significantemente maiores dessa molécula na condição C+T+[1] e C+T+[2] quando comparado a C, C+T e C+Bz (Tabela 1).

Avaliação da expressão das moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ dos monócitos CD14⁺

Com relação à expressão da molécula CD80⁺ em monócitos CD14⁺, verificamos que em todas as condições de cultivo na presença do veneno houve um aumento significativo em comparação aos controles C, C+T e C+Bz. Resultados semelhantes foram vistos quando avaliamos a frequência de células CD14⁺HLA-DR⁺. Ao avaliarmos a frequência da molécula co-estimulatória CD86⁺ na superfície de monócitos CD14⁺ não verificamos diferenças estatísticas significativas entre as condições avaliadas.

Ao avaliarmos a MIF da molécula CD80⁺ em monócitos CD14⁺, observamos níveis significantemente maiores em todas as condições de cultivo na presença do veneno quando comparado a C, C+T e C+Bz. Resultados semelhantes foram observados quando avaliamos a MIF de HLA-DR⁺. Além disso, a MIF de HLA-DR⁺ foi maior em todas as condições de cultivo na presença do veneno quando

comparadas com C+T+Bz. Nenhuma diferença significativa foi observada quanto à expressão da molécula CD86⁺ (Tabela 2).

Tabela 1 - Expressão das moléculas CD28⁺ e CTLA-4⁺ dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e intensidade média de fluorescência

Marcações	%CD4 ⁺ CD28 ⁺	%CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	%CD8 ⁺ CD28 ⁺	%CD8 ⁺ CTLA4 ⁺	MIF CD28 ⁺	MIF CTLA-4 ⁺
C	17.25	1.61	49.45	1.45	74.10	4.50
C+T	18.15	1.48	49.05	1.42	73.50	3.77
C+Bz	16.75	1.66	48.70	1.06	73.70	4.61
C+T+Bz	19.80	2.10	49.50	1.97	76.10	7.47
C+[1]	19.85 ^{a, b, c}	2.59	43.50 ^{b, c, d}	1.99 ^{a, c, e}	72.05	6.24
C+T+[1]	19.60 ^{a, b, c}	3.16 ^{a, b, c, d}	43.55 ^{a, b, c, d}	2.35 ^{a, b, c}	72.35	6.53 ^{a, b, c}
C+Bz+[1]	19.80 ^{a, b, c}	2.07 ^d	43.00 ^{a, b, c, d}	1.62 ^a	72.50	5.84
C+Bz+[1]+T	19.80 ^{a, b, c}	2.45 ^b	43.55 ^{a, b, c, d}	2.10 ^{a, b, c}	72.25	5.88
C+[2]	20.60 ^{a, b, c}	2.16 ^c	42.90 ^{a, b, c, d}	2.43 ^{a, b, c, e}	72.20 ^a	6.30 ^c
C+T+[2]	20.80 ^{a, b, c}	2.63 ^{a, b, c}	43.70 ^{a, b, c, d}	2.87 ^{a, b, c, d}	73.55	7.40 ^{a, b, c}
C+Bz+[2]	20.35 ^{a, b, c}	2.30 ^c	43.20 ^{a, b, c, d}	2.42 ^{a, b, c}	72.55	6.27 ^c
C+Bz+[2]+T	20.35 ^{a, b, c}	2.43 ^c	43.40 ^{a, b, c, d}	2.42 ^{a, b, c, d}	72.40 ^b	6.66 ^{b, c}

Legenda: Linfócitos T %CD4⁺CD28⁺; Linfócitos T %CD4⁺CTLA-4⁺; Linfócitos T %CD8⁺CD28⁺; Linfócitos T %CD8⁺CTLA-4⁺; MIF - Intensidade Média de Fluorescência; C – Células; C + T – Células e Tripomastigotas; C + Bz – Células e Benzonidazol; C + T + Bz – Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C + [1] – Células e 11µg/mL de veneno; C + T + [1] – Células, Tripomastigotas e 11µg/mL de veneno; C + Bz + [1] – Células, benzonidazol e 11µg/mL de veneno; C + T + Bz + [1] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e 11µg/mL de veneno; C + [2] – Células e 22µg/mL de veneno; C + T + [2] – Células, Tripomastigotas e 22µg/mL de veneno; C + Bz + [2] – Células, Benzonidazol e 22µg/mL de veneno; C + T + Bz + [2] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e 22µg/mL de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora. Os valores expressos equivalem à mediana das condições experimentais (N=8).

(a) p≤0.05 quando comparado a C

(b) p≤0.05 quando comparado a C+T

(c) p≤0.05 quando comparado a C+Bz

(d) p≤0.05 quando comparado a C+T+Bz

(e) p≤0.05 entre C+[1] e C+[2]

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Expressão das moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺ dos monócitos CD14⁺ e intensidade média de fluorescência.

Marcações	%CD14 ⁺ CD80 ⁺	%CD14 ⁺ CD86 ⁺	%CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	MIF CD80 ⁺	MIF HLA-DR ⁺	MIF CD86 ⁺
C	5.21	100	43.00	4.69	46.00	100
C+T	4.94	100	39.90	4.67	43.30	100
C+Bz	4.81	100	42.65	4.42	48.30	100
C+T+Bz	2.36	100	43.60	3.55	46.10	100
C+[1]	18.30 ^{a, c, e}	99.94	73.85 ^{a, b, c}	25.85 ^{a, b, c}	75.40 ^{a, c}	100
C+T+[1]	29.40 ^{a, b, c}	99.93	73.10 ^{a, c, f}	30.25 ^{a, b, c}	74.45 ^{a, c}	100
C+Bz+[1]	27.60 ^{a, b, c}	99.89	73.95 ^{a, c, g}	34.80 ^{a, b, c}	75.75 ^{a, c}	100
C+Bz+[1]+T	29.00 ^{a, b, c}	99.89	74.10 ^{a, b, c}	26.60 ^{a, b, c}	75.45 ^{a, c}	100
C+[2]	37.00 ^{a, b, c, e}	99.94	81.25 ^{a, b, c, d, f}	36.15 ^{a, b, c}	82.45 ^{a, b, c}	100
C+T+[2]	36.40 ^{a, b, c}	99.94	83.75 ^{a, b, c, d}	34.25 ^{a, b, c}	85.40 ^{a, b, c}	100
C+Bz+[2]	31.30 ^{a, b, c}	99.90	78.50 ^{a, b, c, d, g}	32.05 ^{a, b, c}	80.50 ^{a, b, c}	100
C+Bz+[2]+T	40.00 ^{a, b, c}	99.83	78.40 ^{a, b, c}	34.40 ^{a, b, c}	80.05 ^{a, b, c}	99.95

Legenda: Monócitos %CD14⁺CD80⁺; Monócitos %CD14⁺HLA-DR⁺; Monócitos %CD14⁺CD86⁺; MIF - Intensidade Média de Fluorescência; C – Células; C + T – Células e Tripomastigotas; C + Bz – Células e Benzonidazol; C + T + Bz – Células, Tripomastigotas e Benzonidazol; C + [1] – Células e 11µg/mL de veneno; C + T + [1] – Células, Tripomastigotas e 11µg/mL de veneno; C + Bz + [1] – Células, Benzonidazol e 11µg/mL de veneno; C + T + Bz + [1] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e 11µg/mL de veneno; C + [2] – Células e 22µg/mL de veneno; C + T + [2] – Células, Tripomastigotas e 22µg/mL de veneno; C + Bz + [2] – Células, Benzonidazol e 22µg/mL de veneno; C + T + Bz + [2] – Células, Tripomastigotas, Benzonidazol e 22µg/mL de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora. Os valores expressos equivalem à mediana das condições experimentais (N=8).

- (a) p≤0.05 quando comparado a C
- (b) p≤0.05 quando comparado a C+T
- (c) p≤0.05 quando comparado a C+Bz
- (d) p≤0.05 quando comparado a C+T+Bz
- (e) p≤0.05 entre C+[1] e C+[2]
- (f) p≤0.05 entre C+T+[1] e C+T+[2]
- (g) p≤0.05 entre C+Bz+[1] e C+Bz+[2]

Fonte: Elaborado pela autora.

DISCUSSÃO

O Benzonidazol (Bz) é o único fármaco disponível para tratamento da doença de Chagas no Brasil. A eficácia desta droga é variável, onde, as taxas de cura dos pacientes na fase crônica são reduzidas (COURA et al., 1997; COURA; CASTRO, 2002; MARIN-NETO et al., 2008; MARIN-NETO et al., 2009). Embora haja poucos estudos na literatura, venenos de serpentes têm sido demonstrados por possuírem ação tripanocida (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO, et al., 2005). Nesse contexto, é necessário compreender o potencial imunomodulador do veneno *B. erythromelas*. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do veneno bruto de *B. erythromelas*, uma jararaca encontrada amplamente na região Nordeste do Brasil, sobre células infectadas *in vitro* com *T. cruzi*.

Ao avaliarmos o efeito do veneno de *B. erythromelas* sobre células infectadas com *T. cruzi*, vimos que com o passar do tempo de cultivo, ou seja, quando comparamos os dois tempos de cultura, houve aumento das citocinas no sobrenadante de cultura. Entretanto, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ e TNF, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, diminuíram drasticamente quando comparamos com as células infectadas sem tratamento ou associada ao tratamento com Bz.

As citocinas são importantes mediadores que regulam a duração e a intensidade da resposta imune. São proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas por leucócitos e outros tipos celulares, que atuam como mediadores químicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Estudos em modelo experimental mostraram que IFN- γ e TNF desempenham um importante papel no controle parasitário durante a fase aguda da DC por ativar as células apresentadoras de antígenos auxiliando sua função tripanocida (REED, 1988; SILVA et al., 1992; LANNES-VIEIRA et al., 2011) porém, no tecido cardíaco, essas citocinas estão associadas com maior inflamação e poderiam estar induzindo dano tecidual (ZHANG; TARLETON, 1996; SOARES et al., 2001; GOMES, 2003).

Em humanos, indivíduos considerados curados após tratamento etiológico apresentaram altos níveis de IFN- γ em comparação aos indivíduos não curados, sugerindo que essa citocina pode favorecer a eficácia terapêutica e ser um biomarcador de cura (BAHIA-OLIVEIRA, 2000). Por outro lado, Laucella et al.,

(2009) verificaram que pacientes submetidos ao tratamento com Bz apresentaram uma diminuição de IFN- γ após 12 meses de terapia. Os autores defendem que na fase crônica, a utilização do Bz associada a uma competente resposta imune específica ao parasita poderia ser considerada um indicativo de eficácia de tratamento e cura.

As citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF em altos níveis têm sido apontadas como responsáveis pela manutenção da inflamação no tecido cardíaco. Por outro lado, maiores níveis de IL-10 têm sido encontrados em portadores da forma indeterminada da DC, estando relacionada com a proteção do hospedeiro contra o desenvolvimento de formas crônicas sintomáticas (CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003). Nossos resultados nos levam a crer que o veneno de *B. erythromelas* suprime a resposta celular, principalmente a de perfil pró-inflamatório, mas também induz a diminuição de IL-10.

Nós avaliamos também, o efeito da associação do veneno ao Bz. Sabe-se que o sinergismo de drogas com a resposta imune contribui para o sucesso do tratamento de doenças infecto-parasitárias (COURA, 2009). A associação de fármacos ou compostos ao Bz já é bem relatado na literatura (MALDONATO et al., 1993; MALDONADO et al., 1993; ARAÚJO et al., 2000; COURA, 2009; URBINA, 2003; URBINA, 2010; LOPEZ-MUÑOZ et al., 2010; ALVES et al., 2012; VILAR-PEREIRA, 2012) por promover resultados satisfatórios no sentido de potencializar o efeito anti-*T. cruzi*. Nossos resultados mostraram que o veneno de *B. erythromelas* isolado ou em associação com Bz, em células infectadas e em células sem infecção (dados não mostrados), diminuiu a produção das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF e IL-10, quando comparamos às células apenas tratadas com BZ. Ou seja, o veneno modula negativamente, de forma geral, a produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2. Porém, nossos resultados diferem dos de Luna et al., (2011) que em cultura de esplenócitos murinos observaram que o veneno de *B. erythromelas* induziu elevada produção de IFN- γ , IL-6, IL-10 e óxido nítrico. É importante salientar que nosso estudo é pioneiro em demonstrar o efeito de produção de citocinas induzido por veneno em células humanas e infectadas por um protozoário, como o *T. cruzi*.

Avaliamos a frequência dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ através de expressão das moléculas de ativação (CD28) e de inibição (CTLA-4, antígeno 4 do linfócito T citotóxico) presentes na superfície de linfócitos. Além disso, estudamos a expressão

de HLA-DR (MHC de classe II) e das moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e CD86⁺), presentes em monócitos CD14⁺. De forma geral, nossos resultados mostraram que houve aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ e diminuição de CD8⁺CD28⁺ nas condições de cultivo, mas com aumento de expressão da molécula CTLA-4, onde o veneno estava presente, indicando que este fenômeno é consequência do tratamento com veneno, independente da infecção e da associação com o Bz. Além disso, o veneno também aumentou a frequência de monócitos CD14⁺ CD80⁺, bem como de CD14⁺HLA-DR⁺.

As interações entre os macrófagos e os linfócitos são essenciais para o direcionamento de uma resposta imune eficiente. A ativação de células T envolve o acoplamento do Receptor de Linfócito T (TCR) ao complexo MHC-peptídeo encontrados na superfície das Células Apresentadoras de Antígeno (APC), como os monócitos CD14⁺, bem como de um sistema apropriado de co-estimulação. Uma das vias de co-estimulação mais importante consiste na interação entre a molécula CD28 expresso em células T e as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, presentes nas APC. Assim, os sinais gerados por essas ligações promovem a proliferação dos linfócitos T (WANG; CHENG, 2004). Já quando a molécula acessória CTLA-4 interage com as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, há uma indução de sinais negativos que inibem a ativação de células T (WANG; CHEN 2004). Enquanto a molécula CD86⁺ é distribuída constitutivamente, ou seja, tem uma expressão mais abundante na superfície dos monócitos, a molécula CD80⁺ aumenta sua expressão quando a célula se torna ativada por estímulos (LENSCHOW et al., 1994). A molécula HLA-DR é um receptor de monócitos e macrófagos do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e é responsável pelo processamento de antígenos endocitados (TURLEY et al., 2000).

As células T ativadas (expressando HLA-DR) são predominantes nas lesões inflamatórias cardíacas chagásicas (REIS et al., 1993). Células expressando HLA-DR também estão em maior frequência no sangue periférico de portadores crônicos da doença. Mas, enquanto há um aumento da expressão de HLA-DR, há uma ausência da expressão de CD28 em células T (MENEZES et al., 2004), o que sugere uma relação entre essas células e a doença. Um estudo realizado por Souza et al. (2007) demonstraram maior expressão de CTLA-4⁺ em linfócitos T de portadores da forma indeterminada da doença sugerindo que o parasita induz uma

modulação da resposta imune nesses pacientes. No estudo de Neves (2015), onde foi encontrado aumento de CTLA-4 e diminuição de CD28⁺ em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de co-cultivo obtidas de PBMC de portadores crônicos da DC, infectadas com *T. cruzi* e tratadas *in vitro* com Bz, sugerindo assim um possível mecanismo de fuga do sistema imunológico. Desta forma, acreditamos que o veneno induz a ativação de monócitos T CD14⁺, pela aumento aumento das frequências de CD14⁺CD80⁺ e CD14⁺HLA-DR⁺ e de linfócitos T CD4⁺CD28⁺. Por outro lado, ao mesmo tempo que o veneno induziu uma ativação celular, também induziu mecanismos inibitórios para modulação desta ativação através do aumento da frequência da molécula CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺.

É digno de nota que não observamos estudos visando a avaliação da imunomodulação utilizando venenos bruto de serpentes para tratar células *in vitro*. Nosso estudo mostrou a forte modulação negativa da produção de citocinas que o veneno induz em PBMC de humanos infectadas com *T. cruzi*. É importante salientar que verificamos a ativação celular de monócitos CD14⁺ e linfócitos T CD4⁺, mas também inibição, pelo aumento de CTLA-4 em linfócitos T, o que sugere uma demonstração de homeostase imunológica. Por ser uma mistura complexa de substâncias bioativas pouco se conhece sobre todas as funções dessas substâncias presentes no veneno. Acreditamos que isolados purificados do veneno de *B. erythromelas* desta serpente sejam promissores para induzir uma resposta balanceada entre os perfis Th1 e Th2, sendo uma perspectiva de nosso grupo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5) e Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (PROEP- FACEPE AQP-1703-2.11/15) pelos recursos financeiros. Ao Serviço de Referência em Doença de Chagas pelo suporte técnico na pessoa do Sr. Mineo Nakazawa. Ao Instituto Aggeu Magalhães - IAM/Fiocruz, pela infraestrutura necessária para a realização do trabalho e ao Museu de Répteis da Caatinga, pela colaboração.

Conflito de Interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALVES, M. C. S. et al. Uso da associação de benznidazol e espironolactona em camundongos na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**. v.41, n.2, p.179-193. 2012.
- ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, A. O.; PEREIRA, M. E. S.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 819-824, 2000.
- 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.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- COURA, J. R et al. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: **Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap. 27, p.469-486, 1997.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.3-24, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104 (Suppl. I), p.31-40, 2009.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 253-255, 1999.
- DEOLINDO, P. et al. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Brasil, v.100, n.1, p.33-38, 2005.
- FERNANDEZ-GOMEZ, R. et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which Interact with the parasites. **Toxicon**, v.32, n.8, p.875-882, 1994.

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.

GONÇALVES, A. R. et al. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v.88, n.7, p.598-202, 2002.

KOH, D.C.I.; ARMMGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, n.24, p.3030-3041, 2006.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon**, v.59, n.4, p.497-506, 2012.

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.

LANNES-VIEIRA, J. et al. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.691, p.221-230, 2011.

LENSCHOW, D. J. et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.153, n.5, p.1990–1997, 1994.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEELIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. A. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 167-171, 2010.

LUNA, K. P. O. et al. *B. erythromelas* snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v.3, p.9-18. 2011.

MALDONATO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, USA, v. 37, n. 6, p. 1353-1359, 1993.

MARIN-NETO et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, v.156, p.37-43, 2008.

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

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

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.

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

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **The Journal of Immunology**, v. 140, n.12, p.4342-4347, 1988.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, Stanford, v.156, p.261-273, 1949.

SILVA et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of experimental Medicine**, v.175, p.169-174, 1992.

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

SOUZA, P.E.A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease. **Infection Immun.** v.75, n.4, p.1886-1894, 2007.

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

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

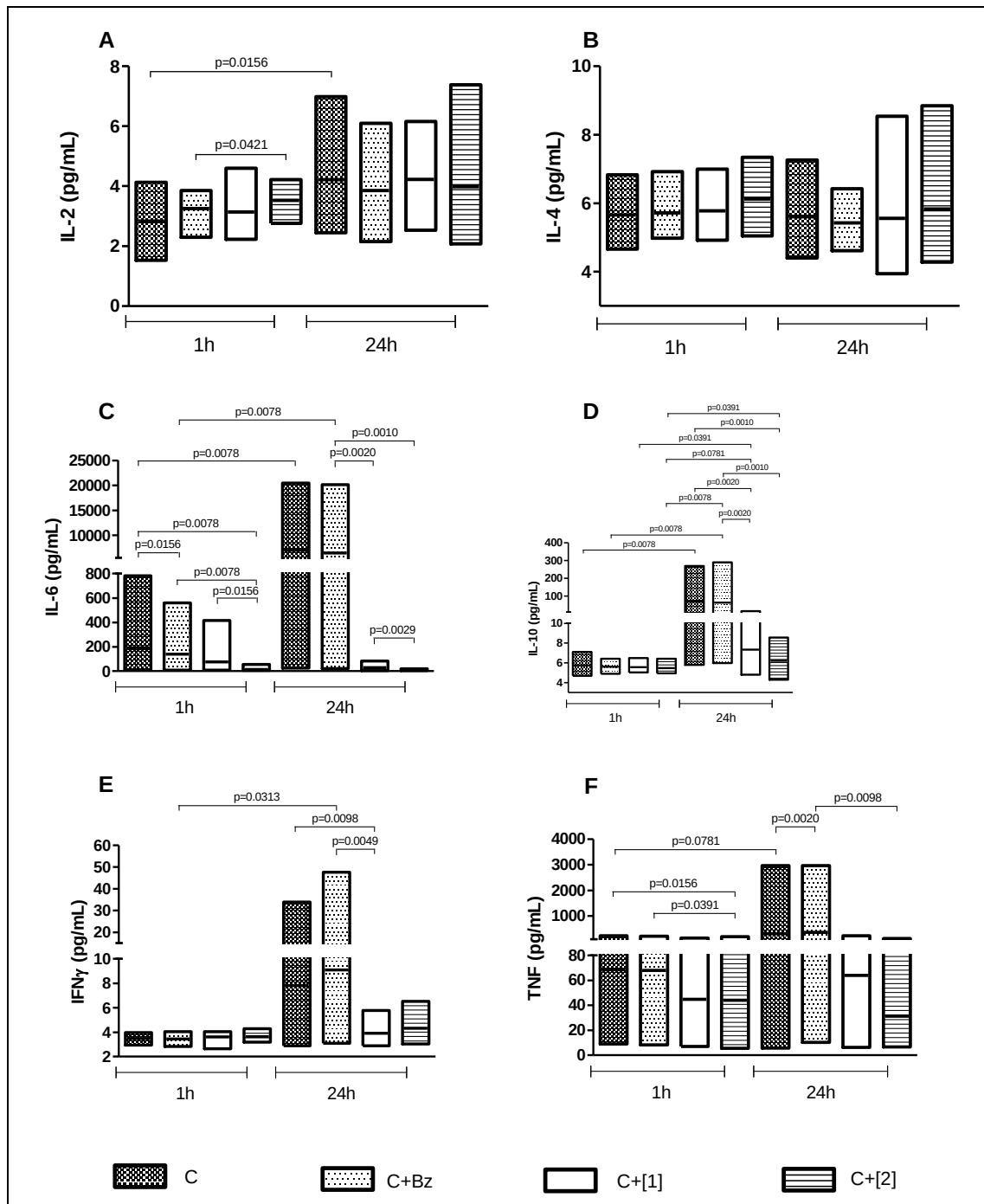
URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, p. 55-58, 2010.

VILAR-PEREIRA, G. et al. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. **Brain, Behavior, and Immunity**. V.26, P.1136-1149. 2012.

WANG, S.; L. CHENG. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cellular and Molecular Immunology**, Philadelphia, v.1, p.37-42, 2004.

ZHANG, L; TARLETON, R.L; Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **European Journal of Immunology**, v.26, n.1, p.102-109, 1996.

Figura suplementar do artigo – Quantificação de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico e presença do Benzonidazol e células mononucleares e diferentes concentrações de veneno de *B. erythromelas* no tempo de 1 hora e 24 horas.



Legenda: C+BZ – Células e benzonidazol; C+[1] – Células e concentração de 11µg/mL de veneno; C+[2] – Células e concentração de 22µg/mL de veneno de *B.erythromelas* nos tempos de 1 hora (N=8) e 24 horas (N=11).

Fonte: Elaborado pela autora.

8 CONCLUSÃO

O veneno bruto de *B. erythromelas* isolado ou associado ao Bz suprime a produção de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, IFN- γ e TNF) e anti-inflamatórias (IL-10) observada em células mononucleares infectadas ou não pelo *T. cruzi*. Porém, o tratamento com veneno induziu aumento da expressão de CD28⁺ em linfócitos TCD4⁺ e em monócitos CD14⁺, aumento da expressão das moléculas de ativação CD80⁺ e HLA-DR⁺ demonstrando que o veneno induz ativação dessas células. Por outro lado, o veneno induziu aumento da expressão de CTLA-4⁺ em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ indicando que pode conduzir a um controle da ativação exacerbada dessas células.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P.L.M.M. et al. Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.55, p.295-301, 2013.
- ANDRADE, J. P.; MARIN NETO, J. A. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Resumo. Artigo Especial. **Diretriz de cardiopatia chagásica**. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Rio de Janeiro, RJ-Brasil, p.434-442, 2011.
- AZEVEDO, J. D. I. L.M. et al. Molecular cloning and expression of functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.39836-39842, 2001.
- 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. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.298, n.18, p.2171-2181, 2007.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
- 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**, Uberaba, v.44, n.3, p.318-323, 2011.
- BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap.10, p.170-176. 2000.
- CANÇADO, J. R. Terapêutica Específica. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap.27, p.469-486, 1997.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR. V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p.73-86, 2003.

CARRASCO et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v.41, n.2, p.109-24, 2012.

CASTILLO-VIGIL, A. et al. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. **Bol Mal Salud Amb**, Maracay, v.48, n.2, p.135-144, 2008.

CONSENSO brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, Suplemento, v.38, 2005.

COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: **Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap. 27, p.469-486, 1997.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, 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.

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

CUNHA, Elaine Moio da; MARTINS, Otávio Augusto. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**. v.2, p.21-26, 2012.

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

DEOLINDO, P. et al. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Brasil, v.100, n.1, p.33-38, 2005.

DEOLINDO, P. et al. L-Amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**. v.56, p.944-955, 2010.

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

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v.21, n.3, p.287-292, 2008.

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 immunology**, v.36, n.8, p.377–387, 2014.

FERNANDEZ-GOMEZ, R. et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which Interact with the parasites. **Toxicon**, v.32, n.8, p.875-882, 1994.

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, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 Suppl 1, p.115-121, 2009.

GONÇALVES, A. R. et al. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v.88, n.7, p.598-202, 2002.

HARVEY, A. L. Snake Venom Peptides. In: KASTIN, A. J. **Handbook of Biologically Active Peptides**. Burlington: Academic Press, p.355-362, 2006.

HERNANDEZ, P. et al. Highly Effective Serodiagnosis for Chagas' Disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.10, p.1598-1604, 2010.

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

KASTURIRATNE, A. et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLOS Medicine** v.5, p.1591-1604, 2008.

KOH, D.C.I.; ARMMGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, n.24, p.3030-3041, 2006.

KOH, C. Y.; KINNI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon**, v.59, n.4, p.497-506, 2012.

LALLOO, D. Venomous bites and stings. **Medicine**, v.33, n.1, p.52-55, 2010.

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.

LUNA, K. P. O. et al. *B. erythromelas* snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v.3, p.9-18, 2011.

LUQUETTI, A. O. Chagas disease - a recent meeting on practical aspects. Applied meeting of Chagas disease 4-6 November 1993, Uberaba, Brazil. **International Journal Parasitology**, v.25, n.7, p.869-871, 1995.

LUQUETTI, A. O. et al. Performance levels of four Latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.5, p.797-800, 2009.

MARIN-NETO et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, v.156, p.37-43, 2008.

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

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, n.12, p.1749-1800, 1998.

MARTINS, G. A. et al. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v.172, n. 8, p.4893-4901, 2004.

MATSUMOTO, T. K., et al. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.6, p.1486-1492, 1993.

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, 2007.

MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution? **Toxicon**, v.39, n.1, p.87-96, 2001.

MENDES, R. P. et al. Serological diagnosis of Chagas disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.7, p.1829-1834, 1997.

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

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.100, n.6, p.1-15, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.12, p.55-63, 1983.

NEGRETTE, O. S. et al. Serological Evaluation of Specific-Antibody Levels in Patients Treated for Chronic Chagas' Disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.15, n.2, p.297-302, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of Chagas disease**. Geneva, (WHO Technical Report Series, n. 905). 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Chagas Disease: Fact Sheet and Poster. Research and Training in Tropical Diseases. Geneve, 2009. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/AD/DPC/CD/dch-poster.htm>>. Acesso em 7 de out de 2016.

PASSERO, L. F. D. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* Venoms. **Parasitology Research**, v.101, p.1365-1371, 2007.

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

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

RIVERO, J. V. R. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de Bothrops jararacuçu em células mononucleares do sangue periférico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, 2010.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating fator released from plasma globulin by sanke venoms e by trypsin. **American Journal of Physiology**, Stanford, v.156, p.261-273, 1949.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: SOERENSEN, B., **Animais Peçonhentos**. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro p. 1-45, 1990.

SALDARRIGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v.42, n.4, p.405-411, 2003.

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

SCHOFIELD, C.J., JANNIN, J., SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **TRENDS in Parasitology**, Londres, v.22, n.12, p.583-588, 2006.

SILVA, A. M. M. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v.29, n.6, p.713-723, 1991.

SILVA, M.B. et al. A prothrombin activator from *B. erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v.369, p.129-39, 2003.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. In: Stcker, K. F., ed. Medical use of snake proteins. **CRC Press**, Boca Ratin, v.2. 1990.

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

SOARES, M. M. S. **Identificação taxonômica das serpentes coletadas no estado de Pernambuco**. 65f. (Monografia do Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

TEMPONE A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom Kills *Leishmania* spp. with Hydrogen Peroxide Generated by Its L-Amino Acid Oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n.3, p.620-624, 2001.

UETZ, P; JACOB HALLERMAN, J; HOREK, J. The Reptile Database: *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923). Disponível em: <http://reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=erythromelas>. Acesso em 09 de novembro de 2016.

VASCONCELOS, C. M. L. **Estudo da peçonha de *B. erythromelas*: caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição**. 112f. (Dissertação de Mestrado em Biofísica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

VELLARD, J. Variation géographique du venin de *Bothrops atrox*. **Comptes Rendus de Académie des Sciences**, v.204, p.1369-71, 1938.

APÊNDICE A – Original article

Modulation of the immune response induced by *Bothrops erythromelas* venom in *Trypanosoma cruzi*-infected mononuclear cells

Kamila Kássia dos Santos Oliveira¹; Karla Patrícia de Oliveira Luna²;
Virginia Maria Barros de Lorena^{1,3, #}

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

² Department of Biology, State University of Paraíba, UEPB, PB, Brazil.

³ Department of Immunology, Instituto Aggeu Magalhães, IAM / Fiocruz, PE, Brazil.

Integrated Program of Chagas Disease, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence: Virginia Maria Barros de Lorena, Instituto Aggeu Magalhães / Fiocruz, Department of Immunology, Avenida Moraes Rego, s / n. Phone: 81 2101-2563 - CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

It is described in the literature that venom of snakes have shown anti-*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) activity, however, the immunological modulation caused by venom is still incipient. The present study aimed to investigate the effect of *Bothrops erythromelas* venom on the immune response induced in culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* and treated in vitro with the venom. PBMC were used for cell co-culture assays in the presence of venom and / or benzonidazole. The levels of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF) were evaluated in the culture supernatant as well as CD28 + and CTLA-4 + expression in CD4 + and CD8 + T lymphocytes and CD80 +, CD86 + and HLA-DR + molecules on CD14 + monocytes were evaluated by flow cytometry. Our results showed that the venom suppresses the production of cytokines IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF. However, venom treatment induced an increase of CD28 + molecules in CD4 + and HLA-DR + and CD80 + T lymphocytes in CD14 + monocytes, demonstrating that an immunological homeostasis occurred by the promoted cellular activation.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*. Poison. Cytokines. Immunity cellular.

Introduction

Chagas' disease (CD), tissue and hematological infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is transmitted to humans and other mammals by hematophagous triatomine insects, with *Triatoma infestans* being the most important vector. CD is a public health problem that affects millions of people around the world (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Benzonidazole (Bz) is the only therapy available for treatment in Brazil. However, the efficacy of the drug is variable, with cure rates around 60% to 80% in the acute phase, and in the chronic phase there is a disagreement about the usefulness of the therapy due to the adverse

reactions, low cure rates and the absence of criteria for curing evaluation (COURA, 1997; COURA; CASTRO, 2002; MARIN-NETO et al., 2009).

Some studies have shown that venom of snakes can act with trypanocidal action, without inducing important cytotoxic effects in host cells (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005). *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) is a jararaca found extensively in the Northeast region of Brazil. In culture of murine splenocytes the *B. erythromelas* venom induced the production of cytokines (IFN- γ and IL-6) and nitric oxide, presenting a pro-inflammatory profile but modulated by the production of IL-10, a cytokine anti-inflammatory activity (LUNA et al., 2011).

However, animal venom have been important pharmacological tools for the prospection of drugs. For example, the drugs marketed in Europe and the United States, such as antithrombotics, anesthetics, coagulation cascade activators (ROCHA et al., 1949; KOH; ARMMGAM; JEYASEELAN, 2006; KOH; KINI, 2012) . Even so, the venom with antiparasitic action are still a little studied area. Considering that ophidian venom are a source of enzymes - 90% of their total weight - it is inferred that they can contribute to the destruction of parasites, even if intracellular, since phospholipases destroy the cell membrane allowing the entry of toxins into the cells. These toxins may have direct action on the parasite. However, the immunological investigation against the action of the venom was not evaluated in *T. cruzi* infection. Thus, knowing the immunological phenomena resulting from the in vitro treatment of mononuclear cells with venom of *B. erythromelas*, associated or not with benzonidazole may help to design therapeutic strategies in Chagas disease.

Materials and methods

Obtaining venom - Venom of *B. erythromelas* snakes were obtained through the milking of captive specimens from the Living Reptiles Museum of Caatinga, located in Campina Grande, PB. Protein concentrations of each venom were determined by method the Bradford (1976).

Parasites - Trypomastigote forms of Strain Y kept frozen at -80 ° C were thawed and used for infection of Vero cells cultured in supplemented RPMI 1640 (Sigma TM)

medium (10% fetal bovine serum (GFR) (GIBCO®) and 1% of penicillin / streptomycin (Lonza) (complete RPMI medium) were incubated for 24 hours in a 5% CO₂ at 37°C. After the incubation the supernatant was removed for removal of the parasites that did not infect the cells. The cells were observed under microscope and maintained the trypomastigote forms for use in the cell culture assays. After the rupture of the Vero cells, the free trypomastigotes in the cell were incubated for 5 to 7 days. culture medium were collected, centrifuged (200 x g for 10 minutes at 20°C). The trypomastigotes were counted in Neubauer's chamber and adjusted to concentrations of use.

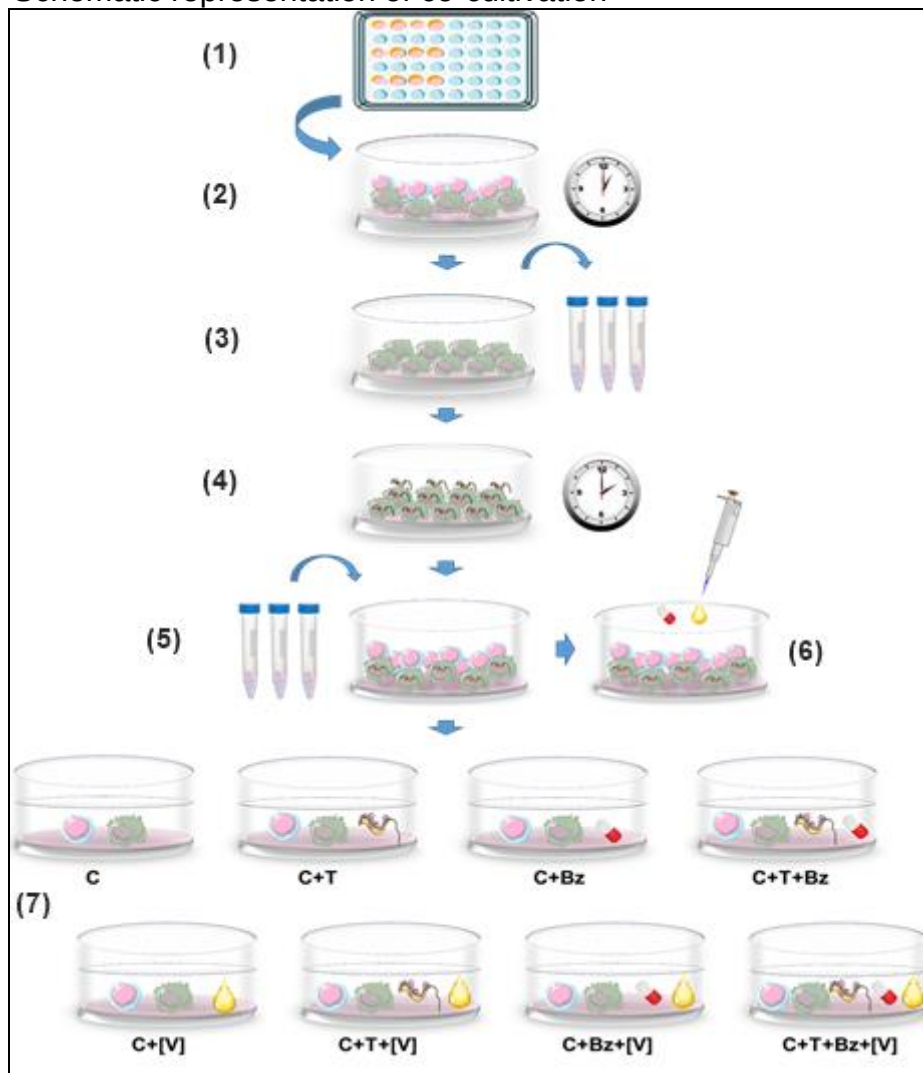
Study population - Peripheral blood of individuals without chagasic infection was collected in vacuum collection tubes (Vacutainer®) containing sodium heparin to obtain mononuclear cells and used in the cytotoxicity and cell culture and dry tubes assays to perform CD serology. The inclusion criteria of the study were: to have non-reactive serology for *T. cruzi* infection, to be non-endemic and not to receive blood transfusion.

Obtaining Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) - Blood was added to 50mL conical tubes (BDTM) and diluted in sterile filtered and sterile Phosphate-buffered saline (PBS) in a ratio of 1: 2. This mixture was added to sterilized polypropylene tubes (50mL) containing Ficoll-Hypaque PLUSTM (Amersham Biosciences). The tubes were centrifuged (900 x g for 30 minutes at 25 ° C) and the PBMC ring formed between the Ficoll interface and the plasma was collected. The cells were washed twice by centrifugation (400g for 10 minutes at 25°C), resuspended in complete RPMI medium, and counted in Neubauer's chamber with the aid of the Trypan Blue dye (Sigma™) and adjusted to the concentration of 10⁶ cells/mL.

Co-cultivation of PBMC and *T. cruzi* with addition of venom and benzonidazole treatment - Co-cultivation was performed in 48-well polystyrene plates. One milliliter containing PBMC (1 x 10⁶ cells / mL) in RPMI 1640 medium (Sigma™) completely, and incubated (37 ° C / 5% CO₂) for 1h for the adhesion of adherent cells (monocytes) to the well of the plate. Then, non-adherent cells (lymphocytes) were removed from the wells and transferred to 15mL (37°C / 5% CO₂) tapered tubes. After this, the monocytes were infected with trypomastigote forms (2.5 x 10⁵ parasites

/ well) for 2 hours. Parasites that did not penetrate the cells were removed through washes, and the lymphocytes were re-attached to the culture wells. Finally, the venom was added *B. erythromelas* in two concentrations (11 or 22 mg/mL) previously established by cytotoxicity assay, where the CC50 (cytotoxic concentration for 50% of the cells) was set at 22 µg / mL. In addition, the cells were treated in association with Bz (1 µg/mL). This preparation was incubated for 1 hour and for 24 hours. Figure 1 shows the co-cultivation and all cultivation conditions used in that study that served as controls.

Figure 1 - Schematic representation of co-cultivation



Legend: (1) PBMCs were added in 48-well culture plates at a concentration of 1×10^6 cells / mL. (2) PBMC were incubated for 1 hour for adhesion of adherent cells (monocytes). (3) After the adhesion time, the non-adherent cells (lymphocytes) were removed and stored in an oven (37°C / $5\% \text{CO}_2$) in conical bottom tubes; (4) Trypomastigote forms were added (2.5×10^5 parasites / well) for infection of adherent cells (monocytes) for 2 hours. After the time of infection, the trypomastigote forms that did not infect the cells were removed by washing using complete RPMI medium. (5) The lymphocytes were readmitted. (6) The experimental conditions were treated with venom and / or Bz; (7) C - Non-adherent (lymphocytes) and adherent (monocytes) cells from left to right, respectively; C + T - Cells and Trypomastigotes; C + Bz - Cells and Benzonidazole; C + T + Bz - Cells, Trypomastigotes and Benzonidazole; C + [V] - Cells and concentration of venom; C + T + [V] - Cells, trypomastigotes and venom concentration; C + Bz + [V] - Cells, benzonidazole and venom concentration; C + T + Bz + [V] - Cells, trypomastigotes, benzonidazole and venom concentration.

Source: Prepared by the author.

Detection of cytokine levels in the culture supernatant by Cytometric Bead Array (CBA) - After 1h and 24h culture, the plates were centrifuged ($400g$ for 10 minutes at 25°C) and the supernatants were collected and stored in well-identified microtubes and stored at -20°C for cytokine dosing. Cytokine levels were measured using the Cytometric Bead Array (CBA-BD Biosciences), using the BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences San Jose, CA

USA), as recommended by the manufacturer. First, 22 μ L of the capture bead mixture labeled with monoclonal antibodies (anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IFN- γ and anti-TNF) with different fluorescence intensities were added in polystyrene tubes (BD Systems TM - 5mL), then 22 μ L of the culture supernatant and 22 μ L of the detection reagent were added. After this step, the samples were incubated for 3 hours at room temperature (RT) and protected from light. At the end of incubation 1 mL of Wash Buffer was added and the tubes centrifuged at 200g for 5 min. The supernatant was discarded, and the Beads were resuspended by the addition of 300 μ L of Wash Buffer. Samples were acquired on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickson San Jose, CA USA) using CellQuestPro software (Beckton Dickson San Jose, CA USA). The data were analyzed and the cytokine dosages in the samples were established by elaboration of a standard curve using FCAP software 3.1.

Immunophenotyping for surface molecules in lymphocytes and monocytes from the co-culture of PBMC, *T. cruzi*, Bz and venom - After 1 hour of co-culture, lymphocytes and monocytes were removed using ice-cold PBS-Wash containing bovine serum albumin at 0, 5% - Sigma TM and 1% sodium azide - Sigma TM). Cells were transferred to polystyrene tubes (BD Systems TM, 5 mL) and centrifuged (400 x g for 5 minutes). Supernatants were discarded and lymphocyte surface monoclonal antibodies were added to each tube: anti-CD4 / PerCP (1.5 μ L - Invitrogen), anti-CD8 / FITC (1.5 μ L - Invitrogen), anti-CD28 / PE And anti-CD142 / CTLA-4 / APC (10 μ L - BD) and for monocytes: anti-CD14 / FITC (2.5 μ L - Invitrogen), anti-HLA-DR / PerCP , 5 μ L - Invitrogen), anti-CD80 / PE (1.5 μ L - Invitrogen) and anti-CD86 / APC (1.5 μ L - Invitrogen). After 30 minutes of incubation, the cells were washed with PBS Wash by centrifugation (400 x g for 5 minutes). The cells were then fixed using BD Cytofix TM (BD Biosciences®) as instructed by the manufacturer. The tubes were stored at 4 ° C until acquisition on the FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickson).

Lymphocyte and monocyte acquisition and analysis strategy by flow cytometry - The lymphocyte population was selected by dot plot (Forward Scatter-FSC) versus (Side Scatter-SSC), with 20,000 events being acquired inside the R1 lymphocyte window and the monocytes were selected through FCS versus FL1, and 1000 events were acquired within window R2. After selection of the window of interest (R1) and (R2), T CD4 and T CD8 lymphocytes, and CD14 monocytes, as well as the

molecules were analyzed by obtaining two-dimensional graphs of fluorescence point distribution through FlowJo® software.

Statistical analysis - Data were exported to Graphpad Prism software version 5.0 Windows® (U.S.A.). The results of the statistical analyzes of cytokine production, cell frequency and FIM were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. Those who assumed normal distribution were analyzed through the paired t-test, and those who did not assume normal distribution were analyzed using the Wilcoxon test. All conclusions were taken at the significance level of 5%.

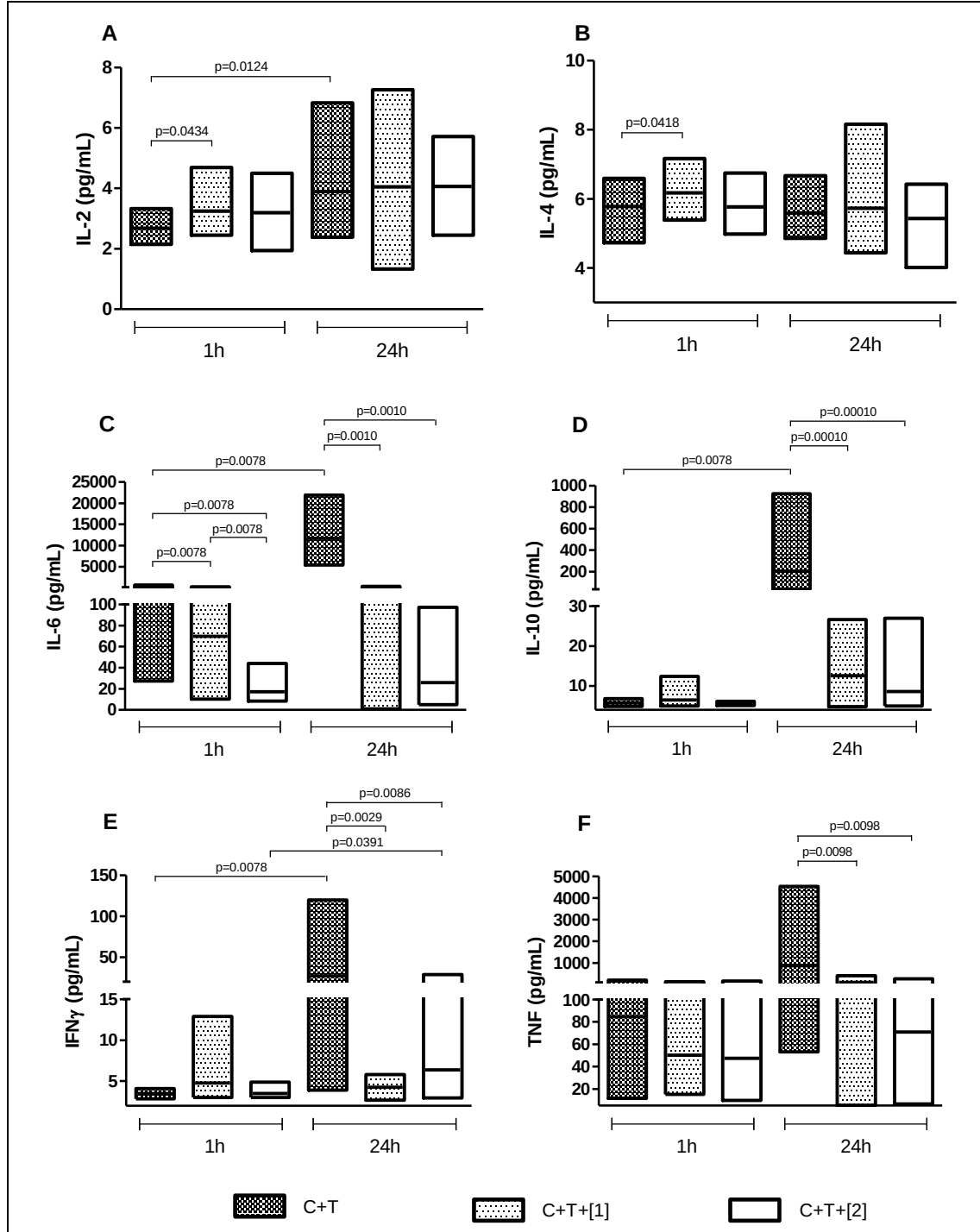
Ethical considerations - The approaches used in the present study were approved by the Research Ethics Committee of IAM / Fiocruz (CAAE: 07511612.2.0000.5190). All participating individuals responded to a research form and voluntarily signed the Free and Informed Consent Form.

RESULTS

Effect of *B. erythromelas* venom on *T. cruzi* Y virus infected cells detection of cytokines in the co-culture supernatant

We did not observe differences in IL-2 and IL-4 levels between the conditions analyzed (Figure 2A and 2B, respectively). At 1 hour and 24 hours culture time, there was a lower detection of IL-6 in conditions where venom was present (C + T + [1] and C + T + [2]) compared to C + T control (Figure 2C). For IL-10, it can be observed that over time, ie when we compared 1h with 24h, there was an increase of this cytokine in the C + T + condition [2] (Figure 2D). However, IL-10 levels are decreased when compared to C + T in the 24 h time. Similar results were seen in the evaluation of IFN- γ levels (Figure 2E). Concerning TNF, we can observe smaller levels when we analyzed the experimental conditions with the presence of the venom in comparison to the control, in the time of 24 hours (Figure 2F).

Figure 2 - Quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ in the culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells in the presence of trypomastigote forms of *T. cruzi* strain Y in addition of different concentrations of venom of *B. erythromelas* in the time of 1 hour and 24 hours.



Subtitle: C + T - Cells and trypomastigotes strain Y (control). C + T + [1] - Cells, trypomastigotes and concentration of 11 μ g / mL of venom; C + T + [2] - Cells, trypomastigotes and concentration of 22 μ g / mL of venom of *B.erythromelas* at 1 hour (N = 8) and 24 hours (N = 11) times. Significant differences with $p \leq 0.05$ for comparisons between conditions are indicated in each graph.

Source: Prepared by the author.

Effect of the association of venom of *B. erythromelas* with Benzonidazole in PBMC

We didn't observe differences in IL-2 and IL-4 production in the analyzed culture conditions (Figure 3A and 3B, respectively). IL-6 production was lower in culture conditions where Bz was associated with venom (C + Bz + [1] and C + Bz + [2]) when compared to C + Bz control at culture times. We can also observe that the conditions C + Bz + [1] was statistically higher than the condition C + Bz + [2], in 1 hour and 24 hours (Figure 3C). In relation to the IL-10 production, there was a decrease in the production of this cytokine in the concentrations of Bz associated with venom (C + Bz + [1], C + Bz + [2]) when compared to C + Bz in the 24 hours time Figure 3D). It is noteworthy that over time, there was an increase of this cytokine, in the presence of the two concentrations of the venom. We observed a decrease in the production of IFN- γ in the conditions of Bz associated with venom when compared to C + Bz, although the statistically significant difference was only observed in the C + Bz + [2] condition in 24 hours (Figure 3E). For TNF we observed lower levels in the C + Bz + [2] condition at times of 1 hour and 24 hours when compared to C + Bz (Figure 3F).

Figure 3 - Quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ in the culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells in the presence of Benzonidazole and / or in combination of different concentrations of venom of *B. erythromelas* in the time of 1 hour and 24 hours.

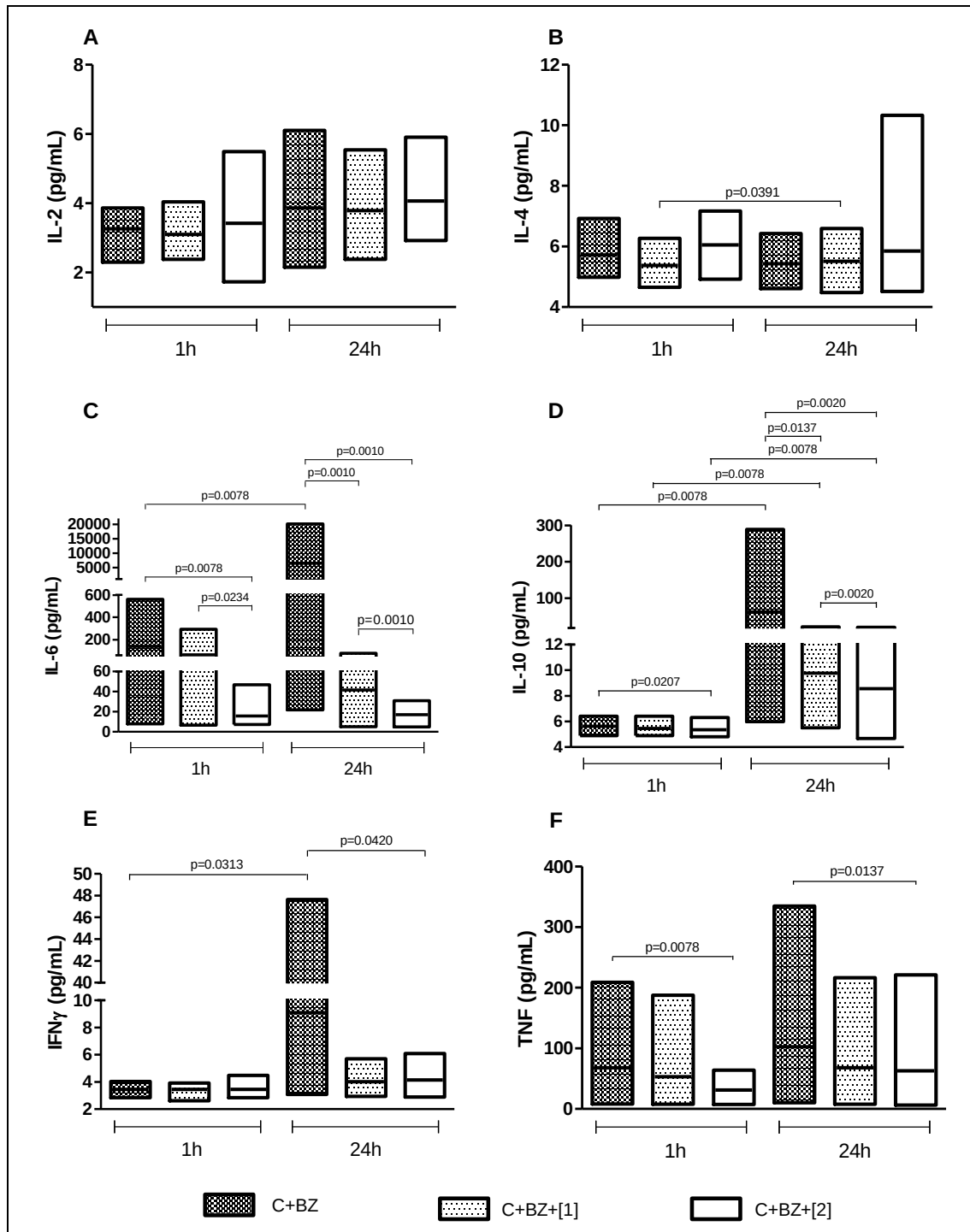
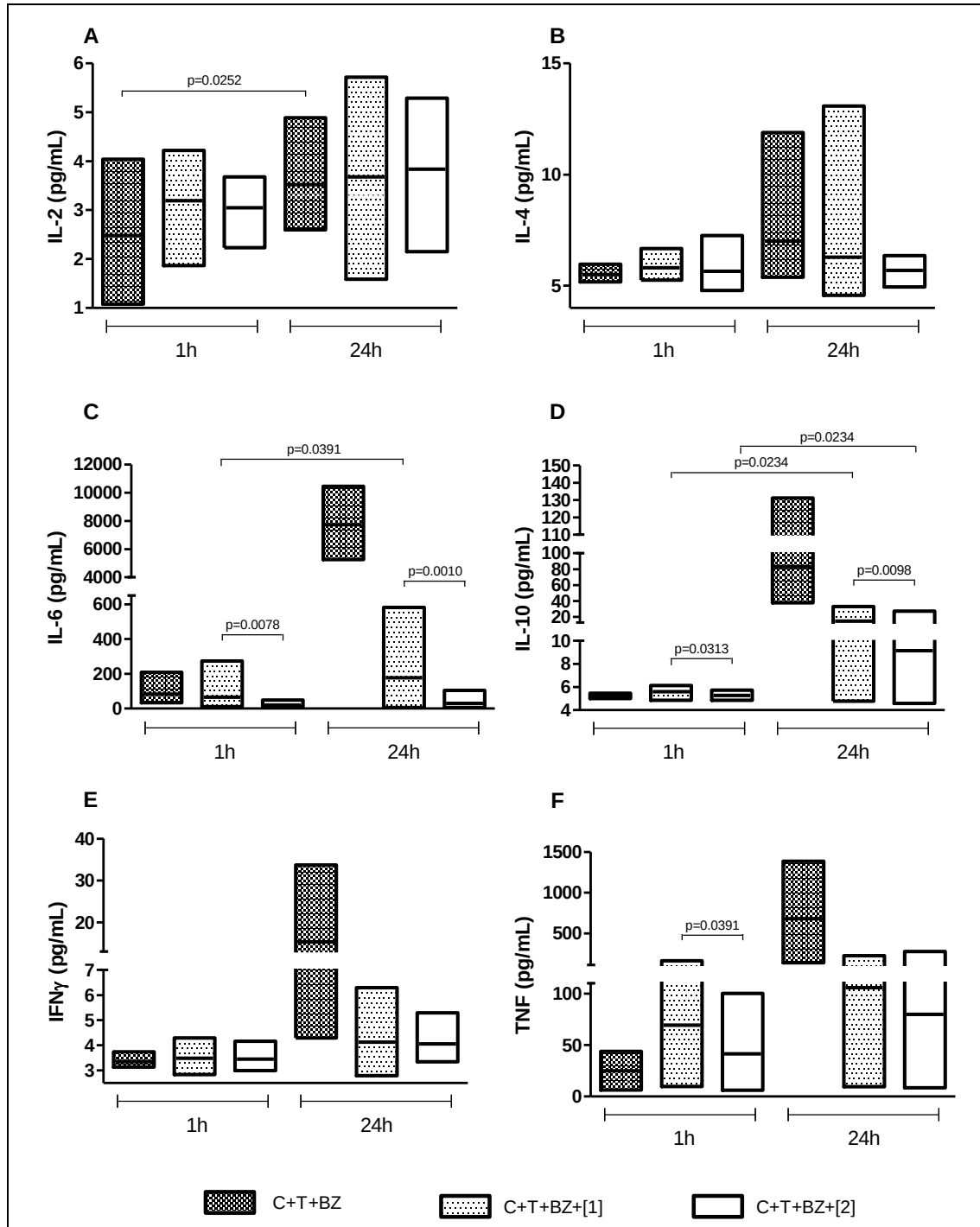


Figure 4 - Quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ in the culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells in the presence of trypomastigote forms of *T. cruzi* strain Y, Benzonidazole and different concentrations of venom of *B. erythromelas* in the time of 1 hour and 24 hours.



Legend: C + T + Bz - Cells and trypomastigotes strain Y (control) and benzonidazole; C + T + Bz + [1] - Cells, trypomastigotes, benzonidazole and concentration of 11 μ g / mL of venom; C + T + Bz + [2] - Cells, trypomastigotes, benzonidazole and concentration of 22 μ g / mL of *B. erythromelas* venom at 1 hour (N = 8) and 24 hour (N = 11) times. Significant differences with $p \leq 0.05$ for comparisons between conditions are indicated in each graph.

Source: Prepared by the author.

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

Our results showed that CD28 expression in CD4 + T lymphocytes was higher in all experimental conditions in the presence of venom compared to C, C + T and C + Bz. On the other hand, CD8 + CD28 + lymphocytes showed that these cells were in lower frequencies in the conditions in which the venom was present when compared to the C, C + T and C + Bz controls. As regards the expression of the CTLA-4 molecule in CD4 + T lymphocytes, we observed an increase of this molecule in C + T + [1] and C + T + [2] conditions compared to C, C + T, C + T + Bz and C + Bz. As regards the frequency of CD8 + T-CTLA-4 T lymphocytes, we found significantly higher levels of these cells in C + 1, C + 2, C + T + 1 and C + T + 2 conditions when compared to C, C + T, C + Bz and C + T + Bz. Regarding the Average Fluorescence Intensity (MIF) of the CD28 + molecule in the lymphocyte population we did not observe statistically significant differences between the culture conditions. However, for CTLA-4 FIM we observed significantly higher levels of this molecule in C + T + [1] and C + T + [2] when compared to C, C + T and C + Bz (Table 1).

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

With regard to the expression of the CD80 + molecule in CD14 + monocytes, we observed that in all culture conditions in the presence of venom there was a significant increase in comparison with the C, C + T and C + Bz controls. Similar results were seen when we evaluated the frequency of CD14 + HLA-DR + cells. When we evaluated the frequency of the CD86 + costimulatory molecule on the surface of CD14 + monocytes, we did not find statistically significant differences between the conditions evaluated (Table 2). When evaluating the MIF of the CD80 + molecule in CD14 + monocytes, we observed significantly higher levels in all culture conditions in the presence of venom when compared to C, C + T and C + Bz. Similar results were observed when we evaluated the MIF of HLA-DR +. In addition, the MIF of HLA-DR + was higher in all culture conditions in the presence of venom when compared to C + T + Bz. No significant difference was observed in the expression of the CD86 + molecule (Table 2).

Table 1 - Expression of CD28 + and CTLA-4 + molecules of CD4 + and CD8 + lymphocytes and mean fluorescence intensity

Marcações	%CD4 ⁺ CD28 ⁺	%CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	%CD8 ⁺ CD28 ⁺	%CD8 ⁺ CTLA4 ⁺	MIF CD28 ⁺	MIF CTLA-4 ⁺
C	17.25	1.61	49.45	1.45	74.10	4.50
C+T	18.15	1.48	49.05	1.42	73.50	3.77
C+Bz	16.75	1.66	48.70	1.06	73.70	4.61
C+T+Bz	19.80	2.10	49.50	1.97	76.10	7.47
C+[1]	19.85 ^{a, b, c}	2.59	43.50 ^{b, c, d}	1.99 ^{a, c, e}	72.05	6.24
C+T+[1]	19.60 ^{a, b, c}	3.16 ^{a, b, c, d}	43.55 ^{a, b, c, d}	2.35 ^{a, b, c}	72.35	6.53 ^{a, b, c}
C+Bz+[1]	19.80 ^{a, b, c}	2.07 ^d	43.00 ^{a, b, c, d}	1.62 ^a	72.50	5.84
C+Bz+[1]+T	19.80 ^{a, b, c}	2.45 ^b	43.55 ^{a, b, c, d}	2.10 ^{a, b, c}	72.25	5.88
C+[2]	20.60 ^{a, b, c}	2.16 ^c	42.90 ^{a, b, c, d}	2.43 ^{a, b, c, e}	72.20 ^a	6.30 ^c
C+T+[2]	20.80 ^{a, b, c}	2.63 ^{a, b, c}	43.70 ^{a, b, c, d}	2.87 ^{a, b, c, d}	73.55	7.40 ^{a, b, c}
C+Bz+[2]	20.35 ^{a, b, c}	2.30 ^c	43.20 ^{a, b, c, d}	2.42 ^{a, b, c}	72.55	6.27 ^c
C+Bz+[2]+T	20.35 ^{a, b, c}	2.43 ^c	43.40 ^{a, b, c, d}	2.42 ^{a, b, c, d}	72.40 ^b	6.66 ^{b, c}

Legend: T lymphocytes% CD4 + CD28 +; Lymphocytes T CD4 + CTLA-4 +; CD8 + CD28 + T lymphocytes; Lymphocytes T CD8 + CTLA-4 +; MIF - Average Fluorescence Intensity; C - Cells; C + T - Cells and Trypomastigotes; C + Bz - Cells and Benzonidazole; C + T + Bz - Cells, Tripomastigotes and Benzonidazole; C + [1] - Cells and 11µg / mL of venom; C + T + [1] - Cells, trypomastigotes and 11µg / mL of venom; C + Bz + [1] - Cells, benzonidazole and 11µg / mL of venom; C + T + Bz + [1] - Cells, trypomastigotes, benzonidazole and 11µg / mL of venom; C + [2] - Cells and 22µg / mL of venom; C + T + [2] - Cells, trypomastigotes and 22µg / mL of venom; C + Bz + [2] - Cells, Benzonidazole and 22 µg / mL of venom; C + T + Bz + [2] - Cells, trypomastigotes, Benzonidazole and 22µg / mL of B. erythromelas venom in 1 hour. The values expressed are the median of the experimental conditions (N = 8).

(a) $p \leq 0.05$ when compared to C

(b) $p \leq 0.05$ when compared to C + T

(c) $p \leq 0.05$ when compared to C + Bz

(d) $p \leq 0.05$ when compared to C + T + Bz

(e) $p \leq 0.05$ between C + [1] and C + [2]

Source: Prepared by the author.

Table 2 - Expression of CD80 +, CD86 + and HLA-DR + molecules of CD14 + monocytes and mean fluorescence intensity.

Marcações	%CD14 ⁺ CD80 ⁺	%CD14 ⁺ CD86 ⁺	%CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	MIF CD80 ⁺	MIF HLA-DR ⁺	MIF CD86 ⁺
C	5.21	100	43.00	4.69	46.00	100
C+T	4.94	100	39.90	4.67	43.30	100
C+Bz	4.81	100	42.65	4.42	48.30	100
C+T+Bz	2.36	100	43.60	3.55	46.10	100
C+[1]	18.30 ^{a, c, e}	99.94	73.85 ^{a, b, c}	25.85 ^{a, b, c}	75.40 ^{a, c}	100
C+T+[1]	29.40 ^{a, b, c}	99.93	73.10 ^{a, c, f}	30.25 ^{a, b, c}	74.45 ^{a, c}	100
C+Bz+[1]	27.60 ^{a, b, c}	99.89	73.95 ^{a, c, g}	34.80 ^{a, b, c}	75.75 ^{a, c}	100
C+Bz+[1]+T	29.00 ^{a, b, c}	99.89	74.10 ^{a, b, c}	26.60 ^{a, b, c}	75.45 ^{a, c}	100
C+[2]	37.00 ^{a, b, c, e}	99.94	81.25 ^{a, b, c, d, f}	36.15 ^{a, b, c}	82.45 ^{a, b, c}	100
C+T+[2]	36.40 ^{a, b, c}	99.94	83.75 ^{a, b, c, d}	34.25 ^{a, b, c}	85.40 ^{a, b, c}	100
C+Bz+[2]	31.30 ^{a, b, c}	99.90	78.50 ^{a, b, c, d, g}	32.05 ^{a, b, c}	80.50 ^{a, b, c}	100
C+Bz+[2]+T	40.00 ^{a, b, c}	99.83	78.40 ^{a, b, c}	34.40 ^{a, b, c}	80.05 ^{a, b, c}	99.95

Legend: Monocytes% CD14 + CD80 +; Monocytes% CD14 + HLA-DR +; % CD14 + CD86 + monocytes; MIF - Average Fluorescence Intensity; C - Cells; C + T - Cells and Trypomastigotes; C + Bz - Cells and Benzonidazole; C + T + Bz - Cells, Tripomastigotes and Benzonidazole; C + [1] - Cells and 11µg / mL of venom; C + T + [1] - Cells, trypomastigotes and 11µg / mL of venom; C + Bz + [1] - Cells, Benzonidazole and 11µg / mL of venom; C + T + Bz + [1] - Cells, trypomastigotes, benzonidazole and 11µg / mL of venom; C + [2] - Cells and 22µg / mL of venom; C + T + [2] - Cells, trypomastigotes and 22µg / mL of venom; C + Bz + [2] - Cells, Benzonidazole and 22 µg / mL of venom; C + T + Bz + [2] - Cells, trypomastigotes, Benzonidazole and 22µg / mL of B. erythromelas venom in 1 hour. The values expressed are the median of the experimental conditions (N = 8).

(a) $p \leq 0.05$ when compared to C

(b) $p \leq 0.05$ when compared to C + T

(c) $p \leq 0.05$ when compared to C + Bz

(d) $p \leq 0.05$ when compared to C + T + Bz

(e) $p \leq 0.05$ between C + [1] and C + [2]

(f) $p \leq 0.05$ between C + T + [1] and C + T + [2]

(g) $p \leq 0.05$ between C + Bz + [1] and C + Bz + [2]

Source: Prepared by the author

DISCUSSION

Benzonidazole (Bz) is the only drug available for treatment of Chagas' disease in Brazil. The efficacy of this drug is variable, where the cure rates of the patients in the chronic phase are reduced (Marcus-Neto et al. 2009). Although there are few studies in the literature, snake venoms have been shown to have trypanocidal action (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; GONÇALVES et al., 2002; DEOLINDO et al., 2005). In this context, it is necessary to understand the immunomodulatory potential of the *B. erythromelas* venom. The objective of the present study was to evaluate the effect of the crude venom of *B. erythromelas*, a jararaca found extensively in the Northeast region of Brazil, on *T. cruzi* infected cells in vitro.

When we evaluated the effect of *B. erythromelas* venom on *T. cruzi* infected cells, we saw that with the passage of culture time, that is, when we compared the two culture times, there was an increase in cytokines in the culture supernatant. However, levels of the proinflammatory cytokines IL-6, IFN γ and TNF, as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10, decreased dramatically when compared to infected cells without treatment or associated with Bz treatment.

Cytokines are important mediators that regulate the duration and intensity of the immune response. They are soluble proteins or glycoproteins produced by leukocytes and other cell types, which act as chemical mediators (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Studies in an experimental model have shown that IFN- μ and TNF play an important role in parasitic control during the acute phase of CD by activating the antigen-presenting cells supporting its trypanocidal function (REED, 1988; SILVA et al., 1992; LANNES-VIEIRA). In addition, in the cardiac tissue, these cytokines are associated with increased inflammation and could be inducing tissue damage (ZHANG et al., 2011). In humans, individuals considered cured after etiological treatment had high levels of IFN- γ compared to uncured individuals, suggesting that this cytokine may favor therapeutic efficacy and be a curative biomarker (BAHIA-OLIVEIRA, 2000). On the other hand, Laucella et al. (2009) verified that patients undergoing Bz treatment had a decrease in IFN- γ after 12 months of therapy. The authors argue that in the chronic phase, the use of Bz associated with a competent specific immune response to the parasite could be considered an indicative of efficacy of treatment and cure. Inflammatory cytokines IFN- γ and TNF at high levels have been identified as responsible for the

maintenance of inflammation in cardiac tissue. In addition, IL-10 levels have been found to be associated with the protection of the host against the development of chronic symptomatic forms (CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al. 2003). Our results lead us to believe that *B. erythromelas* venom suppresses the cellular response, especially to the pro-inflammatory profile, but also induces the decrease of IL-10.

We also evaluated, the effect of the venom association on the Bz. It is known that drug synergism with the immune response contributes to the successful treatment of infectious-parasitic diseases (COURA, 2009). The association of drugs or compounds to Bz is already well reported in the literature (MALDONATO et al., 1993; URBINA et al., 1993, ARAÚJO et al., 2000; COURA, 2009; URBINA, 2003; URBINA, 2010; LOPEZ-MUÑOZ et al., 2010; ALVES et al., 2012; VILAR-PEREIRA, 2012) for promoting satisfactory results in order to potentiate the anti-*T.cruzi* effect. Our results showed that *B. erythromelas* venom isolated or in association with Bz in infected cells and in non-infected cells (data not shown) decreased the production of IL-6, IFN- γ , TNF and IL-10 cytokines, when compared to cells treated with BZ only. That is, the venom negatively modulates, in a general way, the production of cytokines of the Th1 and Th2 profiles. However, our results differ from those of Luna et al. (2011), who observed that the *B. erythromelas* venom induced high production of IFN- γ , IL-6, IL-10 and nitric oxide in murine splenocytes. It is important to point out that our study is pioneer in demonstrating the effect of venom-induced cytokine production on human cells infected with a protozoan, such as *T. cruzi*.

We evaluated the frequency of CD4 + T and CD8 + T lymphocytes through the expression of activation (CD28) and inhibition molecules (CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4) present on the lymphocyte surface. In addition, we studied the expression of HLA-DR (MHC class II) and costimulatory molecules (CD80 + and CD86 +), present in CD14 + monocytes. In general, our results showed that there was an increase in CD4 + CD28 + T lymphocytes and a decrease in CD8 + CD28 + in culture conditions, but with increased expression of the CTLA-4 molecule, where the venom was present, indicating that this phenomenon is a consequence of venom treatment, regardless of infection and association with Bz. In addition, venom also increased the frequency of CD14 + CD80 + monocytes, as well as CD14 + HLA-DR + monocytes.

The interactions between macrophages and lymphocytes are essential for the targeting of an efficient immune response. Activation of T cells involves the coupling of the T lymphocyte Receptor (TCR) to the MHC-peptide complex found on the surface of Antigen-Presenting Cells (APCs), such as CD14 + monocytes, as well as an appropriate co-stimulation system. One of the most important co-stimulation pathways consists of the interaction between the CD28 molecule expressed in T cells and the costimulatory molecules CD80 and CD86, present in the APCs. Thus, the signals generated by these bonds promote the proliferation of T lymphocytes (WANG; CHENG, 2004). When the CTLA-4 accessory molecule interacts with the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, there is an induction of negative signals that inhibit the activation of T cells (WANG; CHEN 2004). While the CD86 + molecule is constitutively distributed, that is, it has a more abundant expression on the surface of the monocytes, the CD80 + molecule increases its expression when the cell becomes activated by stimuli (LENSCHOW et al., 1994). The HLA-DR molecule is a class II histocompatibility complex (MHC II) monocyte and macrophage receptor and is responsible for the processing of endocytosed antigens (TURLEY et al., 2000).

Activated T cells (expressing HLA-DR) are predominant in chagasic cardiac inflammatory lesions (REIS et al., 1993). Cells expressing HLA-DR are also more frequent in the peripheral blood of chronic carriers of the disease. However, while there is an increase in HLA-DR expression, there is an absence of CD28 expression in T cells (MENEZES et al., 2004), suggesting a relationship between these cells and the disease. A study by Souza et al. (2007) demonstrated a higher expression of CTLA-4 + in T-lymphocytes of patients of the indeterminate form of the disease suggesting that the parasite induces a modulation of the immune response in these patients. In the study by Neves (2015), where an increase of CTLA-4 and a decrease of CD28 + in CD4 + and CD8 + T-lymphocytes of co-culture obtained from PBMC from chronic CD patients, infected with *T. cruzi* and treated in vitro with Bz, thus suggesting a possible mechanism of escape of the immune system. In this way, we believe that the venom induces the activation of CD14 + T monocytes, by increasing the frequencies of CD14 + CD80 + and CD14 + HLA-DR + and CD4 + CD28 + T lymphocytes. On the other hand, while the venom induced a cellular activation, it also induced inhibitory mechanisms to modulate this activation by increasing the frequency of the CTLA-4 molecule in CD4 + T lymphocytes.

It is noteworthy that we did not observe studies aiming at the evaluation of immunomodulation using crude venom of snakes to treat cells in vitro. Our study showed the strong negative modulation of the cytokine production that the venom induces in PBMC of *T. cruzi* infected humans. It is important to note that we observed the cellular activation of CD14 + monocytes and CD4 + T lymphocytes, but also inhibition, by the increase of CTLA-4 in T lymphocytes, which suggests a demonstration of immunological homeostasis. Because it is a complex mixture of bioactive substances, little is known about all the functions of these substances present in the venom. We believe that purified isolates of the venom of *B. erythromelas* from this snake are promising to induce a balanced response between the Th1 and Th2 profiles, being a perspective of our group.

Acknowledgements

To the National Council for Technological Development (CNPq) (Universal / CNPq 474926 / 2012-5) and Program of Excellence in Research of the Foundation for the Support of Science and Technology of Pernambuco (PROEP-FACEPE AQP-1703-2.11 / 15) for financial resources. To the Chagas Disease Reference Service for technical support in the person of Mr. Mineo Nakazawa. To the Aggeu Magalhães Institute - IAM / Fiocruz, for the necessary infrastructure to carry out the work and the Museum of Reptiles of the Caatinga, for the collaboration.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

REFERENCES

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. Cellular and molecular immunology. 7^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Monique CSA, Diana RS, Wanderson SB et al. Use of the combination of benznidazole and spironolactone in mice in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of Tropical Pathology. v.41, n.2, p.179-193. 2012.

Araújo MSS, Martins-Filho AO, Pereira MES et al. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 45,p. 819-824, 2000.

Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cançado JR 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.

Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

Coura JR. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre a doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, cap. 27, p.469-486, 1997.

Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.1, p.3-24, 2002.

Coura JR. Dias JCP. 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.

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

Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, Melo EJ et al. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Brasil, v.100, n.1, p.33-38, 2005.

Fernandez-Gomez R, Halim Z, Fatima S et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which Interact with the parasites. *Toxicon*, v.32, n.8, p.875-882, 1994.

Gomes JAS, Bahia-oliveira LMG, Rocha, MOC, 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.

Gonçalves AR, Soares MJ, de Souza W, et al. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitology Research*, v.88, n.7, p.598-202, 2002.

Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.63, n.24, p.3030-3041, 2006.

Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. *Toxicon*, v.59, n.4, p.497-506, 2012.

Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G 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.

Lannes-Vieira J, Pereira IR, Vinagre NF, et al. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, v.691, p.221-230, 2011.

Lenschow DJ, Sperling AL, Cooke MP et al. Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *Journal of Immunology*, Baltimore, v.153, n.5, p.1990–1997, 1994.

López-muñoz R, Faúndez, M, Klein, S et al. *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 167-171, 2010.

Luna KPO, Cristiane MLM, Vanessa PMP et al. *B. erythromelas* snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, v.3, p.9-18. 2011.

Maldonado, RA, Molina J, Payares G, et al. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, USA, v. 37, n. 6, p. 1353-1359, 1993.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *American Heart Journal*, v.156, p.37-43, 2008.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, 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.

Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clinical & Experimental Immunology*, London, v.137, n.1, p.129-138, 2004.

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.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, London, v.375, p.1388-1402, 2010.

Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental

Trypanosoma cruzi infections. The Journal of Immunology, v. 140, n.12, p.4342-4347, 1988.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating fator released from plasma globulin by sanke venoms e by trypsin. American Journal of Physiology, Stanford, v.156, p.261-273, 1949.

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of experimental Medicine, v.175, p.169-174, 1992.

Soares MB, Silva-Mota KN, Lima RS et al. Modulation of Chagasic Cardiomyopathy by Interleukin-4. Dissociation between Inflammation and Tissue Parasitism. American Journal of Pathology, v.159, n.2, 2001.

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. Infection Immun. v.75, n.4,p.1886-1894, 2007.

Turley SJ, Inaba K, Garrett WS et al. Transport of Peptide-MHC Class II Complexes in Developing Dendritic Cells. Science, Washington, v. 288, p. 522-527, 2000.

Maldonado RA, Molina J, Payares G et al. Experimental Chemotherapy with combinations of Ergosterol Biosynthesis in Murine Models of Chagas Disiase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June, p. 1353-1359, 1993.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemoterapic of chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitology, Oxford, v.19, p.495-501, 2003.

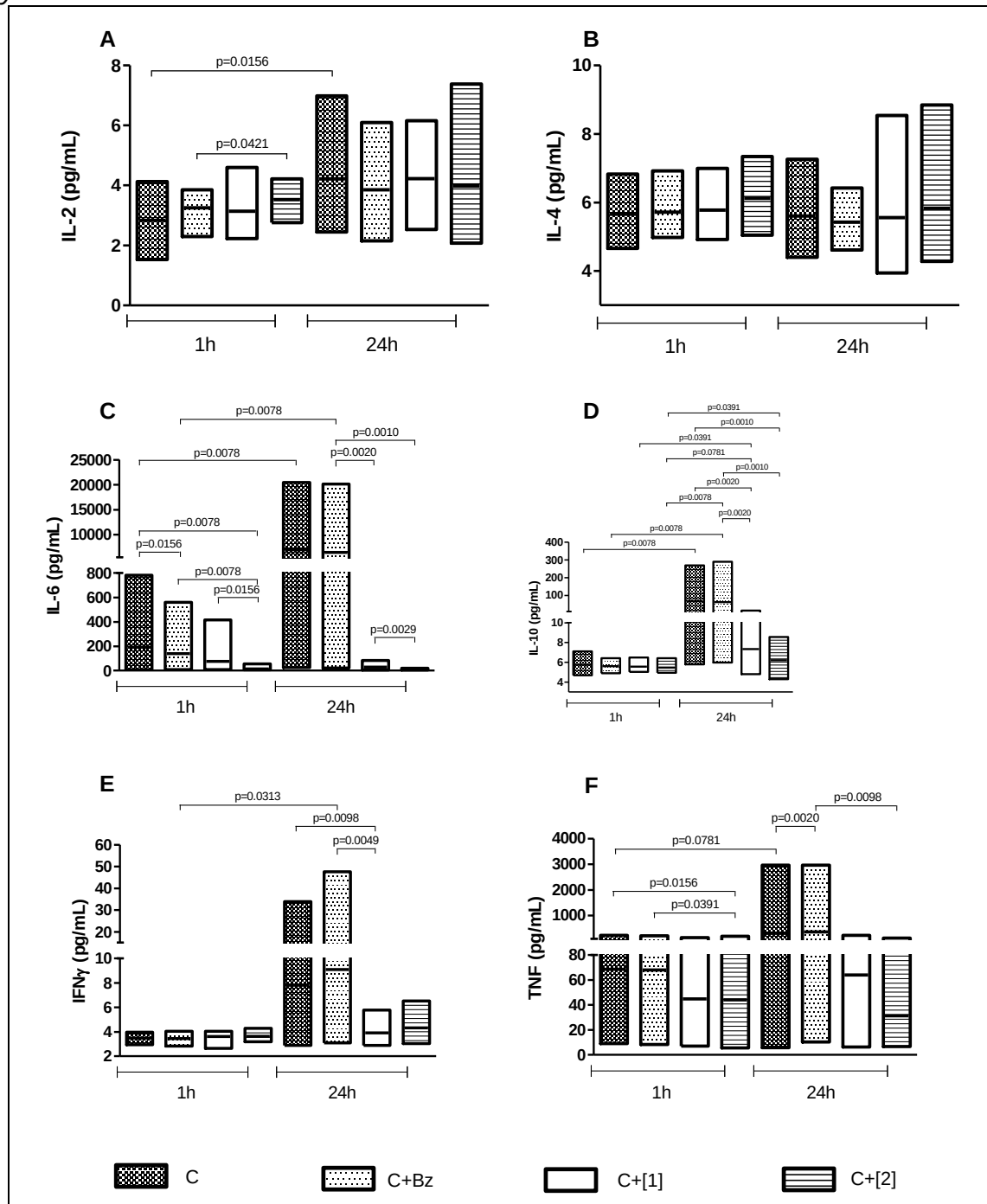
Urbina, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Tropica, Basel, v. 115, p. 55-58, 2010.

Vilar-Pereira G, Silva AA, Pereira IR et al. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. Brain, Behavior, and Immunity. v.26, P.1136-1149. 2012.

Wang S, Cheng L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, v.1, p.37-42, 2004.

Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. European Journal of Immunology, v.26, n.1, p.102-109, 1996.

Supplementary figure - Quantification of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF and IFN- γ in the culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells and presence of benzonidazole and mononuclear cells and different concentrations of venom of *B. erythromelas* in the time of 1 hour and 24 hours.



Legend: C + BZ - Cells and benzonidazole; C + [1] - Cells and concentration of 11 µg / mL of venom; C + [2] - Cells and concentration of 22 µg / mL venom of *B.erythromelas* at 1 hour (N = 8) and 24 hours (N = 11) times.

Source: Prepared by the author.

APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa

Não Portadores da Doença de Chagas

1. Nome: _____
 Registro IAM: _____ Data da
 coleta: _____
 Acompanhante do paciente/registro
 IAM: _____
 Local da coleta: _____

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino

3. Idade: _____ (1) De 18 a 29 anos
 (2) De 30 a 39 anos
 (3) De 40 a 59 anos
 (4) A partir de 60 anos

4. Endereço: _____
 Bairro: _____ Município: _____
 Estado: _____
 Telefone: (__) _____ Celular: (__) _____
 5. Município de Nascimento: _____
 Estado: _____

6. Epidemiologia:
 Morou em casa de taipa? () Sim () Não () Não sabe
 Já recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não () Não sabe
 Conhece o barbeiro? () Sim () Não () Não sabe
 A mãe é portadora da doença de Chagas? () Sim () Não () Não sabe
 Já doou sangue? () Sim () Não

Quando/Onde? _____

7. Coletado para: () Leyllane
 () Virginia
 () Kamila
 () Michelle

8. Tipo de amostra: () Soro () Sangue () Plasma

Responsável pela coleta: _____

Médico Solicitante/CRM: _____

APÊNCIDE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Não Portador da Doença de Chagas



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Não Portador da doença de Chagas

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

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

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

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



Instituto de Física

INOCRUZ

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; () dispense a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

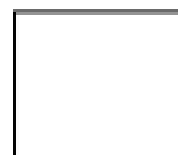
Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Virginia M. Barros de Lorena

Virginia Maria Barros de Lorena

CPqAM/Fiocruz

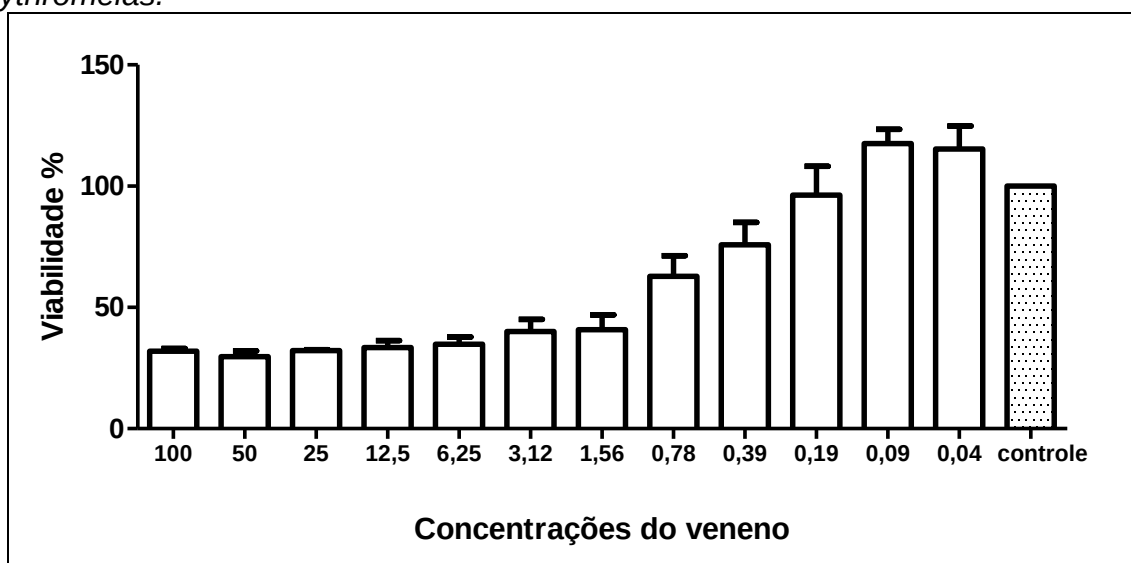
Pesquisadora Responsável

APÊNDICE D – Padronizações

Análise do efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* na viabilidade celular de células mononucleares de sangue periférico através do ensaio por MTT

Antes de iniciarmos nossos ensaios, optamos por avaliar o efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* sobre células mononucleares de sangue periférico humano. Para isso, realizamos ensaios de viabilidade por MTT utilizando sangue de três indivíduos voluntários. As PBMCs (2×10^5 células/mL) foram isoladas e depositadas em placas de cultura de 96 poços na presença de 12 concentrações do veneno (100 – 0,04 µg/mL) durante 24 horas. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células (CC50) foi estimada através de regressão linear utilizando o software SPSS v.18. A CC50 determinada do veneno de *Bothrops erythromelas* foi superior 21,91 µg/mL. Portanto, até esta concentração do veneno não há toxicidade para células mononucleares humanas.

Figura 1 – Viabilidade celular de PBMCs tratadas com veneno de *Bothrops erythromelas*.

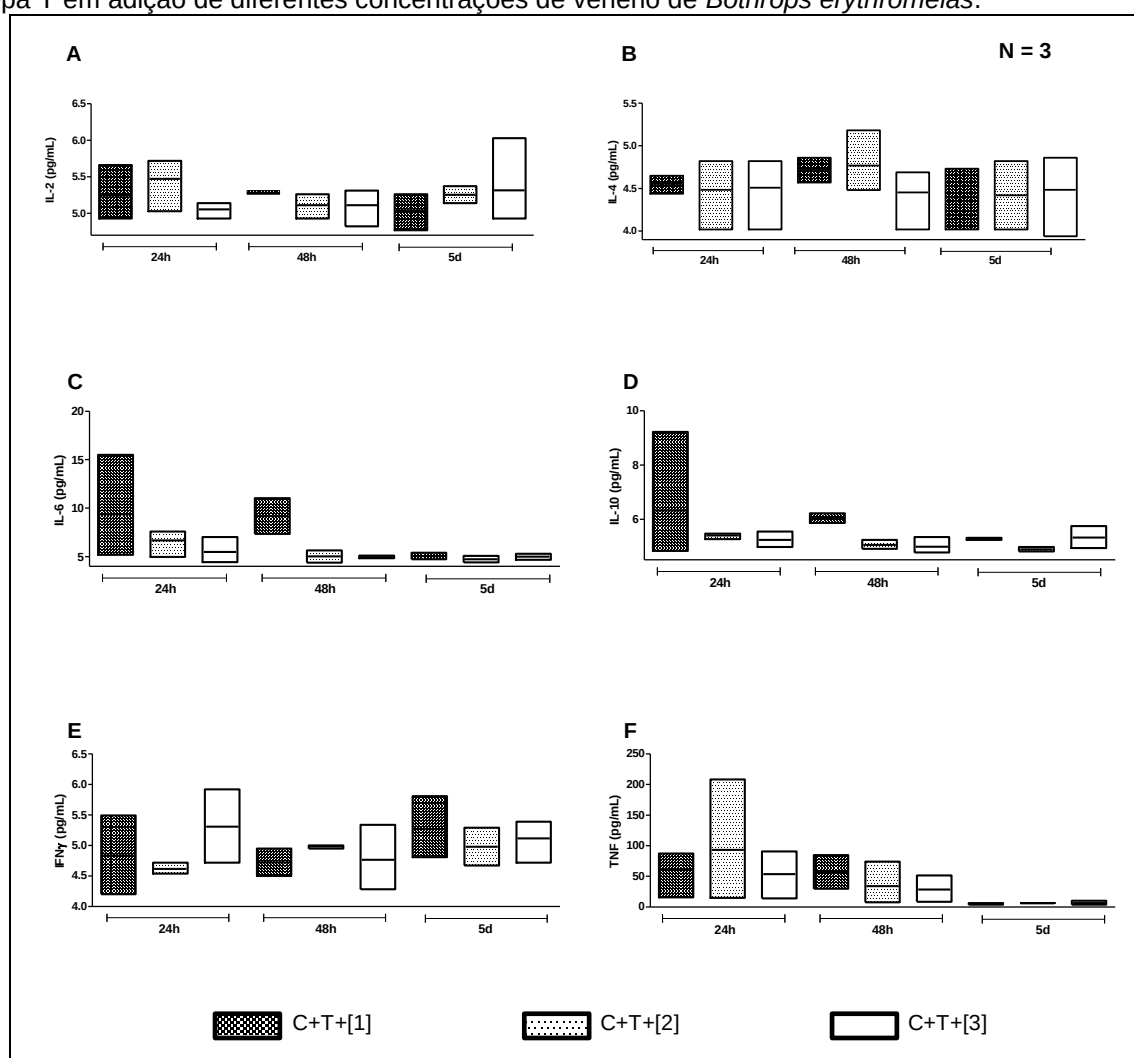


Legenda: células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram incubadas com o veneno em diferentes concentrações durante 24 horas e a viabilidade foi avaliada por MTT. Células incubadas com meio RPMI ou PHA (10 µg/mL) foram utilizadas como controle. Os resultados foram expressos como média de intensidade de absorbância $\pm$ DP das células das amostras em triplicatas.

Padronização da cinética do tempo de cultivo x resposta e dose x resposta do veneno de *Bothrops erythromelas*

Para estabelecer a otimização do tempo de cultivo x resposta e dose x resposta, detectamos os níveis das citocinas, através da técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA) para citocinas do perfil Th1 e Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ) no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, tripomastigotas Cepa Y em adição de três concentrações ([1]=11 μ g/mL, [2]=22 μ g/mL e [3]= 44 μ g/mL) do veneno de *B. erythromelas*.

Figura 2 – Quantificação de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ) no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em adição de diferentes concentrações de veneno de *Bothrops erythromelas*.



Legenda: C+T+[1] – Células, tripomastigotas e concentração de 11 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas*; C+T+[2] – Células, tripomastigotas e concentração de 22 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas*; C+T+[3] – Células, tripomastigotas e concentração de 44 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas*, nos tempos de 24 hora, 48 horas e 5 dias. (N=3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à detecção de IL-2, na condição C+T+Concentração do veneno, verificamos maiores níveis dessa citocina na condição C+T+[2] em comparação a C+T+[1] e C+T+[3] no tempo de 24h. Nos tempos de 48h e 5 dias observamos uma produção basal dessa citocina (Figura 2A).

Ao avaliarmos a produção de IL-4, na condição C+T+[Veneno] verificamos maiores níveis dessa citocina na condição C+T+[2] em comparação a C+T+[1] e C+T+[3] no tempo de 48h. No tempo de 5 dias observamos uma produção de basal da citocina. Entretanto, no tempo de 24h a produção dessa citocina manteve-se constante nas três condições de cultivo (Figura 2B).

Quanto à produção de IL-6 no sobrenadante de cultura, observamos maior detecção dessa citocina na condição C+T+[1] em relação aos grupos C+T+[2] e C+T+[3] nos tempos de 24h e 48h. Verificamos níveis basais da IL-6 no tempo de 5 dias. Ao compararmos os tempos de cultivos, detectamos maior produção de IL-6 no tempo de 24h e 48h (Figura 2C).

Em 24 horas, a produção de IL-10 foi maior na circunstância C+T+[1] em comparação às outras condições no tempo de 48h e 5d. Quando os três tempos de cultivo foram comparados, verificamos nas condições C+T+[1], C+T+[2] e C+T+[3] maior produção de IL-10 no tempo de 24h comparado a produção dessa citocina no tempo de 48h e 5d (Figura 2D).

Em 24h, 44µg/mL de veneno de *B. erythromelas* induziram maior produção de IFN-γ. Em 48h, houve uma maior produção de IFN-γ na condição C+T+22µg/mL e em 5 dias os níveis máximos dessa citocina apresentaram-se na condição C+T+[1]. Contudo, o pico de produção de IFN-γ em sobrenadantes de cultura apresentaram valores máximos em 24h, comparado com 48h e 5 dias (Figura 2F).

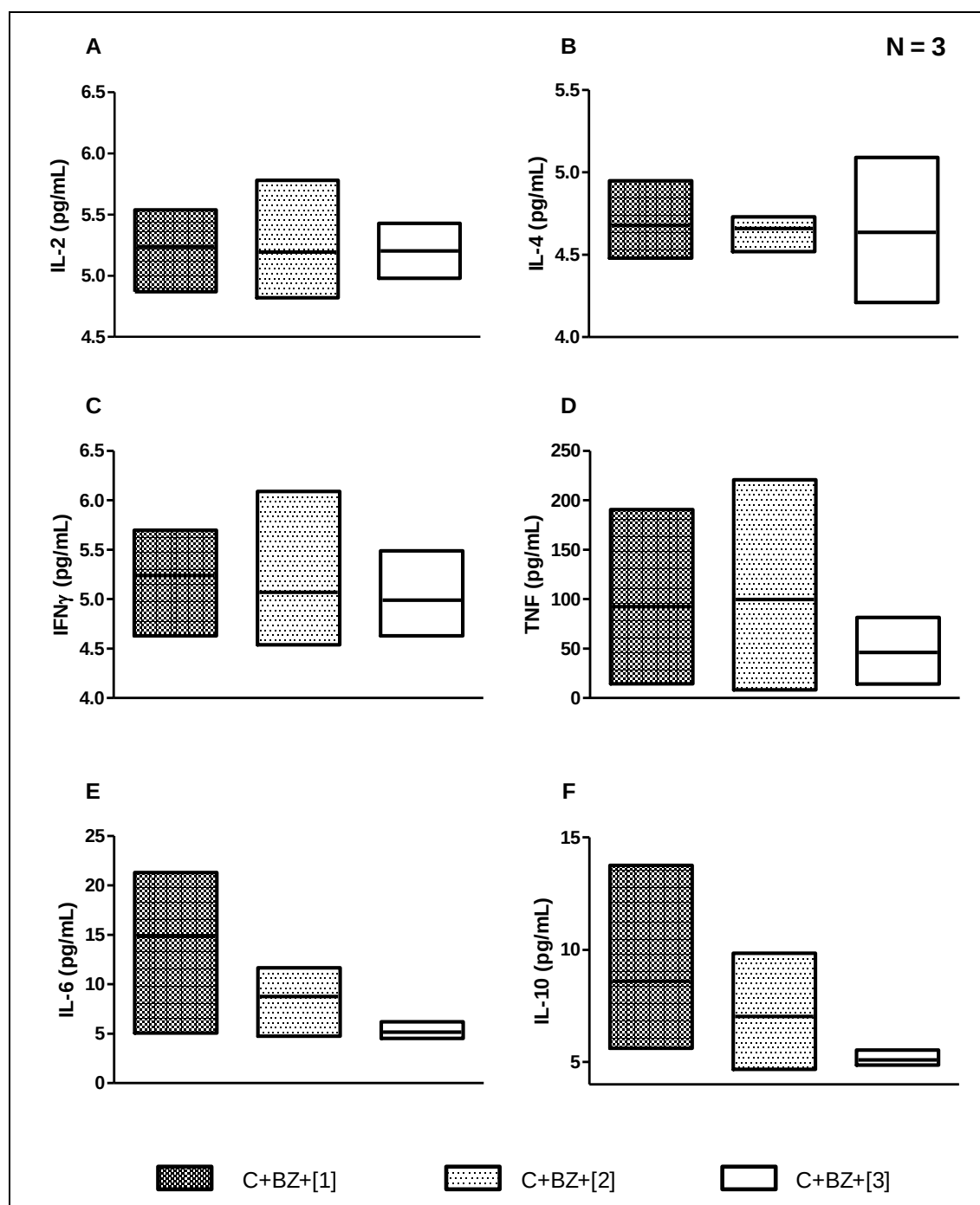
Com relação à produção de TNF, detectamos claramente um pico de produção da citocina no tempo de 24h em comparação com os outros tempos. Ademais, detectamos maior produção de TNF na situação C+T+[2] em comparação às condições C+T+[1] e C+T+[2] no tempo de 24h. EM 48 horas o pico de produção foi observado na condição C+T+[1] em comparação ao C+T+[2] e C+T+[3]. O tempo de 5 dias observamos uma produção basal desta citocina (Figura 2E).

A partir da cinética tempo de cultivo x resposta e dose x resposta foi estabelecido usar as concentrações 11µg/mL e 22µg/mL de veneno de *B. erythromelas* na condição experimental C+T+concentração do veneno no tempo de 24 horas. Dessa maneira, estamos considerando o tempo e concentração segura para detectar níveis de produção de citocinas em nossos experimentos com o veneno e as PBMC.

Padronização da cinética da concentração ótima do veneno de *Bothrops erythromelas* em associação com o Benzonidazol

Com relação à otimização de concentrações do veneno de *Bothrops erythromelas* ([1] = 1 µg/mL, [2] = 22µg/mL e [3] = 44µg/mL) em associação com o Benzonidazol foi avaliado os níveis de citocinas do Perfil Th1 e Th2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico e formas tripomastigotas, durante os tempos de 24 horas, 48 horas e 5 dias. Os resultados mostraram que, em geral, houve uma produção basal, à medida que aumentamos o tempo de cultivo com a concentração de 44µg/mL do veneno de *B. erythromelas*, provavelmente, induzindo por efeitos tóxicos sobre as células (dados não mostrados). Portanto, optamos por mostrar os dados apenas em 24 horas (Figura 3).

Figura 3 – Quantificação de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na presença do Benzonidazol (1 μ g/mL) e formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em adição de diferentes concentrações de veneno de *Bothrops erythromelas* no tempo de 24 horas.



Legenda: C+BZ+[1] – Células, benzonidazol e concentração de 11 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas*; C+BZ+[2] – Células, benzonidazol e concentração de 22 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas*; C+BZ+[3] – Células, benzonidazol e concentração de 44 μ g/mL de veneno de *B.erythromelas* no tempo de 24 horas; (N=3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Na condição experimental C+Bz+concentração de veneno, houve semelhanças entre as expressões de citocinas independente da concentração de veneno utilizada para as citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF (Figuras 3A-D). Estes dados, chamam atenção para citocinas IL-6 e IL-10 onde pode-se observar uma diminuição da expressão dessas citocinas, a medida que aumenta a concentração de veneno utilizada (Figura 3E, 3F).

Desta forma, as concentrações de 11 μ g/mL e 22 μ g/mL do veneno foram escolhidas, uma vez que, foi obtida com estas concentrações níveis detectáveis de citocinas nas condições de cultivo analisadas, no tempo de até 24 horas. A partir destas cinéticas, foi dado prosseguimento à inclusão de indivíduos para realização de co-cultivo nas condições estabelecidas acima. Os sobrenadantes foram estocados para dosagem de citocinas.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/IAM



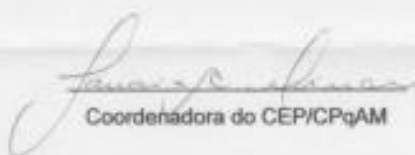
Título do Projeto: "Avaliação in vitro do benzonidazol sobre células da resposta imune submetidas à infecção com *Trypanosoma cruzi*".
Pesquisador responsável: Virginia Maria Barros de Lorena.
Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ
Data de apresentação ao CEP: 10/09/12
Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 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.

Campos da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.510-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1931 / 2101.2638
 Recife - PE - Brasil
comitedetica@cpqam.fiocruz.br

