

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

Luana Viana

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR LINFÓCITOS B EM
PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.**

Rio de Janeiro,

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

Luana Viana

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Alinne Renzetti

Rio de Janeiro,

2025

Luana Viana

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR LINFÓCITOS B EM
PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Dra. Alinne Renzetti

Aprovada em:

Barra da Tijuca, 30 de junho de 2025.

BANCA EXAMINADORA



Dra Alinne Renzetti (orientadora)



Prof. Giselle Fagundes



Prof. Bárbara Baptista

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus, pois tudo vem dEle, e sem Ele eu não teria chegado até aqui. Creio que Deus tem planos que nós não imaginamos viver, e com a plena certeza, ter começado a graduação e estar finalizando com êxito, após viver diversas transições em minha vida (pandemia de COVID-19 e duas mudanças de estado) é um dos projetos dEle para mim.

Ao meu marido, Jucelio, que foi o maior apoiador do meu sonho. Ele passou comigo todas as fases, desde o começo ao fim, com as aulas online, por causa da pandemia, e até esse momento final de muita correria e loucura de encerramento. Em meio ao caos, me senti incapaz diversas vezes, mas ele sempre teve uma palavra de consolo para que eu não desistisse. Obrigada pela sua paciência, apoio incondicional e amor. Essa conquista também é sua!

Aos meus pais, Enilza e José Geraldo, minha eterna gratidão. Eles sempre me disseram que era preciso estudar para conseguir algo. Eles sempre me apoiaram da melhor forma, e ver eles orgulhosos neste momento não tem preço! Se hoje estou me formando, é porque quero ser este exemplo de ter conseguido conquistar o meu sonho e trilhar minha própria história, conforme eles me ensinaram. Obrigada mãe e pai, por todo amor e educação que me deram, e por plantarem em mim a semente da responsabilidade, dedicação e coragem para seguir em frente!

À minha irmã, Aline, que também esteve presente em todos os momentos. Os primeiros 2 anos foram à distância, mas depois ela se mudou de MG para o RS para morar comigo. No tempo em que ela esteve comigo, me senti muito realizada em podermos estar juntas novamente. Isto foi um presente de Deus. Ela me ajudou a estudar para provas e trabalhos, e viveu comigo a correria diária entre estudos e estágios, idas e vindas de Porto Alegre para Canoas. Sorrimos e choramos juntas. Obrigada por ser minha amiga, conselheira e apoio em tantos momentos.

Às amigas que fiz na faculdade em Porto Alegre e no Rio de Janeiro. Vocês foram essenciais para que esse momento se tornasse mais leve. Obrigada pelos momentos que vivemos estudando juntas. Desejo que nossa amizade se concretize para toda a vida.

À minha amiga Camila Massaro, que em uma conversa informal com meu marido, decidiram me incentivar a ingressar na faculdade o quanto antes. Ela esteve presente no

dia em que fiz a matrícula. Obrigada por enxergar em mim um potencial, que na época eu não via. Obrigada pelo companheirismo e pelo apoio!

Ao laboratório de imunologia e imunogenética em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia (INI) - Fiocruz, chefiado pela Dra. Maria da Glória Bonecini e Dr. Eric Roma, agradeço pelo tempo de aprendizado, troca de conhecimento e acolhimento ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Andreia Lamoglia, por ter me dado a oportunidade de fazer iniciação científica nesse lugar maravilhoso, onde obtive muito crescimento e conhecimento. Tenho certeza que ficará marcado na minha história e sou muito grata por isso.

À minha orientadora e amiga, Dra. Alinne Renzetti, que me acolheu com no laboratório, aceitou o desafio de me ensinar e esteve ao meu lado durante cada etapa dos experimentos para a realização deste trabalho. Cada dia que passamos dentro do NB3 fazendo experimentos de citometria foi único e muito proveitoso. Tudo o que aprendi foi você quem me ensinou. Obrigada pela sua dedicação!

Aos colaboradores do projeto, LapClin (Laboratório de pesquisa clínica em Doença de Chagas); aos médicos cardiologistas e infectologistas Dr. Roberto Saraiva, Dr. Marcelo Holanda, Dr. Luiz Henrique Sangenis, Dr. Alejandro Hasslocher e à plataforma de citometria de fluxo RPT08A da Fiocruz.

Às fontes de fomento, Inova Fiocruz, pelo suporte financeiro e ao CIEE pela bolsa de estágio concedida durante a realização deste trabalho.

Aos pacientes, pois sem eles não seria possível a realização deste projeto.

Aos participantes da banca, obrigada por terem aceitado o convite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição mundial de casos de Doença de Chagas em 2018.....	10
Figura 2- Distribuição das Américas pela transmissão vetorial pelo triatomíneo.....	11
Figura 3 - Formas evolutivas do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 4 - Ciclo de Transmissão do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 5 - Estratégia de <i>gate</i> para identificação de subpopulações de células B (CD19+)	20
Figura 6 - Distribuição fenotípica de linfócitos B totais	21
Figura 7 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD24 e CD38.....	22
Figura 8 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD24 e CD38 – Formas da CCC separadas.....	22
Figura 9 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores IgD e CD27	23
Figura 10 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores IgD e CD27 – Formas da CCC separadas.....	23
Figura 11 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD21 e CD27.....	24
Figura 12 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD21 e CD27 - Formas da CCC separadas.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 CASUÍSTICA.....	16
2.2 ASPECTOS ÉTICOS	16
2.3 MARCAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B POR CITOMETRIA DE FLUXO	16
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3. RESULTADOS.....	18
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	18
3.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS	19
4. DISCUSSÃO	25
5- CONCLUSÃO	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXO 1	36

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR LINFÓCITOS B EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, sendo considerada uma doença tropical e negligenciada. Atualmente estima-se que entre 6 a 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo. Esta doença apresenta duas fases: a aguda, normalmente assintomática ou possui sintomas leves e inespecíficos e a crônica, subdividida em fase assintomática, chamada de indeterminada, que pode durar ente 10 a 30 anos e fase sintomática, com sintomas cardíacos ou digestivos. O parasita possui alto tropismo pelo tecido cardíaco, e isso causa uma das principais complicações da fase crônica, que é a manifestação cardíaca, conhecida como cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), sendo responsável pelo acometimento de 30 a 40% dos pacientes com a doença. A cardiomiopatia progride através de diversas fases: A, B1, B2, C e D, sendo a última a mais grave. A progressão ocorre através da perda do equilíbrio imunológico que promove resposta inflamatória, prejudicando a defesa do hospedeiro contra o parasita. Atualmente sabe-se que a expansão desregulada de linfócitos B contribui para a patogênese da CCC. O parasita induz ativação policlonal de células B promovendo diferenciação em subpopulações de memória ou em plasmócitos que irão produzir anticorpos essenciais para controlar a parasitemia, porém essa ativação policlonal é a responsável por parte dos danos cardíacos. Neste estudo, a resposta imune específica de linfócitos B contra o antígeno de *T. cruzi* foi caracterizada e o perfil fenotípico de subpopulações de células B foi identificado em pacientes com a doença, comparado com indivíduos saudáveis. As células B *naive* tiveram a maior contribuição percentual, no grupo controle, enquanto nas células B de memória a maior contribuição foi no grupo CCC, indicando que o perfil de aumento de linfócitos B é associado à exposição ao antígeno. A subpopulação transitacional apresentou diminuição na contribuição das fases mais avançadas, B1/B2, e maior contribuição na fase A, a fase inicial da cardiomiopatia, indicando tentativa de regeneração imune. Os plasmoblastos demonstraram maior contribuição percentual em pacientes com a CCC, mais especificamente nas fases C e D, as fases mais avançadas. O estudo também mostra o perfil de células B exauridas, aumentadas tanto no grupo

controle quanto no grupo CCC, associadas à idade e doenças crônicas. Os dados encontrados indicam que a resposta imune mediada por linfócitos B se torna progressivamente ineficaz com a evolução da cardiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Linfócitos B e cardiomiopatia chagásica crônica.

ABSTRACT

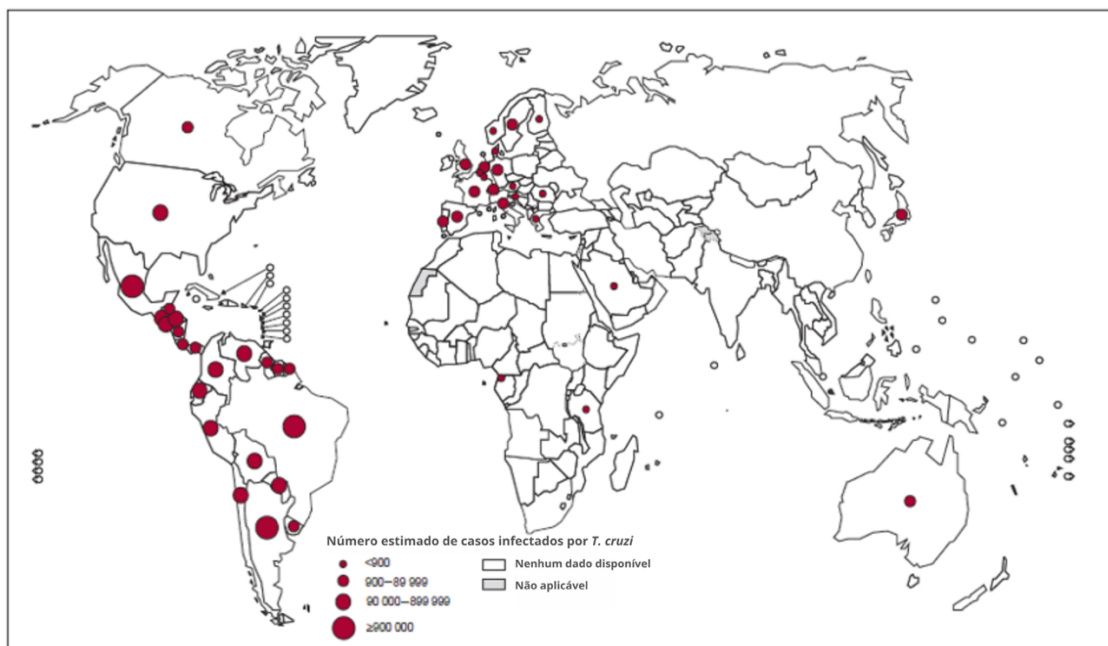
Chagas Disease (CD) is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is considered a neglected tropical disease. It is currently estimated that between 6 and 8 million people are infected worldwide. This disease has two phases: acute, usually with mild and specific symptoms, and chronic, subdivided into indeterminate (without symptoms) and symptomatic, with cardiac or digestive symptoms, which can last from 10 to 30 years. The parasite has a high tropism for cardiac tissue and this causes one of the main complications of the chronic phase, which is the cardiac manifestation known as chronic Chagasic cardiomyopathy (CCC), responsible for affecting 30 to 40% of patients with the disease. Cardiomyopathy progresses through several stages: A, B1, B2, C and D, the last of which is the most serious. Progression occurs through a loss of immune balance which promotes an inflammatory response, impairing the host's defense against the parasite. It is now known that the deregulated expansion of B lymphocytes contributes to the pathogenesis of CCC. The parasite induces polyclonal activation of B cells, promoting differentiation into memory subpopulations or plasma cells that will produce antibodies essential for controlling parasitemia, but this polyclonal activation is responsible for part of the cardiac damage. In this study, the specific immune response of B lymphocytes against the *T. cruzi* antigen was characterized and the phenotypic profile of B cell subpopulations was identified in patients with the disease compared to healthy individuals. Naive B cells had the highest percentage contribution in the control group, while memory B cells had the highest contribution in the CCC group, indicating that the profile of increased B lymphocytes is associated with antigen exposure. The transitional subpopulation showed a reduced contribution in the more advanced phases, B1/B2, and a greater contribution in phase A, the initial phase of cardiomyopathy, indicating an attempt at immune regeneration. Plasma cells showed greater expression in patients with CCC, more specifically in phases C and D, the most advanced phases. The study also shows the profile of exhausted B cells, increased in both the control group and the CCC group, associated with age and chronic diseases. The data found indicate that the immune response mediated by B lymphocytes becomes progressively ineffective with the evolution of chronic chagasic heart disease.

Key-words: Chagas Disease, B lymphocytes and chronic cardiomyopathy chagas.

1. INTRODUÇÃO

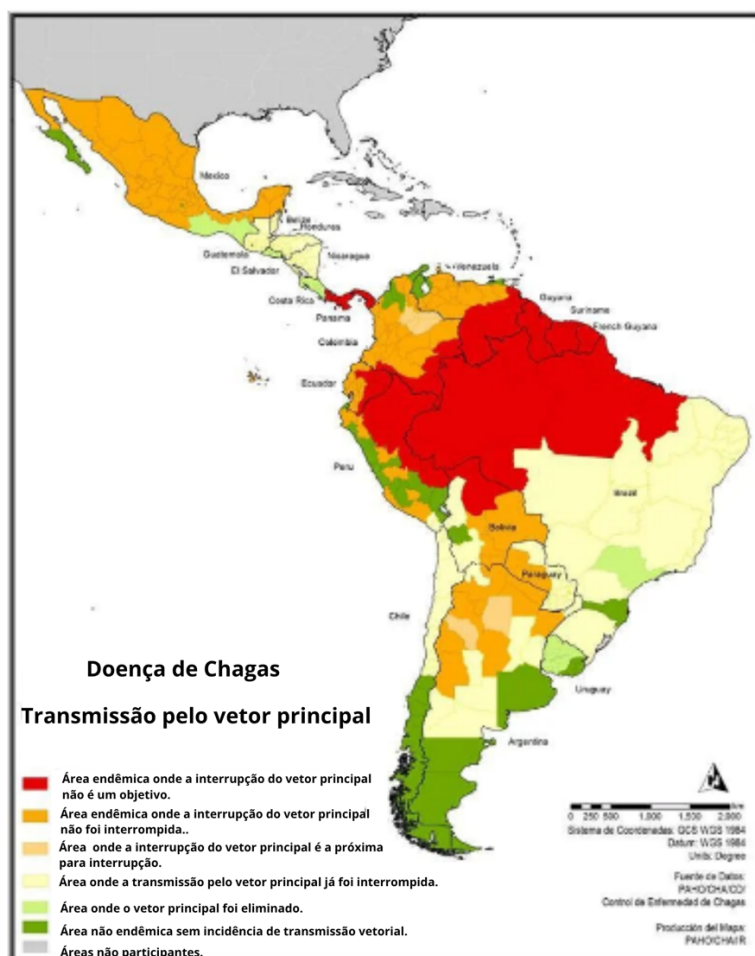
A Doença de Chagas (DC), também chamada de tripanossomíase americana, foi descoberta pelo cientista brasileiro Carlos Chagas (Dias; Laranja; Nobrega, 1945). Esta doença é considerada uma doença tropical, negligenciada, de caráter antropozoonótico (WHO, 2025). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), esta doença acomete populações em vulnerabilidade social. Atualmente, estima-se que entre 6 e 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, com uma incidência anual de 30 mil novos casos e 12 mil óbitos por ano. Além disso, cerca de 75 milhões de pessoas residem em áreas de risco, podendo contrair a doença (WHO, 2025; OPAS, 2021) (**Figura 1**). A DC é endêmica em regiões da América do sul, América central e México, podendo ser encontrada também em alguns países da América do norte e alguns países europeus, devido a mobilidade populacional (**Figura 2**)

Figura 1- Distribuição mundial de casos de Doença de Chagas em 2018.



Fonte: Adaptado de WHO, 2025.

Figura 2- Distribuição das Américas pela transmissão vetorial pelo triatomíneo



Fonte: Adaptado de Organización Panamericana de la Salud (PAHO)- Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2019.

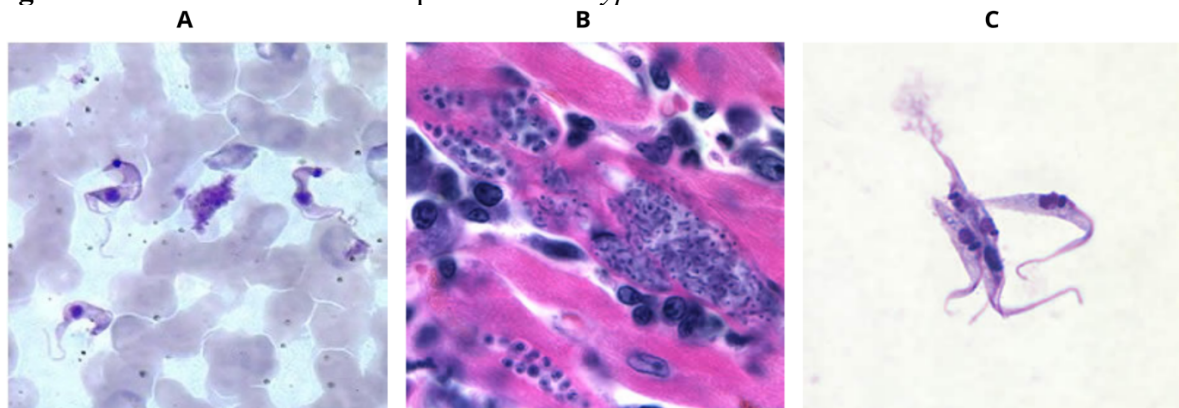
A epidemiologia da DC pode ser considerada complexa, sendo influenciada por diversos fatores, que inclui a grande diversidade de vetores - cerca de 160 espécies de triatomíneos descritos -, e as diferentes formas da propagação da doença. Tal cenário dificulta a implementação de medidas de controle eficazes e a erradicação. A transmissão pode ocorrer por via oral, vertical, transfusional, acidental ou por transplantes de órgãos (Cucunubáa *et al.*, 2024).

A transmissão vertical, ocorre principalmente em países não endêmicos ou locais em que a transmissão vetorial está controlada (Cucunubáa *et al.*, 2024; Swett *et al.*, 2024). No Brasil, a transmissão oral é frequente na região amazônica e está relacionada a surtos agudos de Chagas, que são notificados em diversos estados brasileiros. Foram relatados 3.287 casos de surtos agudos entre 2007 e 2020, sendo 79,7% desses casos ocorridos no Pará, e que estão associados a ingestão de alimentos contaminados com *Trypanossoma cruzi*. A taxa de transmissão por meio de transplante de órgãos de doador infectado varia

entre 13 a 22% para órgãos intra-abdominais e 75 a 100% para transplantes cardíacos. Já por meio de transfusão sanguínea, a transmissão pelo parasita é mais controlada devido a triagem de doadores em bancos de sangue (Swett *et al.*, 2024). O risco de infecção após transfusão de uma unidade de sangue de doador infectado, é de 10 a 20% em países endêmicos e o risco em países não endêmicos varia entre 6 a 26% em doações de plaquetas, e apenas 0 a 4% em doações de hemácias, plasma e crioprecipitado (Cucunubáa *et al.*, 2024). Além disso, fatores socioeconômicos também geram impacto na epidemiologia de Chagas, estando diretamente associados a áreas de maior pobreza. Condições precárias de moradia favorecem a proliferação de vetores, ocasionando o aumento do número de transmissão do agente etiológico (Silva; Watanabe, 2023).

A DC é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), um protozoário flagelado unicelular (DIAS *et al.*, 1945), sendo transmitida por um inseto vetor pertencente à família Triatominae. O parasita possui três formas evolutivas: a tripomastigota, que se encontra no intestino grosso do inseto vetor e no sangue periférico de hospedeiros mamíferos, a amastigota, que se encontra nas células do hospedeiro mamífero e a epimastigota, que se encontra no intestino médio do vetor (Farani; Jones; Poveda, 2024).

Figura 3 - Formas evolutivas do protozoário *Trypanosoma cruzi*

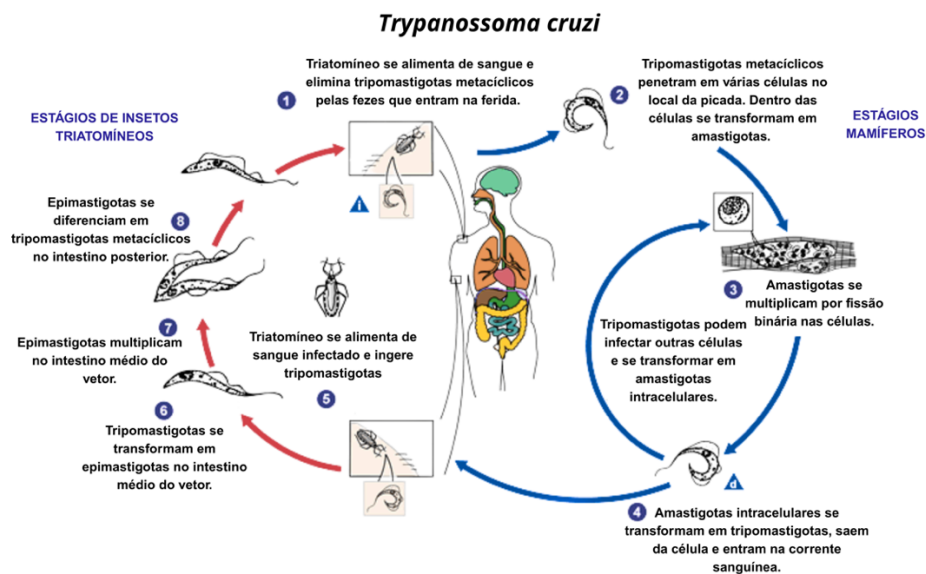


Legenda: **A)** Forma tripomastigotas visualizadas por distensão sanguínea e coradas com Giemsa; **B)** Forma amastigotas encontrada no tecido cardíaco e corada em H&E, **C)** Forma epimastigotas em meio de cultura. **Fonte:** CDC, 2021.

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* envolve dois hospedeiros principais: um vetor invertebrado, inseto triatomíneo conhecido popularmente como barbeiro, e um hospedeiro vertebrado, como humanos. Este parasita, possui variações morfológicas e funcionais, e alterna entre as formas replicativas e infectantes. O ciclo evolutivo ocorre

quando o inseto vetor, o barbeiro, ingere sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo a forma tripomastigota do parasita, considerada a fase infectante. No intestino médio do inseto vetor, os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, que se multiplicam e posteriormente, esses epimastigotas se transformam novamente em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminados nas fezes do inseto (Farani; Jones; Poveda, 2024). A transmissão ao hospedeiro vertebrado, ocorre por meio do contato das fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicas com a pele lesionada. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas penetram nas células, e se diferenciam em amastigotas. O parasita nesse estágio, se prolifera por fissão binária no interior das células, e isso induz a lise da membrana celular hospedeira, onde eles são liberados para a corrente sanguínea para que ocorra a disseminação. Antes de chegar no sangue periférico, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas. O parasita possui um alto tropismo pelo tecido cardíaco, tornando o coração um dos principais alvos de infecção, pois tem muitas fibras musculares e um alto suprimento de sangue, facilitando a chegada do parasita (Martín-Escolano *et al.*, 2022)

Figura 4 - Ciclo de Transmissão do parasito *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de CDC, 2021

A Doença de Chagas contribui significativamente na morbidade e mortalidade tanto em regiões endêmicas quanto não endêmicas, e ainda sim, é uma das doenças tropicais mais negligenciadas (Veluswami *et al.*, 2024). Esse cenário se deve, principalmente, ao diagnóstico tardio, à escassez de novos tratamentos e ao fato de a

infecção ser assintomática na maioria dos casos. Dessa forma, a doença representa um grande desafio epidemiológico global, devido ao seu impacto na saúde pública e elevados custos socioeconômicos.

A doença apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda é marcada pela alta parasitemia, que induz uma forte ativação do sistema imunológico. Normalmente, a fase aguda é assintomática ou possui sintomas leves não específicos tendo uma duração de 40 a 60 dias. Porém, em alguns casos, o indivíduo pode apresentar lesão na pele ou mucosas com reação inflamatória, denominado como sinal de *Romaña*, que ocorre em até 20% dos casos de doença de Chagas, quando o parasita *Trypanosoma cruzi* entra no organismo através da mucosa e acompanhada de conjuntivite, (Agência FIOCRUZ de notícias, s.d.). Geralmente esse sinal clínico ocorre quando a transmissão é vetorial ou quando o indivíduo coloca as mãos contaminadas com fezes de *T. cruzi* nos olhos. Já a fase crônica, pode ser indeterminada ou sintomática. A crônica indeterminada é caracterizada pela ausência de sintomas e marcada pelo equilíbrio imunológico; já a crônica sintomática ocorre quando há perda do equilíbrio imunológico. Aproximadamente entre 30 a 40% dos pacientes perdem esse equilíbrio, sendo o momento quando os sintomas clínicos se tornam evidentes. Uma das principais complicações da fase crônica da Doença de Chagas é a manifestação cardíaca, conhecida como Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), que pode levar a insuficiência cardíaca, arritmias e outras disfunções cardiovasculares graves. Estima-se que cerca de 30% dos infectados evoluem para a CCC (Llerena-Velastegui;Lopez-Usina;Mantilla-Cisneros, 2024).

A CCC é a manifestação mais grave da DC, que progride através de diversas formas clínicas. Nos estágios iniciais, a cardiomiopatia pode ser assintomática, o que leva a dificuldade de diagnóstico. Com a progressão da doença, sintomas que indicam anormalidade cardíaca se tornam presentes, como dispneia ao esforço, palpitações, fadiga e tontura. É uma doença marcada por grandes alterações estruturais e funcionais dentro do coração, incluindo remodelação ventricular, danos ao sistema de condução elétrica, miocardite fibrosante crônica e aneurismas, levando a graves riscos de acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca, eventos tromboembólicos e morte súbita cardíaca, sendo a última responsável por 55 a 65% das mortes em pacientes com a CCC (Llerena-Velastegui;Lopez-Usina;Mantilla-Cisneros, 2024).

Segundo a Classificação de Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, existem 5 classificações da CCC, que levam em conta o eletrocardiograma (ECG), radiografia de

tórax, ecocardiograma e sintomas clínicos de insuficiência cardíaca, conforme a tabela 1 (Saraiva *et al.*, 2021).

Tabela 1: Classificações da Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC).

Classificação	ECG	Ecocardiograma	HF
A	Anormal	Normal	Não
B1	Anormal	Alterado, FEVE $\geq 45\%$	Não
B2	Anormal	Alterado, FEVE $< 45\%$	Não
C	Anormal	Alterado	HF compensado
D	Anormal	Alterado	HF refratário

Tabela elaborada pelo próprio autor. **Fonte de dados:** (Saraiva *et al.*, 2021)

Legenda: HF- Insuficiência cardíaca; FEVE- Fração de ejeção ventricular esquerda.

Devido a complexa interação entre os parasitas e a resposta imune do hospedeiro, existem diversos fatores que levam a transição da doença aguda para a crônica, um deles é a resposta imunológica que desencadeia resposta inflamatória e interrupção de fatores cardíacos intrínsecos promovendo estresse oxidativo, fibrose e apoptose em tecidos cardíacos. O curso da doença é determinado pela complexa interação entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro. O sistema imune reconhece o antígeno, interage, e inicia uma cascata de eventos para controlar o parasita e restaurar a homeostase, e essas interações levam a um desequilíbrio na produção de diversas moléculas envolvidas na resposta inflamatória. Estudos mostram que a adição de *T. cruzi* em culturas de células linfoides, leva a alterações imunológicas que prejudicam as defesas do hospedeiro contra o parasita (Kiersenbaum *et al.*, 1995). Dessa forma, o aumento ou diminuição de mediadores inflamatórios pioram ou estabilizam a doença (Torres *et al.*, 2022). O controle da infecção depende da resposta imune inata mediada por macrófagos, células NK, células dendríticas, citocinas e quimiocinas e da resposta imune adaptativa, ou seja, a defesa específica que é mediada por linfócitos T e B (Bryan; Guyach; Norris, 2010)

Ainda não há consenso sobre a patogênese da cardiomiopatia, mas é sabido que a participação de linfócitos B na autoimunidade é um dos mecanismos que contribuem para a sua expansão desregulada (Fares *et al.*, 2013). A infecção pelo *T. cruzi* induz ativação policlonal das células B promovendo a diferenciação em plasmoblastos que irão produzir anticorpos essenciais para controlar a parasitemia ou diferenciação em células B de memória, que irão garantir resposta mais rápida, se houver uma nova exposição. Porém,

essa ativação policlonal também leva a manifestações autoimunes e acredita-se que seja responsável por parte dos danos da CCC. Assim, essas células desempenham papel protetor e patológico (Amezcu Vesely *et al.*, 2012). A função de controlar a doença é atribuída a diversas subpopulações de células B que estão associadas a diferentes resultados clínicos na CCC (Passos *et al.*, 2019). A não expressão ou expressão de CD19, CD21, IgD, CD24, CD27 e CD38 permite diferenciar linfócitos que nunca foram expostos ao antígeno, chamados de linfócitos B *naive*, dos linfócitos que obtiveram contato com o antígeno, chamados de linfócitos B memória; além de ser possível avaliar o perfil de ativação e exaustão dessas células. As classes de imunoglobulinas IgM, IgD e IgG também fornecem informações relevantes sobre a maturação, ativação e função das subpopulações.

Por esta razão, o objetivo deste trabalho visa caracterizar a resposta imune específica de linfócitos B contra o antígeno de *Trypanosoma cruzi* estimulado *in vitro*, em pacientes com a doença de Chagas

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Casuística

Foram incluídos 4 indivíduos sadios residentes de área não endêmica, denominados como (CTRL) e 20 pacientes com DC, que são classificados como: grupo indeterminado IND (n = 5) e grupo com CCC subdividido em forma clínica A (n = 5), forma clínica B1/B2 (n = 5) e forma clínica C/D (n = 5).

2.2 Aspectos Éticos

Pacientes com CCC foram recrutados por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - ANEXO), e este estudo possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Clínica, CEP: 3.507.530, do Instituto Nacional de Infectologia, INI/Fiocruz.

2.3 Marcação das subpopulações de linfócitos B por citometria de fluxo

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de heparina por meio de punção venosa. O sangue total foi diluído em 1:1 com meio específico para cultivo de células sanguíneas, RPMI (Sigma®, EUA) e submetido a nova diluição de 1:2 com Ficoll-Histopaque 1077(Sigma®, EUA). O sangue diluído foi levado para centrifugação por 20 minutos à 2.400 rotações por minuto (RPM) para obtenção de células mononucleares de

sangue periférico (CMSP). As células obtidas foram lavadas com RPMI em centrifugação por 10 minutos à 1.800 RPM e ressuspendidas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®, EUA), 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina Sigma®, EUA) e 1% de glutamina (Sigma®, EUA). A viabilidade celular foi determinada através de análise microscópica, utilizando corante azul de tripan em hemocítômetro. Todas as amostras obtiveram viabilidade superior a 95%.

As células foram transferidas para placas de cultivo celular a uma concentração entre $1,5 \times 10^6$ à $3,0 \times 10^6$ em cada poço. Determinados poços receberam estímulo com 10ug/mL de antígeno de *T. cruzi* cepa Y, enquanto outros não receberam nenhum estímulo e foram utilizados como controles de viabilidade positivo e negativo para morte celular. As culturas foram incubadas por um período de 18 a 20 horas (*overnight*). Ao final da incubação, as células foram coletadas por centrifugação; aquelas que foram estimuladas foram marcadas com *zombie* por 10 minutos em temperatura ambiente e as que não receberam estímulo foram marcadas com *zombie* por 30 minutos, sendo induzidas à morte a 60°C em banho Maria para obtenção dos controles de viabilidade positivo. O controle de viabilidade negativo, foi incubado com *zombie* por 10 minutos em temperatura ambiente. Ao final da marcação, as culturas foram lavadas com Tampão fosfato Salino 1x (PBS).

Para a marcação dos linfócitos B e as subpopulações, foram utilizados os seguintes anticorpos: CD19, CD21, CD27, IgD, CD24 e CD38 (**Tabela 2** - todos adquiridos pela Biolegend®, EUA). As células foram incubadas na geladeira com os anticorpos por 30 minutos, lavadas com Tampão Fosfato Salino/Albumina Sérica Bovina (PBS/BSA) para bloquear ligações inespecíficas e fixadas com Cytotfix (BD®, EUA) para preservar as marcações.

Todas as amostras foram adquiridas pelo citômetro de fluxo BD FACSymphony A5 (BD®, EUA), plataforma RPT08A Fiocruz. As análises de dados foram realizadas através do programa FlowJo 10 (BD®, EUA).

Tabela 2: Anticorpos utilizados para marcação das células.

Marcadore	Fluorocromo	Laser	Canal	Diluição	Volume
CD19	FITC	Blue 488nm	515/20-505/LP	1:40	1,0uL
CD21	PerCP-Cy5.5	Blue 488nm	710/50-690LP	1:40	1,0uL
CD27	APC-Cy7	Red 640nm	780/60-750LP	1:80	0,6uL
IgD	BV785	Violet 405nm	780/60-750LP	1:40	1,0uL
CD24	PerCP-Cy5.5	Blue 488nm	710/50-690LP	1:40	1,0uL
CD38	PE-Cy7	Red 640nm	780/60-750LP	1:40	1,0uL
Zombie	Yellow	Violet 405nm	586/15-550LP	1:20	1,0uL

Legenda: Lista de anticorpos conjugados com fluorocromos que são capazes de emitir cor quando excitados por um Laser. O canal irá detectar o sinal emitido pelo fluorocromo. A titulação foi feita para obtenção da melhor diluição e o volume foi padronizado. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

2.4 Análise Estatística

Foram utilizados os testes estatísticos Chi-square de contingência, Kruskal-Wallis de coluna e o teste t não paramétrico Mann-Whitney através do *software* GraphPad Prism10. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas por (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$).

3. RESULTADOS

3.1 Características dos participantes do estudo

Em relação aos participantes deste estudo, foi possível identificar diferenças estatísticas quanto à idade ($p = 0,0319$); etnia ($p = 0,0302$) apenas entre IND e B1/B2; dislipidemia ($p = 0,0384$) entre IND x A e A x C/D e hipertensão arterial sistêmica ($p = 0,0384$) entre IND x A, IND x B1/B2, A x C/D e B1/B2 x C/D (**Tabela 3**).

Tabela 3: Características sociodemográficas dos pacientes com CCC.

Características Estudadas	IND (n=5)	A (n=5)	B1/B2 (n=5)	C/D (n=5)	p valor
Idade média (Desvio Padrão)	57,8 (9,2)	71 (7,28)	66 (10,41)	55 (1,58)	A
Sexo (n,%)					
Masculino	1 (20)	3 (60)	1 (20)	2(40)	ns
Feminino	4 (80)	2(40)	4 (80)	3 (60)	
Etnia auto declarada (n,%)					
Branca	3 (60)	2(40)	1 (20)	1 (20)	B
Parda	0 (0)	3 (60)	4 (80)	2(40)	
Preta	2(40)	0 (0)	0 (0)	2(40)	
Escolaridade (n,%)					
Superior/médio	3 (60)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	ns
Fundamental	0 (0)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	
Fund. Incompleto/sem instrução	2(40)	3 (60)	3 (60)	3 (60)	
Tabagismo (n,%)					
Não	4 (80)	4 (80)	4 (80)	2(40)	ns
Sim	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	
Ex-tabagista	0 (0)	1 (20)	1 (20)	3 (60)	
Diabetes Mellitus					
Sim	1 (20)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	ns
Não	4 (80)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	
Dislipidemia					
Sim	2(40)	5 (100)	3 (60)	2(40)	C
Não	3 (60)	0 (0)	2(40)	3 (60)	
Hipertensão Arterial Sistêmica					
Sim	0 (0)	3 (60)	3 (60)	0 (0)	D
Não	5 (100)	2(40)	2(40)	5 (100)	
Hipotireoidismo					
Sim	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (20)	ns
Não	5 (100)	5 (100)	4 (80)	4 (80)	

Legenda: ns= não significativo. A: p valor entre todas as idades= 0,0319. B: p valor entre IND x B1/B2= 0,0302. C: p valor entre IND x A e A x C/D= 0,0384. D: p valor entre IND x A, IND x B1/B2, A x C/D, e B1/B2 x C/D= 0,0384. Os grupos que não foram comparados não obtiveram diferença significativa. Foi aplicado um teste Chi-square de contingência para os grupos: sexo, etnia, escolaridade, tabagismo, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensão arterial e hipotireoidismo. Para o grupo idade, foi aplicado um teste Kruskal-Wallis de coluna.

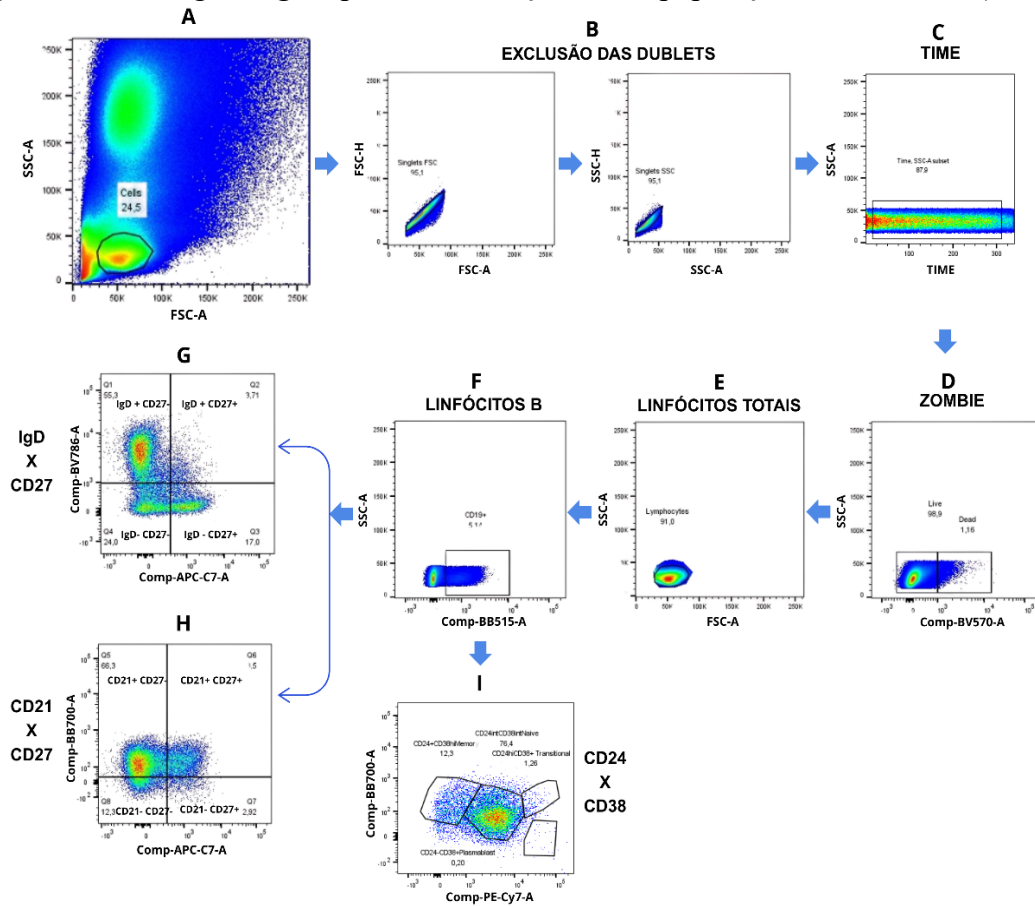
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Avaliação fenotípica das subpopulações de linfócitos B em pacientes com doença de Chagas

A partir da estratégia de *gate*, foram utilizados marcadores para definir as subpopulações dentro de linfócitos B (CD19⁺). Para avaliar memória e *status* de classe, foram utilizadas as combinações de marcadores IgD e CD27 (Di Sante *et al.*, 2022) com objetivo de analisar as subpopulações (IgD⁺, CD27- *Naive*), (IgD⁺, CD27⁺ *Marginal zone*), (IgD⁻, CD27⁺ *Memory Switched*) e (IgD⁻, CD27- *Double negative*). Para avaliar maturidade funcional e ativação, foram utilizadas as combinações de marcadores CD21 e CD27 (Corrente *et al.*, 2022) com objetivo de analisar as subpopulações (CD21⁺, CD27- *Naive*), (CD21⁺, CD27⁺ *Memory*), (CD21⁻, CD27⁺ *Activated*) e (CD21⁻ e CD27- *Atypical*). Para avaliar estágio e diferenciação, foram utilizadas as combinações de marcadores, CD24 e CD38 (Girard *et al.*, 2021) com objetivo de analisar as

subpopulações (CD24int, CD38int *Naive*), (CD24hi, CD38low *Memory*), (CD24hi, CD38hi *Transicional*) e (CD24low, CD38hi *Plasmoblasts*) (**Figura 5**).

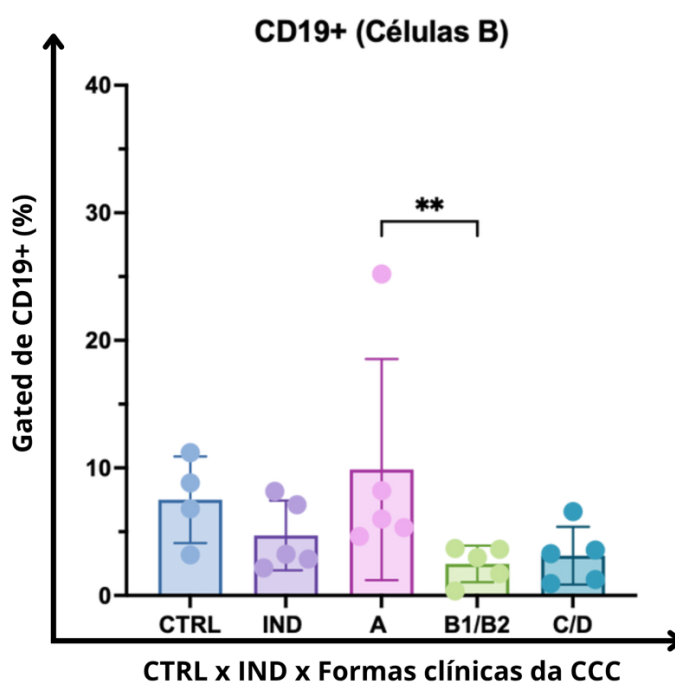
Figura 5 - Estratégia de *gate* para identificação de subpopulações de células B (CD19+)



Legenda: Estratégia foi feita com base nos marcadores (IgD e CD27), (CD21 e CD27) e (CD24 e CD38). **A)** Gate de células mononucleares (24,5%). **B)** Exclusão de *doublets* (95,1% *Singlets*). **C)** *TIME*, controle de células adquiridas de forma contínua (87,9%). **D)** Marcador de viabilidade *zombie* (98,9% vivas). **E)** Gate de linfócitos totais dentro das células viáveis (91%). **F)** Gate de linfócitos B (5,1%). As subpopulações são analisadas através dos fluorocromos nos eixos X e Y e diferenciadas através dos quadrantes, em **G)**, Q1= IgD+ CD27- (*Naive*- 55,3%), Q2= IgD+ CD27+ (*Marginal Zone*- 3,71%), Q3= IgD- CD27+ (*Memory Switched*- 17,0%), Q4= IgD- CD27- (*Double negative*- 24,0). Em **H)**, Q5= CD21+ CD27- (*Naive*- 66,3%), Q6= CD21+ CD27+ (*Memory*- 18,5%), Q7= CD21- CD27+ (*Activated*- 2,92%), Q8= CD21- CD27- (*Atypical*- 12,3%). Em **I)**, as subpopulações (CD24hi CD38hi *Transicional*), (CD24hi CD38low *Memory*), (CD24int CD38int *Naive*) e (CD24low CD38hi *Plasmoblasts*) são definidas com base na dispersão. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Em primeiro momento, foram realizadas análises da contribuição de linfócitos B totais (CD19+) entre indivíduos controles (CTRL), pacientes com Doença de Chagas na forma indeterminada (IND) e pacientes com Doença de Chagas na forma de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Foi observado diferença significativa entre forma A e B1/B2.

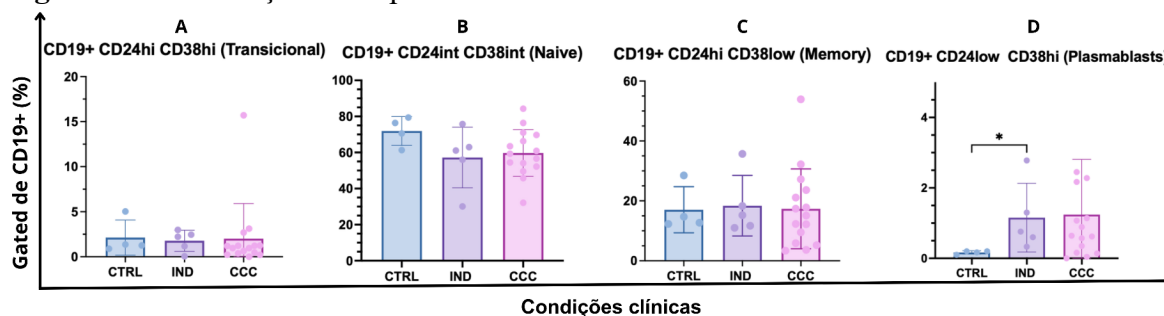
Figura 6 - Distribuição fenotípica de linfócitos B totais



Legenda: Distribuição entre os grupos de indivíduos saudáveis (CTRL), grupo indeterminado (IND) e formas clínicas (IND vs A vs B1/B2 vs C/D) da doença de Chagas (DC), após estimulação com *T. cruzi*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado $p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

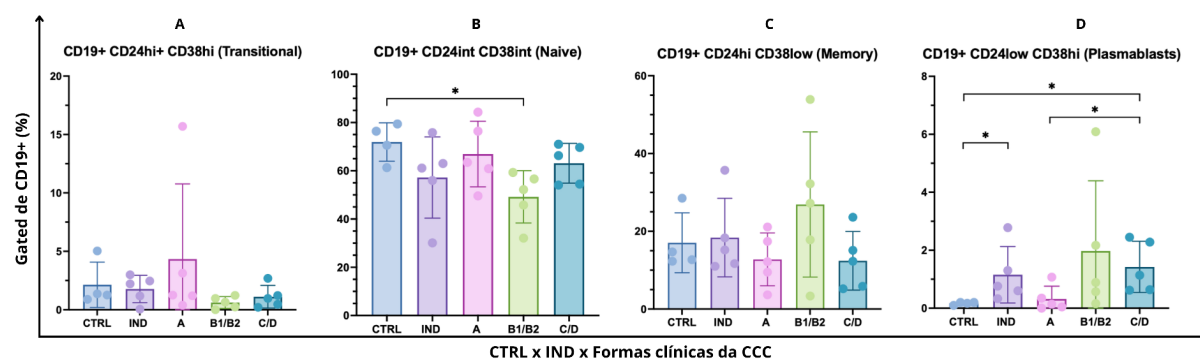
Posteriormente, foram realizadas as análises de subpopulações marcadas com CD24 e CD38 entre os grupos do estudo: (CTRL), (IND) e (CCC). Não foram identificadas diferenças estatísticas na contribuição do percentual das subpopulações de linfócitos B *Transitional* (CD19+CD24hiCD38hi), *Naive* (CD19+CD24intCD38int) e *Memory* (CD19+CD24hiCD38low) entre os grupos, conforme demonstrado nas **figuras 7A, 7B e 7C**. Entretanto, foi observado um aumento do perfil fenotípico para a subpopulação *Plasmablasts* (CD24lowCD38hi) para o grupo IND quando comparado com o CTRL (**Figura 7D**). Quando comparamos os grupos CTRL, IND e as formas da CCC separadamente, foi observado diferenças significativas para a subpopulação *Naive*, com uma diminuição deste perfil celular para a forma clínica B1/B2 quando comparado ao grupo CTRL (**Figura 8B**). Além disso, foi identificado um aumento da contribuição fenotípica de *Plasmablasts* nos grupos IND (**Figura 8D**) e C/D (**Figura 8D**) quando comparado o grupo CTRL (**Figura 8D**).

Figura 7 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD24 e CD38



Legenda: Distribuição fenotípica entre os grupos indeterminado (IND), pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e indivíduos saudáveis (CTRL), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+CD24hiCD38hi *Transicional*, **B**) CD19+CD24intCD38int *Naive*, **C**) CD19+CD24hiCD38low *Memory* e **D**) CD19+CD24lowCD38hi *Plasmablasts*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado * $p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Figura 8 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD24 e CD38 – Formas da CCC separadas

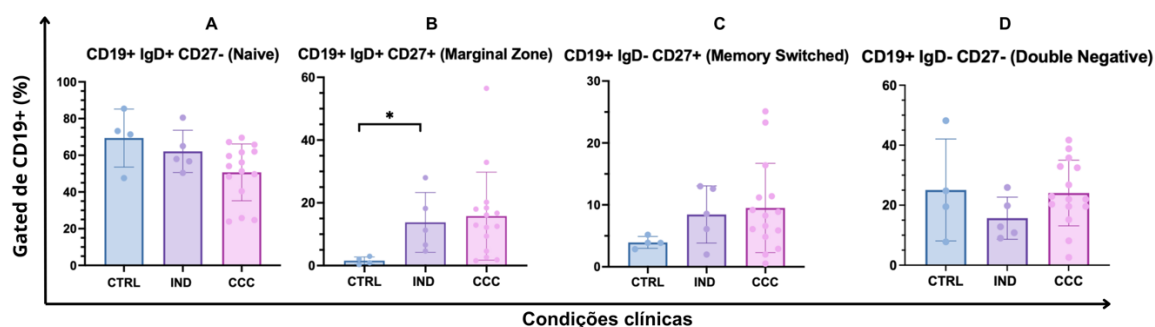


Legenda: Distribuição entre os grupos de indivíduos saudáveis (CTRL), indeterminados (IND) e formas clínicas (IND vs A vs B1/B2 vs C/D) da doença de Chagas (DC), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+CD24hiCD38hi *Transicional*, **B**) CD19+CD24intCD38int *Naive*, **C**) CD19+CD24hiCD38low *Memory* e **D**) CD19+CD24lowCD38hi *Plasmablasts*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado * $p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Na análise de subpopulações identificadas com IgD e CD27, não foi possível identificar diferenças significativas nas subpopulações de linfócitos B *Naive* (CD19+IgD+CD27-), *Memory Switched* (CD19+IgD-CD27+) e *Double Negative* (CD19+IgD-CD27-) entre os grupos CTRL, IND e CCC (**Figuras 9A, 9C e 9D**). Porém, foi possível identificar diferença significativa na subpopulação *Marginal Zone* (CD19+IgD+CD27+) com maior contribuição do grupo IND quando comparado com o CTRL (**Figura 9B**). Por outro lado, quando foi realizado as análises entre CTRL, IND e as formas de CCC separadamente, foi encontrado um aumento da contribuição percentual da subpopulação *Marginal Zone* para os grupos de pacientes das formas IND e B1/B2 quando comparado com o CTRL (**Figura 10B**). Além disso, foi visto também, um aumento da contribuição fenotípica da subpopulação *Memory Switched* nos grupos dos pacientes B1/B2 (**Figura 10C**) e C/D (**Figura 10C**), nas formas moderadas a grave da

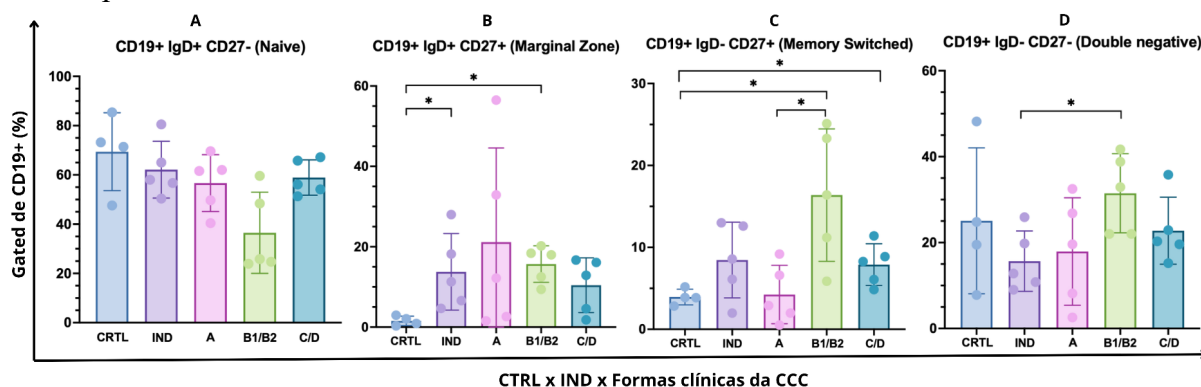
CCC, respectivamente, quando comparado ao grupo CTRL (**Figura 10C**). A subpopulação *Double Negative* teve uma maior contribuição para a forma clínica B1/B2 quando comparado ao grupo dos pacientes na forma IND (**Figura 10D**).

Figura 9 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores IgD e CD27



Legenda: Distribuição entre os grupos indeterminado (IND), pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e indivíduos saudáveis (CTRL), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+IgD+CD27- *Naive*, **B**) CD19+IgD+CD27+ *Marginal Zone*, **C**) CD19+IgD-CD27+ *Memory Switched* e **D**) CD19+IgD-CD27- *Double Negative*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado $*p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Figura 10 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores IgD e CD27 – Formas da CCC separadas

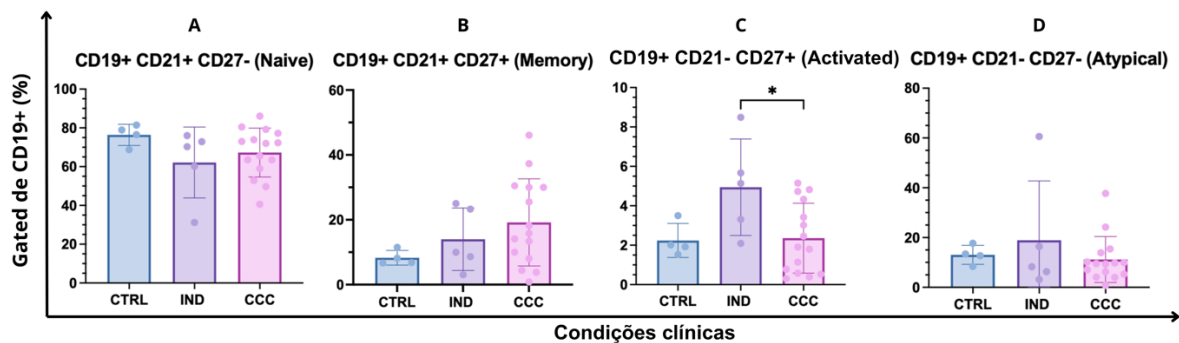


Legenda: Distribuição entre os grupos de indivíduos saudáveis (CTRL), indeterminados (IND) e formas clínicas (IND vs A vs B1/B2 vs C/D) da doença de Chagas (DC), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+IgD+CD27- – *Naive*, **B**) CD19+IgD+CD27+ – *Marginal Zone*, **C**) CD19+IgD-CD27+ – *Memory Switched* e **D**) CD19+IgD-CD27- – *Double Negative*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado $*p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Em relação aos marcadores CD21 e CD27, foi identificado as subpopulações *Naive* (CD19+CD21+CD27-), *Memory* (CD19+CD21+CD27+), *Activated* (CD19+CD21-CD27+) e *Atypical* (CD19+CD21-CD27-). Não observamos diferenças significativas para as subpopulações *Naive*, *Memory* e *Atypical*, entre os grupos do estudo CTRL, IND e CCC (**Figuras 11A, 11B e 11D**). Em compensação, foi possível observar um aumento da contribuição fenotípica da subpopulação *Activated* no grupo de pacientes IND quando comparado com as formas da CCC (**Figura 11C**). Para as análises entre os

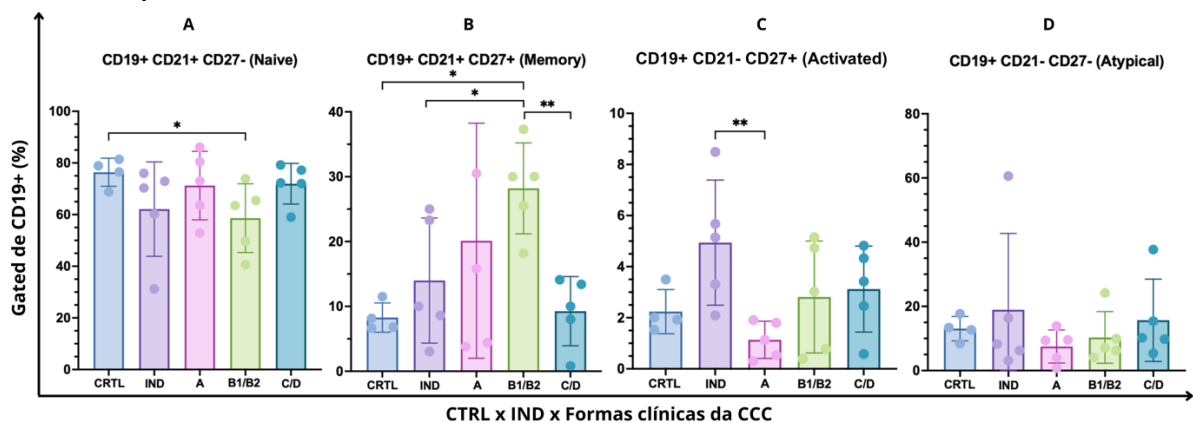
grupos CTRL, IND e as formas de CCC, separadamente, foi possível observar uma diminuição da subpopulação *Naive* para o grupo da forma clínica B1/B2 quando comparado com o CTRL (**Figura 12A**), no entanto, interessantemente, foi visto um aumento da contribuição percentual da subpopulação *Memory* para o grupo B1/B2 quando comparado com o CTRL, IND e C/D (**Figura 12B**). Além disso, foi visto também, um aumento da subpopulação *Activated* no grupo IND quando comparado com a forma clínica A (**Figura 12C**).

Figura 11 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD21 e CD27



Legenda: Distribuição entre os grupos indeterminado (IND), pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) e indivíduos saudáveis (CTRL), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+CD21+CD27- *Naive*, **B**) CD19+CD21+CD27+ *Memory*, **C**) CD19+CD21-CD27+ *Activated* e **D**) CD19+CD21-CD27- *Atypical*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado * $p \leq 0,05$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

Figura 12 - Distribuição fenotípica com base nos marcadores CD21 e CD27 - Formas da CCC separadas.



Nota: Distribuição entre os grupos de indivíduos saudáveis (CTRL), indeterminados (IND) e formas clínicas (IND vs A vs B1/B2 vs C/D) da doença de Chagas (DC), após estimulação com *T. cruzi*. Em **A**) CD19+CD21+CD27- *Naive*, **B**) CD19+CD21+CD27+ *Memory*, **C**) CD19+CD21-CD27+ *Activated* e **D**) CD19+CD21-CD27- *Atypical*. Foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e adotado * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

4. DISCUSSÃO

As células B são essenciais na resposta imune adaptativa, em que podem se diferenciar em células plasmáticas para secretar anticorpos, ou se diferenciarem em células B de memória para fornecer proteção duradoura (Chung *et al.*, 2023). A exposição ao antígeno favorece a expansão e diferenciação clonal dos linfócitos (Allie; Rondall, 2020). A população de linfócitos B totais é identificada com o marcador CD19+ (**Figura 6**). Nessa população, foi observado menor contribuição na fase B1/B2, possivelmente nessa fase, os linfócitos podem estar migrando para os tecidos cardíacos como parte da resposta inflamatória local.

A subpopulação (CD24^{hi} CD38^{hi} *Transicional*) representa as células B imaturas e marcam o elo entre células B da medula óssea e células B maduras periféricas (Chung; Silverman; Monroe, 2003). Essas células foram identificadas como precursoras imediatas de células B *Naive* em camundongo (Sanz *et al.*, 2019) e humanos (Satitsuksanoa *et al.*, 2023), e estão associadas à regulação imunológica favorável em pacientes com doenças inflamatórias crônicas (Simon *et al.*, 2016). Este tipo de células é relatado em doenças autoimunes, rinite alérgica e doenças crônicas (Girard *et al.*, 2021). Em nossos resultados, a contribuição desse perfil celular foi semelhante entre CTRL, IND e CCC, sem diferença significativa (**Figura 7A**). Em contraste com os nossos resultados, Girard *et al.*, (2021), apontam que esta subpopulação apresentou maior contribuição celular em pacientes com envolvimento cardíaco em comparação ao grupo CTRL.

Para a subpopulação de células *Naive*, os resultados demonstraram que nas combinações de marcadores utilizados (CD24^{int} CD38^{int}-), (CD21⁺ CD27⁻), obteve-se maior contribuição percentual nos grupos controle (70 - 80%), em relação à forma clínica B1/B2 (**Figuras 8B e 12A**). Este dado é totalmente esperado, pois essas células são reabastecidas constantemente por células tronco progenitoras hematopoiéticas, que refletem um sistema imune equilibrado (Dirks *et al.*, 2023). Células *Naive* são maduras, mas ainda não se encontraram com o antígeno, elas saem da medula óssea através de vasos sanguíneos e ficam preparadas para reconhecer e responder ao antígeno quando ativadas. Caso não encontrem o antígeno, elas recirculam de volta para tecidos linfoides secundários e morrem após alguns dias (Patel *et al.*, 2021). Dentre as formas clínicas, B1/B2 apresentou a menor contribuição em relação a CTRL deste perfil celular nos três conjuntos de marcadores (IgD, CD27; CD21, CD27 e CD24, CD38), apresentando significância estatística apenas em (CD24^{int} CD38^{int}) e (CD21⁺ CD27⁻). Apesar de não ter significância estatística no marcador (IgD⁺ CD27⁻) é notável a diminuição de *Naive*

nessa fase da doença (**Figuras 8B, 10A e 12A**). Isso pode estar ocorrendo, provavelmente devido a constante diferenciação desse tipo celular em subpopulações efectoras, como memória.

Após a interação com o antígeno, as células B adquirem capacidade de se especializar em células de memória. Neste perfil celular, as células proliferam rapidamente e montam uma resposta robusta (Patel *et al.*, 2021). Durante a diferenciação de células *Naive* para memória, os linfócitos B adquirem maior afinidade de ligação ao antígeno e aumentam sua capacidade de resposta (Perez-Andres *et al.*, 2010). Essas células representam um grupo heterogêneo com características fenotípicas, funcionais e de origem distintas. Por isso, em nosso estudo foram utilizados diferentes marcadores para identificar as diversas células de memória. Estas células são classificadas em (IgD+ CD27+ *Marginal Zone*), um conjunto de células derivadas da resposta imune inata, localizadas no baço. São células de memória inespecífica e atuam contra antígenos T-independentes quando há necessidade de resposta rápida sem trocar a classe da imunoglobulina (Cerutti; Cols; Puga, 2013); células de memória clássica (CD21+ CD27+ *Memory*) que circulam no sangue periférico e são derivadas da resposta imune adaptativa, podem atuar contra antígenos T-dependentes ou T-independentes (Das *et al.*, 2011); as células (IgD- CD27+ *Memory Switched*), são memória de alta afinidade, com troca de classe e que contribuem com a agilidade da resposta das células B (Taylor; Jenkins; Pape., 2012); células (CD24hi CD38low *Memory*) que possuem perfil regulador e medeiam a inflamação e a homeostase (Bartosínska *et al.*, 2021). E por fim, quando as células são reestimuladas com antígeno, elas podem se diferenciar em (CD21- CD27+ *Activated*). Essas células secretam quimiocinas e citocinas para direcionar a resposta imune (Dalakas, 2008).

Os resultados apontaram diminuição da contribuição percentual do grupo CTRL em relação a IND na subpopulação (IgD+ CD27+ *Marginal Zone*). Esse achado indica que o perfil de aumento de linfócitos B de memória pode estar associado à exposição ao antígeno (Allie; Rondall, 2020). Além disso, também foi observado maior contribuição de B1/B2 em relação ao CTRL, possivelmente refletindo resposta rápida frente a infecção e tentativa de controle na fase moderada da doença crônica. Também foi observado diminuição da contribuição percentual do grupo CCC em relação ao grupo IND na subpopulação (CD21- CD27+ *Activated*), (**Figuras 9B e 11C**). O aumento da contribuição de IND em relação ao grupo CCC na subpopulação (CD21- e CD27+ *Activated*), pode indicar uma tentativa do controle imunológico, em busca de estabelecer

a homeostase, (Bartosínska et al., 2021). É bem estabelecido que o ambiente imune com resposta pró e anti-inflamatória equilibrada está associado a um curso assintomático da doença (Vale *et al.*, 2024) corroborando com as características da doença na fase assintomática (**Figura 11C**). No entanto, no momento em que a doença avança para a fase crônica sintomática, existe um desequilíbrio com consequente diminuição de células na fase A em relação a IND na subpopulação (CD21- CD27+ *Activated*) (**Figura 12C**). Outras células de memória começam a ser recrutadas para conter a evolução da doença, como as de memória clássica (CD21+ CD27+ *Memory*) aumentando a contribuição na fase B1/B2 em relação a CTRL e IND. Apesar disso, a contribuição percentual dessas células diminui quando a doença avança para a fase mais grave, C/D (**Figura 12B**), demonstrando que a resposta imune intensa em B1/B2 pode estar correlacionada com a evolução de sintomas cardíacos, levando o paciente para o estágio mais grave, C/D, possivelmente devido a ineficiência do sistema imune adaptativo de conter a evolução da CCC. Corroborando com nossa hipótese, os autores Vale *et al.*, (2024) apontam que a resposta imune exacerbada pode resultar em patologia cardíaca associada a danos miocárdicos.

A subpopulação (IgD+ e CD27+ *Marginal Zone*), apresenta maior contribuição nas fases IND e B1/B2 em relação ao CTRL (**Figura 10B**), pois provavelmente a fase inicial crônica (IND), requer recrutamento de células com respostas rápidas, pois elas são semelhantes às inatas (Dirks *et al.*, 2023). Essas células são importantes como a primeira linha de defesa contra patógenos (Suurmond *et al.*, 2016).

Já na subpopulação (IgD- CD27+ *Memory Switched*), quando comparamos os grupos CTRL, IND e CCC, não foram observadas diferenças (**Figura 9C**). Mas quando comparamos entre as fases clínicas da CCC, foi observado maior contribuição percentual em B1/B2 e C/D em relação a CTRL (**Figura 10C**). Isso pode estar ocorrendo devido a exposição contínua a *T. cruzi*, estimulando diferenciação de células com classe trocada, para obter maior afinidade e capacidade efetora.

A subpopulação (CD24^{low} CD38^{hi} *Plasmoblasts*) são células altamente diferenciadas e produtoras de anticorpos (Patel *et al.*, 2021). Os resultados mostraram que este perfil celular, foi menos frequente no grupo CTRL, o que é esperado em indivíduos sem infecção ativa e mais frequente nos grupos CCC e IND, correlacionando com o cenário de ativação imune exacerbada nas fases crônicas da doença e possivelmente contribuindo com a evolução cardíaca (**Figura 7D**). Nas formas clínicas, a maior contribuição em relação ao CTRL, ocorre em C/D, indicando resposta inflamatória

sustentada na forma mais avançada da doença (**Figura 8D**). Essa resposta pode preceder o desenvolvimento de sintomas.

Já as subpopulações (IgD- CD27- *Double Negative*) e (CD21- CD27- *Atypical*) têm sido associadas células exaustas com função imunológica prejudicada em ambiente de estimulação antigênica prolongada em doenças crônicas e inflamatórias (Chung *et al.*, 2023) e são menos funcionais que as outras subpopulações de memória (Vale *et al.*, 2024). Não houve diferença significativa na subpopulação *Atypical*, (**Figuras 11D e 12D**). No entanto, na subpopulação *Double negative*, houve maior contribuição percentual apenas na fase clínica B1/B2 em relação a IND, indicando estágio intermediário exausto, provavelmente devido a exposição contínua ao parasita (**Figura 10D**). Os grupos CTRL desse estudo, apresentam cerca de 25% de contribuição em *Double negative* e cerca de 15% em *Atypical* (**Figuras 9D e 11D**). Segundo Chung *et al* (2023), indivíduos jovens e saudáveis apresentam aproximadamente 5% das células B no sangue periférico, no entanto, elas também estão associadas à maior expressão desse tipo celular em idosos (Colonna-Romano *et al.*, 2009). Dessa forma, justifica-se a maior contribuição de CTRL nesse estudo, visto que esse grupo é composto por indivíduos.

Para o melhor entendimento do papel de cada um dos marcadores, nesse momento serão abordadas suas características e funções de forma individualizada, com ênfase na expressão e função da resposta imune. O estudo Mensah *et al.*, (2018), investigou a relação entre CD24 e maturação das células B, e observou que esse é um dos primeiros marcadores expressos durante a maturação. Durante o ciclo de células B maduras, o marcador CD24 está presente e varia sua expressão até elas se diferenciarem em plasmoblastos, como observado em (CD24^{low} CD38^{hi} *Plasmoblasts*). Dessa forma, a perda de expressão de CD24 é uma etapa crucial na diferenciação das células secretoras de anticorpos. Acredita-se que CD24 pode estar envolvido no destino de linfócitos B, pois seu papel tanto na regulação quanto na sobrevivência após estimulação, foi confirmado em culturas de células *in vitro* humanas (Suzuki *et al.*, 2001) e de camundongos (Ayre *et al.*, 2015). O estudo de Suzuki *et al.*, (2001), demonstra que CD24⁺ é uma das moléculas que facilitam o início da apoptose em células B imaturas e CD24⁻ oferece vantagem em termos de diferenciação e menor propensão à apoptose. Assim, à medida que os linfócitos amadurecem, a expressão de CD24 diminui e as células se tornam mais resistentes à apoptose, pois elas são produtoras de anticorpos.

CD38 é um receptor de superfície que induz ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos. De acordo com Alba *et al.*, (2008), CD38 é expresso em linfócitos B

maduros e imaturos, como observado em todas as subpopulações identificadas com esse marcador em nosso estudo. CD24 e CD38 estão associados à sinalização intracelular e são regulados positivamente na medula óssea durante o desenvolvimento de células B (Perez-Andres *et al.*, 2010). A expressão desse marcador confere proteção contra infecções por diversos patógenos bacterianos e parasitários. Além do papel direto da sinalização de CD38 na ativação de células mieloides pró inflamatórias, as atividades enzimáticas do CD38 são importantes para o recrutamento de diferentes leucócitos em direção aos sinais quimiotáticos produzidos no local da infecção (Glaría; Valledor, 2020).

CD27 é um dos marcadores mais usados para definir células B de memória, e é regulado positivamente durante a reação do centro germinativo. É um marcador essencial para ativação de células B, e isso é apoiado pelo fato de que deficiências de CD27 levam a graves consequências em células B de longa duração. A exemplo disso, um estudo realizado por Grimsholm, (2022), utilizando EBV (vírus Epstein-Barr), aponta que pacientes portadores de uma rara mutação no gene CD27 sofrem linfoproliferação induzida por esse vírus, que evolui para linfoma na maioria dos casos. Além disso, o autor também comenta sobre pacientes que não apresentam resposta à vacinação dependente de células T, devido a deficiência de CD27. Esses relatos demonstram a importância da expressão desse marcador para a resposta imunológica eficiente. Ademais, as subpopulações de células B de memória que perdem CD27 são identificadas como subpopulação exausta, devido à ativação crônica ou imunosenescência de linfócitos B com a idade avançada em indivíduos saudáveis (Colonna-Romano *et al.*, 2009).

CD21 é expresso principalmente em linfócitos B, e mudanças no seu nível de expressão afetam a capacidade de células B de responder estímulos antigênicos (Korir *et al.*, 2012). A molécula CD21- é um marcador de ativação crônica ou exaustão celular. A ativação das células B leva à redução dos níveis desse marcador, como foi visto na subpopulação (CD21- CD27+ *Activated*). Já como marcador de exaustão, foi observado na subpopulação (CD21- CD27- *Atypical*). Células B de memória com baixa ou nenhuma expressão de CD21 se expandem com a idade em indivíduos saudáveis e durante inflamações crônicas (Gjertsson *et al.*, 2022).

A maturação de células B e seleção de imunoglobulina depende da expressão do receptor de células B (BCR). Células B imaturas na medula óssea expressam IgM, e à medida que atingem estágios maduros, começam a coexpressar também IgD (Dirks *et al.*, 2023). Os requisitos para ativação da IgD envolvem qualidade, quantidade ou valência do antígeno. Antígenos de baixa valência ativam receptores de IgM mas não de IgD e

antígenos polivalentes (possuem quatro ou mais epítomos) resultam na ativação de IgM e IgD (Übelhart; Jumaa, 2015). Isso evita respostas imunes desnecessárias, atuando como uma “etapa de segurança” antes da ativação plena. As células B maduras só se ativam fortemente quando encontram antígenos relevantes (como aqueles em patógenos), e não por estímulos fracos ou potencialmente prejudiciais.

Sendo assim, foi observado um perfil de alterações fenotípicas nos conjuntos de células B dos pacientes incluídos neste estudo. Segundo nossos achados, a redução da contribuição percentual na forma clínica B1/B2 em relação ao CTRL nas subpopulações *Naive* (CD24^{int} CD38^{int} e CD21⁺ CD27⁻) em conjunto com o aumento da contribuição na maioria das células de memória (*Marginal Zone*, *Memory Switched*, *Memory* e *Activated*) em relação ao CTRL, pode ser interpretado como possível marcador de ativação e diferenciação imune. As células da zona marginal e as duplas negativas também refletiram perfil de ativação frente ao parasita, mas com desfecho ineficaz no controle da doença na fase mais grave (C/D).

5- CONCLUSÃO

As subpopulações (CD24^{hi} CD38^{hi} *Transicional*), (CD24^{hi} CD38^{low} *Memory*) e CD24 e CD38 e (CD21⁻ CD27⁻ *Atypical*), não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$), sugerindo que não há evidências suficientes para afirmar que existe diferença entre os grupos.

As células (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁺ *Marginal Zone*), apresentaram maior contribuição em IND e B1/B2 em relação a CTRL, possivelmente refletindo resposta rápida frente à infecção e tentativa de controle nas fases iniciais e moderadas da doença crônica.

As subpopulações (CD19⁺, CD24^{int}, CD38^{int} *Naive*); (CD19⁺ CD21⁺, CD27⁻ *Naive*); (CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻ *Naive*), apresentam maior contribuição percentual nos grupos CTRL (70-80%), e redução significativa em B1/B2, sugerindo ativação e diferenciação contínua em subpopulações de memória nas formas clínicas mais avançadas.

A subpopulação (IgD⁻ CD27⁺ *Memory Switched*), apresentou maior contribuição nas fases B1/B2 e C/D em relação ao CTRL e a fase clínica A, indicando ativação

persistente e diferenciação em células de alta afinidade frente à exposição contínua ao *T. cruzi*.

As células (CD21⁺ CD27⁺ *Memory*), de memória clássica, apresentaram maior contribuição em B1/B2 em relação ao CTRL e IND com posterior redução em C/D, sugerindo resposta adaptativa ativa nas formas moderadas e possível falência do controle imunológico nas formas graves.

A subpopulação (CD21⁻ CD27⁺ *Activated*), apresenta maior contribuição de IND em relação a fase clínica A, demonstrando a possível perda de equilíbrio quando a doença avança para a fase inicial sintomática.

O tipo celular (CD24^{low} CD38^{hi} *Plasmoblasts*), apresenta maior contribuição percentual em IND e C/D em relação ao CTRL e C/D em relação a fase clínica A correlacionando com o cenário de ativação imune exacerbada nas fases crônicas da doença e possivelmente contribuindo com a evolução cardíaca.

As células (IgD⁻ CD27⁻ *Double Negative*) apresentaram maior contribuição apenas em B1/B2 em relação a IND, indicando estágio intermediário exausto, provavelmente devido a exposição crônica ao parasita.

Os dados indicam que a resposta imune mediada por linfócitos B se torna progressivamente ineficaz com a evolução da cardiopatia chagásica crônica. Esses achados contribuem para o entendimento da doença e reforçam a necessidade de mais investigações para compreender a progressão da CCC.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLIE, S. Rameeza; RANDALL, Troy D. Resident Memory B Cells. **Viral Immunology**, v. 33, n. 4, p. 282-293, 1 maio 2020.
- AMEZCUA VESELY, María C. *et al.* B-Cell Response during Protozoan Parasite Infections. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- AYRE, D. Craig *et al.* Dynamic regulation of CD24 expression and release of CD24-containing microvesicles in immature B cells in response to CD24 engagement. **Immunology**, v. 146, n. 2, p. 217-233, 15 jul. 2015.
- BARTOSIŃSKA, Joanna *et al.* Differential Function of a Novel Population of the CD19+CD24hiCD38hi Bregs in Psoriasis and Multiple Myeloma. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 411, 16 fev. 2021.
- BRYAN, Marianne A.; GUYACH, Siobhan E.; NORRIS, Karen A. Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in Trypanosoma cruzi Infection of Susceptible and Resistant Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e733, 6 jul. 2010.
- CDC - DPDx - American Trypanosomiasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>. Acesso em: abril de 2025.
- CERUTTI, Andrea; COLS, Montserrat; PUGA, Irene. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 118-132, 25 jan. 2013.
- CHAGAS disease. 2 abr. 2025. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 21 maio 2025.
- CHUNG, James B.; SILVERMAN, Michael; MONROE, John G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 342-348, jun. 2003.
- CHUNG, Michael King Yung *et al.* Functions of double-negative B cells in autoimmune diseases, infections, and cancers. **EMBO Molecular Medicine**, 5 jun. 2023.
- COLONNA-ROMANO, Giuseppina *et al.* A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 10, p. 681-690, out. 2009.
- CORRENTE, Francesco *et al.* CD21- CD27- Atypical B Cells in a Pediatric Cohort Study: An Extensive Single Center Flow Cytometric Analysis. **Frontiers in Pediatrics**, v. 10, 3 jun. 2022.
- CUCUNUBÁ, Zulma M. *et al.* The epidemiology of Chagas disease in the Americas. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 37, p. 100881, set. 2024.
- DALAKAS, M. C. Invited Article: Inhibition of B cell functions: Implications for neurology. **Neurology**, v. 70, n. 23, p. 2252-2260, 2 jun. 2008.

DAS, Arpita *et al.* Double-Positive CD21+CD27+ B Cells Are Highly Proliferating Memory Cells and Their Distribution Differs in Mucosal and Peripheral Tissues. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16524, 27 jan. 2011.

DI SANTE, Gabriele *et al.* Immunopathology of SARS-CoV-2 Infection: A Focus on T Regulatory and B Cell Responses in Children Compared with Adults. **Children**, v. 9, n. 5, p. 681, 7 maio 2022.

DIAS, Emmanuel; LARANJA, Francisco S.; NOBREGA, Genard. **Doença de Chagas**. [S. l.: s. n.], 1945. 581 p.

DIRKS, Johannes *et al.* Insights into B cell ontogeny inferred from human immunology. **European Journal of Immunology**, p. 2250116, 11 mar. 2023.

DIRKS, Johannes *et al.* IgD shapes the pre-immune naïve B cell compartment in humans. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 26 jan. 2023.

DOENÇA de Chagas. Agência Fiocruz de notícias. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doenca-de-chagas#:~:text=O%20edema%20inflamatório%20unilateral%20das,a%20meninge%20e%20o%20cérebro.> [s.d]. Acesso: 19 de junho 2025.

FARANI, Priscila Silva Grijó; JONES, Kathryn Marie; POVEDA, Cristina. Treatments and the Perspectives of Developing a Vaccine for Chagas Disease. **Vaccines**, v. 12, n. 8, p. 870, 1 ago. 2024.

FARES, R. C. G. *et al.* Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 7-8, p. 214-223, jul. 2013.

FONSECA AMARAL DA SILVA, Elaine; WATANABE, Renata. DOENÇA DE CHAGAS E DETERMINANTES SOCIAIS DA SAÚDE: DESAFIOS PARA O SERVIÇO SOCIAL NA SAÚDE. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 33, n. 3, p. 354-358, 30 out. 2023.

FREITAS, Vera Lúcia Teixeira de *et al.* Detection of Trypanosoma cruzi DTUs TcI and TcIV in two outbreaks of orally-transmitted Chagas disease in the Northern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2023.

GIRARD, Magalí C. *et al.* Trypanosoma cruzi Induces Regulatory B Cell Alterations in Patients With Chronic Chagas Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 12 ago. 2021.

GJERTSSON, Inger *et al.* A close-up on the expanding landscape of CD21-/low B cells in humans. **Clinical and Experimental Immunology**, 16 nov. 2022.

GLARÍA, Estibaliz; VALLEDOR, Annabel F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 228, 16 jan. 2020.

GRIMSHOLM, Ola. CD27 on human memory B cells - more than just a surface marker. **Clinical and Experimental Immunology**, 12 dez. 2022.

KIERSZENBAUM, F. *et al.* Trypanosoma cruzi-induced decrease in the level of interferon-7 receptor expression by resting and activated human blood lymphocytes. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 4, p. 207-214, abr. 1995.

KORIR, Jackson C. *et al.* B-cell activity in children with malaria. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 66, 2012.

LLERENA-VELASTEGUI, Jordan; LOPEZ-USINA, Almendra; MANTILLA-CISNEROS, Camila. Advances in the Understanding and Treatment of Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology Research**, v. 15, n. 5, p. 340-349, out. 2024.

MARTÍN-ESCOLANO, Javier *et al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, 2 jun. 2022.

MENSAH, Fane F. K. *et al.* CD24 Expression and B Cell Maturation Shows a Novel Link With Energy Metabolism: Potential Implications for Patients With chungMyalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 22 out. 2018.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. PAHO – Pan American Health Organization. Map Chagas vectorial transmission; 2019 <https://www.paho.org/en/documents/map-chagas-vectorial-transmission-2019-spanish-only> Acessado em Abril de 2025.

PASSOS, Livia Silva Araújo *et al.* Activation of Human CD11b+ B1 B-Cells by Trypanosoma cruzi-Derived Proteins Is Associated With Protective Immune Response in Human Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 4 jan. 2019.

PATEL, Arzoo M. *et al.* The Role of B Cells in Adult and Paediatric Liver Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 23 set. 2021.

PEREZ-ANDRES, M. *et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78B, S1, p. S47—S60, 2010.

RODRÍGUEZ-ALBA, Juan C. *et al.* CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3644-3652, 1 abr. 2008.

SANZ, Ignacio *et al.* Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 18 out. 2019.

SARAIVA, Roberto M. *et al.* Chagas heart disease: An overview of diagnosis, manifestations, treatment, and care. **World Journal of Cardiology**, v. 13, n. 12, p. 654-675, 26 dez. 2021.

SATITSUKSANO, Pattaporn *et al.* B cells: The many facets of B cells in allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, maio 2023.

SIMON, Quentin *et al.* In-depth characterization of CD24 high CD38 high transitional human B cells reveals different regulatory profiles. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1577-1584.e10, maio 2016.

SUURMOND, Jolien *et al.* DNA-reactive B cells in lupus. **Current Opinion in Immunology**, v. 43, p. 1-7, dez. 2016.

SUZUKI, Toyo *et al.* CD24 Induces Apoptosis in Human B Cells Via the Glycolipid-Enriched Membrane Domains/Rafts-Mediated Signaling System. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5567-5577, 1 maio 2001.

SWETT, Michael C. *et al.* Chagas Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current Cardiology Reports**, 8 ago. 2024.

TAYLOR, Justin J.; JENKINS, Marc K.; PAPE, Kathryn A. Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 12, p. 590-597, dez. 2012.

TORRES, Rosália Morais *et al.* Prognosis of chronic Chagas heart disease and other pending clinical challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

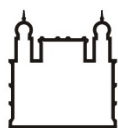
ÜBELHART, Rudolf; JUMAA, Hassan. Autoreactivity and the positive selection of B cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 11, p. 2971-2977, 9 set. 2015.

VALE, Isabela Natália Pascoal Campos do *et al.* Signatures of CD4+ T and B cells are associated with distinct stages of chronic chagasic cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 25 abr. 2024.

VELUSWAMI, Keerthana *et al.* Unraveling the Missing Pieces: Exploring the Gaps in Understanding Chagas Cardiomyopathy. **Cureus**, 15 ago. 2024.

WILKE, André B. B. *et al.* Human migrations, anthropogenic changes, and insect-borne diseases in Latin America. **Parasites & Vectors**, v. 18, n. 1, 9 jan. 2025.

ANEXO 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



PROCESSO DE CONSENTIMENTO E DOCUMENTAÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA

Células B de memória, anticorpos anti-*T. cruzi* e receptores inibitórios como *checkpoint* imunológico de progressão da cardiopatia chagásica crônica

Coordenadores: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida, Dr. Alejandro Hasslocher-Moreno, Dr. Marcelo Holanda

PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Caro(a) Sr./Sra/Srta.

Estamos convidando-o (a) a participar de uma pesquisa sobre a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas, para tentar entender se existem diferenças entre os pacientes em relação a presença de anticorpos, produzidos pelas células B de cada um e como a doença evolui em cada paciente.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é muito comum em nosso país e muitos indivíduos estão infectados e podem desenvolver problemas cardíacos, mesmo 10-30 anos depois da infecção. Não há ainda vacinas ou um tratamento eficaz para a forma crônica (avançada) desta doença. Para o acompanhamento desta doença o (a) senhor (a) fará rotineiramente exames de sangue (hemograma, bioquímica, sorologia) e exames no coração (eletrocardiograma e ecocardiograma). Todo o tratamento será realizado sem custo. Se o (a) senhor (a) aceitar participar do projeto, não haverá mudança no seu tratamento. Somente uma amostra de sangue será retirada, uma única vez. **O (A) senhor (a) está** sendo questionado se estas amostras poderão ficar armazenadas para

futuras pesquisas em Chagas, havendo nosso compromisso em submeter ao CEP toda nova proposta.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, estou sendo informado (a) sobre a doença de Chagas, e o procedimentos necessários para o acompanhamento desta enfermidade no INI-Fiocruz, bem como os exames que farei para o projeto que estou sendo convidado a participar. Fui informado também que a rotina clínica e laboratorial não mudará se desejar ou não participar desta pesquisa.

PROCEDIMENTOS

1. Procedimentos

Se eu concordar em participar neste estudo, sei que:

- a) Eu concordo em realizar, a critério dos médicos, os exames de sangue e de coração.
- b) Eu permitirei que 30mL de sangue sejam retirados para verificar a presença de fatores que determinam a progressão das lesões cardíacas através de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *T.cruzi* e testes para quantificar as células B e suas populações, além de testes genéticos que serão realizados com uma amostra de DNA (material genético que fornece as características individuais de cada ser humano, animal e vegetal) extraído nesta coleta. É do meu conhecimento que todos os materiais usados para a coleta de sangue são descartáveis.
- c) Sabemos que a ciência avança e se deste estudo, houver novas perguntas e novas abordagens, que necessitem utilizar o mesmo material coletado, este poderá ser utilizado em projetos futuros relacionados às infecções pelo *Trypanosoma cruzi*.
- d) Minha identificação será mantida em sigilo por todos os participantes.

2. Tempo

Para participar desta pesquisa terei que receber informações sobre o assunto, ler e assinar este Termo de Consentimento, além de colher a amostra de sangue.

3. Local do Estudo

Todo o acompanhamento clínico será realizado no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), sob a responsabilidade de seu médico, e o estudo do material obtido será feito no Laboratório de Imunologia e Imunogenética também do INI, Fiocruz.

4. Riscos/Desconfortos

- a. A coleta de sangue normalmente não causa problemas locais. Às vezes pode ficar um pouco arroxado, mas isto desaparece em poucos dias.
- b. Os exames cardíacos fazem parte do acompanhamento clínico e não terão nenhuma alteração, caso eu decida **de** participar desta pesquisa.

5. Tratamento e compensação por danos

Não há risco de qualquer problema para a minha saúde pelo fato de coletar sangue. Como não há tratamento específico para a doença de Chagas, todos os sintomas cardíacos e outros que por ventura **aconteçam** durante meu tratamento, serão tratados pelos médicos responsáveis.

6. Alternativas

Se eu decidisse não participar desta pesquisa o tratamento médico a que eu tenho direito não seria prejudicado. A necessidade de fazer os exames cardíacos e de sangue ou tratamentos para outras causas, seria a mesma e o tempo de acompanhamento também seria o mesmo.

7. Resultados dos Testes

Os resultados dos testes de sangue (hemograma, bioquímica e sorologia para o *Trypanosoma cruzi* e os exames no coração serão fornecidos somente para mim pelo médico na próxima consulta. Nesta consulta, assim como na de hoje, posso fazer todas as perguntas sobre as dúvidas que tenho sobre a doença de Chagas.

8. Custo para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia de dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais serão cobertos pelo estudo.

9. Confidencialidade dos dados

Sei que todas as minhas informações são confidenciais e constarão de meu prontuário. Somente os Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida, Alejandro Hasslocher-Moreno e Marcel Holanda, e seus assistentes terão acesso a estas informações. As informações obtidas nesta pesquisa poderão ser discutidas com pesquisadores de outras Instituições, mas nenhuma identificação minha será fornecida.

Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo.

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário.

Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida, sobre sua participação deste estudo, favos telefonar para 3865 9531 ou 3865 9644 (Dra. Maria da Glória, Dr Alejandro Hasslocher e Dr Marcelo Holanda)

Posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do INI/Fiocruz para sanar quaisquer dúvidas, em horário comercial no telefone 3865-**9107/ 9567 / 9585**

Local e data:_____

Nome do voluntário:_____

Endereço:_____

Cidade:_____ Estado:_____

Telefone:_____

Data de Nascimento:_____ Idade:_____

Assinatura:_____

Campo para obtenção de impressão digita, caso o (a) voluntário (a) não se sinta apto (a) a assinar o TCL

Nome da testemunha:_____

Assinatura:_____

Nome de alguma pessoa em que possa ser conectada, caso o(a) Sr (a) não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome:_____

Endereço:_____

Recebi informações sobre a manutenção da amostra biológica mantida sob guarda do Laboratório de Imunologia do INI e aceito que esta(s) seja(m) utilizadas em estudos futuros, desde que sejam informados ao CEP/INI/Fiocruz.

Assinatura:_____