



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

ADRIENE SIQUEIRA DE MELO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA
EVOLUÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PORTADORES DE DOENÇA
DE CHAGAS CRÔNICA

RECIFE

2016

ADRIENE SIQUEIRA DE MELO

*AVALIAÇÃO DO PAPEL DE QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA
EVOLUÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PORTADORES DE DOENÇA
DE CHAGAS CRÔNICA*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Medicina Tropical.

Orientadora: *Prof^a.Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa*

Co-orientadora: *Prof^a.Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena*

RECIFE

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

M428a Melo, Adriene Siqueira de.
 Avaliação do papel de quimiocinas e seus receptores na evolução das
 manifestações clínicas em portadores de doenças de chagas crônica /
 Adriene Siqueira de Melo. – 2016.
 146 f.: il. ; 30 cm.

 Orientadora: Viadia Maria Assis Costa.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Doenças de Chagas. 2. Cardiomiopatias. 3. Quimiocinas. 4.
 Receptores de Quimiocinas. I. Costa, Viadia Maria Assis (Orientadora). II.
 Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-147)

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 18 DE FEVEREIRO DE 2016.**

Aos 18 (dezoito) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 09:00 horas, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “Avaliação do papel de quimiocinas e seus receptores na evolução das manifestações clínicas em portadores de doença de Chagas crônica” da aluna **Adriene Siqueira de Melo**, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa e coorientação da Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena. A doutoranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTORA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.003507/2016-11 em 27/01/2016, composta pelos Membros Doutores: Vláudia Maria Assis Costa (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Valdênia Maria Oliveira de Souza, do Departamento de Farmácia da UFPE; Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, do Centro Acadêmico de Vitória da UFPE; Patrícia d’Emery Alves Santos, do Departamento de Imunologia da UFPE; e Clarice Neuenschwander Lins de Moraes Fonseca, do Departamento de Virologia do CPqAM/FIOCRUZ. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção (Aprovada/Reprovada/Em exigência) **APROVADA** da referida Tese. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 18/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Profa. Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos

Profa. Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Aos portadores da doença de Chagas.
*Ao meu esposo **Túlio** e ao meu filho **Caio**.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais e minha irmã, pelo amor e carinho, pela amizade e companheirismo, pela união e cumplicidade, por todos os dias de convívio em nossas vidas.

Ao meu esposo Túlio, pelo amor, carinho, incentivo, paciência e companheirismo. Que Deus continue abençoando nossa união.

Ao meu filho Caio, presente de Deus na minha vida, pois sem ele minha existência não teria sentido.

Às minhas orientadoras, por terem acreditado em mim, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos e sugestões que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À todos os amigos da pós-graduação (PPGMEDTROP) e do laboratório de Imunoparasitologia (Aggeu Magalhães), que estiveram presentes nesta caminhada, tornando meus dias de aula e trabalho mais prazerosos e descontraídos.

À todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o bom andamento e conclusão deste trabalho.

MELO, Adriene Siqueira de. **Avaliação do papel de quimiocinas e seus receptores na evolução das manifestações clínicas em portadores de doença de Chagas crônica.** 2016. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

RESUMO

Por contribuírem nos processos de migração diferencial de células imunes aos tecidos, quimiocinas e seus receptores estão potencialmente implicados na manutenção do infiltrado inflamatório observado na miocardiopatia chagásica crônica. Assim, avaliamos em pacientes com doença de Chagas crônica a associação da produção de quimiocinas e da expressão fenotípica para receptores de quimiocinas por células T CD4+, CD8+ e CD4+CD8+, com a presença e gravidade da manifestação cardíaca. Cinquenta e seis pacientes (Forma indeterminada, IND=20; Forma cardíaca leve, CARD1=20 e Forma cardíaca severa, CARD2=16), foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco/Universidade de Pernambuco. O sangue foi cultivado (1dia/37°C/5%CO₂) na presença de Antígeno Solúvel de Epimastigota (25µg/mL), de Fitohemaglutinina (5µg/mL) e mantendo-se um tubo sem estímulo. O sobrenadante e as células sanguíneas foram analisados por citometria de fluxo e as diferenças consideradas quando $p < 0,05$. O grupo CARD2 apresentou maiores níveis de células T CD8+CCR1+, CD8+CCR3+, CD4+CD8+CCR1+, CD4+CD8+CCR3+, de Intensidade média de fluorescência (MIF) para CCR1 e CCR3, e de produção de CCL5 e CXCL8 que o grupo IND, além de maior produção para CXCL10 que o CARD1. O grupo CARD1 apresentou maiores níveis para células T CD4+CXCR5+, CD4+CCR4+, de MIF para CXCR5 e de produção de CXCL8 que os pacientes IND. É possível que as células e quimiocinas diferencialmente observadas nos indivíduos com a manifestação cardíaca estejam atuando por mecanismos de citotoxicidade, oriundos tanto da resposta imune específica ao parasita quanto de possíveis processos autoimunes, para o estabelecimento dos danos tissulares e sintomatologia clínica nestes pacientes.

Palavras-chave: doença de Chagas. cardiomiopatia. quimiocinas. receptores de quimiocinas.

MELO, Adriene Siqueira de. **Evaluation of chemokines and their receptors in the evolution of clinical manifestations in patients with chronic Chagas disease.** 2016. Thesis (doctorate degree in Tropical Medicine) – Postgraduate Program in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, 2016.

ABSTRACT

Contributing to differential migration of immune cells to tissues, chemokines and their receptors are potentially involved in the maintenance of inflammatory infiltrate observed in chronic Chagas' cardiomyopathy. We evaluated in chronic Chagas' disease patients the association of chemokine production and phenotypic expression of chemokine receptors by CD4+, CD8+ and CD4+ CD8+ T cells with the presence and severity of heart involvement. Fifty-six patients (indeterminate form, IND = 20; mild heart shape, CARD1 = 20; and severe heart shape, CARD2 = 16) were selected at Ambulatório de Doença de Chagas, Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco/Universidade de Pernambuco. The blood was cultured (1day / 37°C/5% CO₂) in the presence of epimastigote antigen (25 µg / ml), Phytohaemagglutinin (5µg / ml) and an unstimulated culture was also performed. The supernatant and the blood cells were analyzed by flow cytometry and the differences were considered when $p < 0.05$. The CARD2 group had higher levels of CD8+CCR1, CD8+CCR3+, CD4+CD8+CCR1+ and CD4+CD8+CCR3+ T cells; higher mean intensity of fluorescence (MIF) to CCR1 and CCR3, and higher production of CCL5 and CXCL8 than IND. Furthermore, CARD2 had increased production of CXCL10 than CARD1. The CARD1 group showed higher levels of CD4+CXCR5+ and CD4+CCR4+ T cells, higher MIF for CXCR5 and higher production to CXCL8 than IND. It is possible that cells and chemokines found in such individuals presenting cardiac involvement, are contributing to cytotoxicity mechanisms raised by the specific immune response to the parasite or the possible autoimmunity, in establishing of cardiac tissue injuries with clinical manifestation.

Keywords: Chagas disease. cardiomyopathy. chemokines. chemokine receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 1	Expressão (%) para CD4+CXCR5+ (A), CD4+CCR4+ (B) e intensidade média de fluorescência (MIF) para CXCR5 (C-D), após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas.....	57
Figura 1	Expressão (%) para CCR1 (A) e CCR3 (B) em células T CD4+CD8+, após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas.....	80
Figura 2	Formas clínicas da doença de Chagas.....	23
Figura 2	Expressão fenotípica para células T CD8+CCR1+ (A) e T CD8+CCR3+ (B); e intensidade de fluorescência (MIF) para CCR1 e CCR3 (C-D), após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas.....	58
Figura 3	Modelo esquemático de mecanismo de imunopatogênese da doença de Chagas crônica.....	29
Figura 3	Produção em sobrenadante de cultura (pg/mL) para CXCL10, após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) (A) e sem estimulação antigênica (SE) (B), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas.....	59
Figura 4	Mecanismo proposto de atuação de quimiocinas na doença de Chagas experimental.....	34
Figura 5	Anticorpos utilizados na imunofenotipagem.....	45
Figura 6	Exemplo de aquisição demonstrando os parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC).....	45
Figura 7	Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4+ no citômetro de fluxo.....	46
Figura 8	Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD8+ no citômetro de fluxo.....	46
Figura 9	Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4+CD8+ no citômetro	47

	<i>de fluxo.....</i>	
<i>Figura 10</i>	<i>Exemplo de histograma para análise de intensidade média de fluorescência (MIF).....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 11</i>	<i>Exemplo de aquisição de beads para quimiocinas.....</i>	<i>49</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i>	<i>Principais estudos acerca do papel de quimiocinas e seus receptores na doença de Chagas.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 1</i>	<i>Elevada produção de quimiocinas em sobrenadante de cultura celular por portadores de doença de Chagas crônica baseado no cut-off (média global) com ou sem estimulação por EPI.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 1</i>	<i>Elevada expressão para receptores de quimiocinas na superfície de células T CD4+CD8+ por portadores de doença de Chagas crônica baseado no cut-off (média global) com ou sem estimulação por EPI.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 2</i>	<i>Operacionalização e categorização das variáveis dependentes..</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 3</i>	<i>Operacionalização e categorização das variáveis independentes.....</i>	<i>42</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	<i>Alexa Fluor</i>
AMP_C	<i>Adenosina monofosfato cíclico</i>
ANVISA	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
AR	<i>Artrite reumatoide</i>
BCL	<i>Proteína de linfoma de célula B</i>
BTLA	<i>Atenuante de células B e T</i>
CARD	<i>Forma clínica cardíaca</i>
CARD1	<i>Forma clínica cardíaca grau leve</i>
CARD2	<i>Forma clínica cardíaca grau severo</i>
CBA	<i>Arranjo de esferas por citometria</i>
CCL	<i>Ligante de quimiocina C-C</i>
CCR	<i>Receptor de quimiocina C-C</i>
CRTH	<i>Homólogo de receptor quimioatraente, expresso em células Th2</i>
CXCL	<i>Ligante de quimiocina C-X-C</i>
CXCR	<i>Receptor de quimiocina C-X-C</i>
CD	<i>Grupo de diferenciação</i>
CO₂	<i>Dióxido de carbono</i>
CPqAM	<i>Centro de Pesquisa Aggeu magalhães</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
EA	<i>Espondilite anquilosante</i>
ECG	<i>Eletrocardiograma</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
ELISA	<i>Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima</i>
EPI	<i>Antígeno Solúvel de epimastigota</i>
FITC	<i>Isotiocianato de fluoresceína</i>
FL	<i>Canal para detecção de fluorescência</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Canal de dispersão frontal</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GPI	<i>Glicofosfatidilinositol</i>
HPRT	<i>Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase</i>

IC	<i>Insuficiência Cardíaca</i>
ICOS	<i>Coestimulador indutível de célula T</i>
iNOS	<i>Isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase</i>
IFN-γ	<i>Interferon gama</i>
Ig	<i>Imunoglobulina</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IND	<i>Forma clínica indeterminada</i>
IP3	<i>Inositol trifosfato</i>
IP-	<i>Proteína indutível por IFN-γ</i>
LES	<i>Lúpus eritematoso sistêmico</i>
LIT	<i>Meio de cultura Liver Infusion Triptose</i>
MCP	<i>Proteína quimioatraente de monócitos</i>
Met-RANTES	<i>Antagonista funcional de RANTES</i>
MHC	<i>Complexo maior de histocompatibilidade</i>
MIF	<i>Intensidade Média de Fluorescência</i>
MIG	<i>Monocina indutível por IFN-γ</i>
MIP1-α	<i>Proteína inflamatória de macrófagos 1-alpha</i>
MIP1-β	<i>Proteína inflamatória de macrófagos 1-beta</i>
NKT	<i>Células T Natural Killer</i>
NPT	<i>Núcleo de Plataformas Tecnológicas</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
OX	<i>Receptores e ligantes pertencentes à superfamília do TNF</i>
PBMC	<i>Células Mononucleares do Sangue Periférico</i>
PBS	<i>Solução Salina tamponada com fosfato</i>
PE	<i>Ficoeritrina</i>
PercP	<i>Proteína Clorofila Peridininina</i>
PHA	<i>Fito hemaglutinina</i>
PROCAPE	<i>Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco</i>
RANTES	<i>Molécula Regulada por ativação, segregada e expressa em célula T</i>
RPMI	<i>Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute</i>
RX	<i>Exame de Raio X</i>
SSC	<i>Canal de dispersão lateral</i>
T DP	<i>Célula T duplo-positiva</i>

TGF-β	<i>Fator de crescimento e transformação beta</i>
TFh	<i>Linfócito T auxiliar folicular</i>
TFr	<i>Linfócitos T reguladores foliculares</i>
Th1	<i>Linfócito T auxiliar do tipo 1</i>
Th2	<i>Linfócito T auxiliar do tipo 2</i>
TNF	<i>Fator de Necrose Tumoral</i>
UPE	<i>Universidade de Pernambuco</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Epidemiologia.....	18
2.2	Aspectos clínicos e laboratoriais.....	20
2.3	Aspectos imunopatológicos.....	24
2.3.1	<u>Resposta imune humoral</u>	25
2.3.2	<u>Resposta imune celular</u>	26
2.3.2.1	O papel das quimiocinas e seus receptores.....	29
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Tipo de estudo.....	38
4.2	População da pesquisa.....	38
4.3	Amostragem.....	40
4.4	Operacionalização e categorização das variáveis.....	40
4.5	Antígeno solúvel de epimastigota.....	42
4.6	Coleta e cultura de sangue periférico.....	43
4.7	Imunofenotipagem.....	43
4.8	Aquisição e análise por citometria de fluxo.....	44
4.9	Deteção de quimiocinas em sobrenadante de cultura.....	47
4.10	Aquisição e análise das Beads de quimiocinas por citometria de fluxo.....	48
4.11	Análise estatística.....	48
4.12	Considerações éticas.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Produção de quimiocinas e expressão de seus receptores em linfócitos T por portadores crônicos da doença de Chagas.....	50
5.2	Expressão diferencial de receptores para quimiocinas por linfócitos T CD4+CD8+ duplo-positivos em portadores crônicos da doença de Chagas.....	72

6	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS	93
	APENDICE A- Artigo 1.....	102
	APENDICE B- Artigo 2.....	124
	ANEXO A- Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	144
	ANEXO B- Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	146

1 INTRODUÇÃO

A cardiopatia observada em portadores de doença de Chagas crônica apresenta alta gravidade e pior prognóstico que cardiopatias de outras etiologias. Seu mecanismo de desenvolvimento ainda não se encontra completamente explorado e esclarecido. Em achados histopatológicos de tecido cardíaco tem sido observado um processo inflamatório exacerbado com infiltrado leucocitário mononuclear e escassez de parasitas. Assim, a identificação de moléculas envolvidas no controle e/ou manutenção desta inflamação tecidual, que não alterem a resposta imune específica ao parasita, seriam alvos eficazes para o tratamento de pacientes cardiopatas, bem como para o monitoramento da progressão da doença em pacientes assintomáticos (LANNES-VIEIRA et al., 2009).

Quimiocinas e seus receptores são importantes mediadores da resposta imunológica e possuem papel chave nos processos de permeabilidade vascular, atração, migração e ativação de células imunes, representando importantes alvos de estudos em doenças inflamatórias. Avaliações acerca da produção de quimiocinas em tecido cardíaco de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, observaram altos níveis de CXCL9, CXCL10 e CCL5 concomitante ao aumento do infiltrado de células TCD8⁺ ativadas (DOS SANTOS et al., 2001). Em animais knockout para IFN- γ , foram encontrados baixos níveis de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 e significativa redução do infiltrado leucocitário (ALIBERTI et al., 2001). Resultados semelhantes também foram observados em camundongos knockout para CCR5 (MACHADO et al., 2005), bem como em animais tratados com o inibidor para CCR5 (met-Rantes) (MARINO et al., 2005). Demonstrando, o envolvimento destas quimiocinas no desenvolvimento do processo inflamatório no tecido cardíaco nestes animais e a modulação de sua expressão por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ .

Por outro lado, em estudo conduzido por Petray et al. (2002) ao ser realizada a neutralização de CCL3/MIP-1 α , apesar de ser observada uma diminuição do infiltrado macrofágico no baço dos animais, observou-se um aumento da inflamação em seu tecido cardíaco concomitante a uma elevação nos níveis de parasitas teciduais. Assim, juntos, estes resultados demonstram uma complexa interação onde quimiocinas específicas podem estar exercendo distintos papéis na patofisiologia da doença.

Estudos em humanos, ainda são escassos e a expressão e o papel do sistema de quimiocinas não foram estudados com muito detalhe. Estudos observaram maiores níveis para co-expressão de receptores de quimiocinas e citocinas de perfil inflamatório (TH1) CCR5- IFN- γ , CXCR3-IFN- γ , e CXCR3-TNF- α em portadores de doença cardíaca em comparação aos assintomáticos, por outro lado, os indivíduos assintomáticos apresentaram maiores níveis de co-expressão para receptores e citocinas do perfil imunomodulatório (TH2) CCR3-IL-10 e CCR3-IL-4 (GOMES et al., 2005). Indicando que os receptores para quimiocinas podem estar envolvidos no desenvolvimento precoce da cardiomiopatia chagásica.

Por outro lado, Talvani et al. (2004) observaram uma maior expressão dos receptores CCR5 e CXCR4 por células CD4+, CD8+ e CD14+ de pacientes com disfunção cardíaca leve em relação àqueles com disfunção cardíaca grave e não puderam afirmar se este achado foi devido à uma resposta imune eficaz em controlar o parasita por parte dos pacientes com disfunção leve, já que na fase aguda esses receptores estão envolvidos no controle parasitário, ou se a disfunção acentuada no tecido cardíaco induziu a um esgotamento da resposta imunológica em pacientes com cardiopatia grave.

Assim, com base no que foi exposto, a avaliação da produção de quimiocinas e seus receptores, por células da resposta imunológica em portadores de doença de Chagas crônica cardíaca e assintomática, deve ser continuada e pode representar um caminho promissor para o melhor entendimento das manifestações clínicas observadas nesta imunopatologia, o que é imprescindível ao desenvolvimento de alvos terapêuticos e à identificação de marcadores imunológicos de fase crônica da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Conhecida também por tripanossomíase americana, a doença de Chagas foi assim nomeada por ter sido descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (1879-1934), que ao se encontrar no interior de Minas Gerais em abril de 1909 para combater uma epidemia de malária que paralisava as obras da Estrada de Ferro Central do Brasil, comunicou ao mundo científico a existência de uma nova doença humana. Chagas também identificou o agente causal da doença (o protozoário hemoflagelado que denominou de Trypanosoma cruzi, em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz), o inseto vetor (triatomíneo conhecido como “barbeiro”), assim como o ciclo biológico e os principais reservatórios do parasita (CARNEIRO, 1963).

Na natureza mais de 150 espécies de mamíferos silvestres e domésticos, constituem reservatórios para o parasita causador. O homem é considerado um hospedeiro acidental do T. cruzi, pois ao invadir ambientes nos quais o parasita vivia em seu ciclo silvestre, tornou-se susceptível a ação dos triatomíneos vetores e foi incluído no ciclo evolutivo do protozoário (Figura 1). Assim, a transmissão clássica da doença ocorre pelo contato da pele lesionada de indivíduos susceptíveis com tripomastigotas metacíclicos de T. cruzi presentes em excretas de triatomíneos vetores contaminados. A doença ainda possui outras formas de transmissão como as vias transfusional, congênita e oral, além de também pode ser transmitida por transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

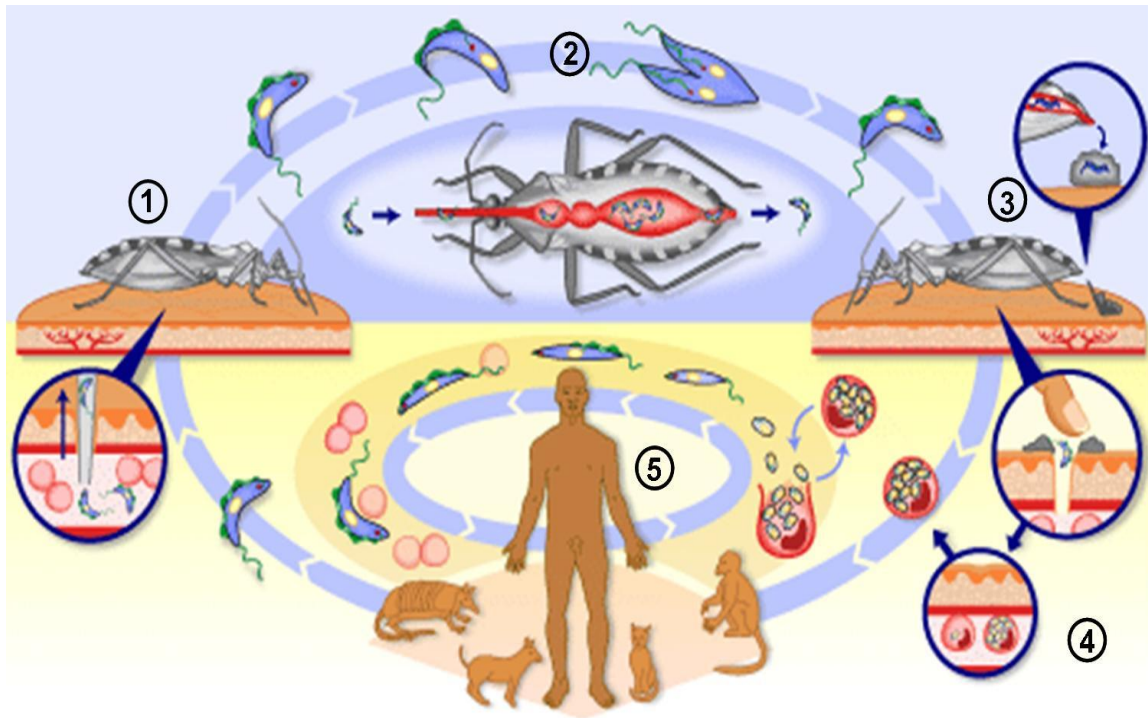


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. 1. O triatomíneo, durante sua alimentação, ingere formas tripomastigotas sanguíneas presentes no sangue. 2. No intestino médio há o aparecimento da forma epimastigota, onde ocorre intensa multiplicação. Já no intestino posterior, ocorre a forma tripomastigota metacíclica. 3. Durante o repasto, o inseto deixa fezes no local, contendo tripomastigotas metacíclicos. 4. Através da mucosa ou pele lesionada o *T. cruzi* tem contato com células, das quais ele alcança o interior. 5. No meio intracelular, há nova metamorfose, na qual o parasita assume a forma amastigota. Após multiplicação binária, ocorre a lise celular, na qual há a liberação de tripomastigotas sanguíneos. Estes são capazes de infectar outras células do mesmo hospedeiro ou outro triatomíneo, fechando-se o ciclo. Fonte: www.who.int

2.1 Epidemiologia

Mesmo após cem anos de sua descoberta, a doença ainda representa um grave problema de saúde pública e encontra-se distribuída por toda a América Latina, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile, onde possui prevalência estimada em 6-7 milhões de casos e elevado risco de infecção (75-90 milhões de pessoas) (COURA; DIAS, 2009; RASSI; RASSI JR, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Nesta região, as maiores prevalências da doença têm sido reportadas na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%). Além disso, em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai a transmissão congênita ocorre em cerca de 5% das gestações de mulheres cronicamente infectadas e em até 2% na maioria dos

outros países endêmicos (RASSI; RASSI JR; REZENDE, 2012).

Contudo, mesmo apresentando elevado impacto social, o cenário epidemiológico observado hoje para a doença de Chagas, pouco representa o que se encontrava nas décadas de 60-80 para a maioria das regiões endêmicas. Historicamente a transmissão e morbidade da doença estiveram relacionadas às pobres condições de moradias observadas em áreas rurais e as infecções agudas ocorriam comumente em menores de 12 anos (DIAS, 2007). Todavia, no início dos anos de 1980 ocorreram grandes iniciativas voltadas para o controle da transmissão vetorial, triagem efetiva nos bancos de sangue e educação preventiva de população sob-risco (OSTERMAYER, et al., 2011). Todos esses esforços repercutiram positivamente na diminuição dos índices de incidência e prevalência da doença.

Após o início do programa de maior impacto - a Iniciativa do Cone Sul (Uruguai, Paraguai, Bolívia, Brasil, Chile e Argentina) em 1991, países como Uruguai, Chile e Brasil foram certificados por estarem livres da transmissão pela principal espécie domiciliada do vetor (*Triatoma infestans*), e na maioria desses países foi obtida uma cobertura sorológica de 100% nos bancos de sangue (RASSI; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Assim, para que estas conquistas no controle da doença permaneçam, se faz necessária a manutenção de uma contínua vigilância epidemiologia e entomológica, o que representa um dos maiores enfrentamentos atuais da doença. Neste contexto, tem sido observado que a doença de Chagas vem ressurgindo onde o controle tinha sido bem sucedido, em regiões como o Chaco na Argentina e Bolívia, pois nestas, além de ter ocorrido uma diminuição das atividades de controle, existem extensas populações peridomésticas dos principais vetores e vêm surgindo algumas espécies resistentes aos inseticidas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008). Além disso, a doença de Chagas tem surgido também em regiões como a região da bacia amazônica, área livre de infestação por insetos vetores domiciliados, onde o parasita é mantido principalmente por vetores silvestres, esta região têm sido foco de micro-epidemias locais da transmissão oral da doença (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

Outro desafio também muito atual se refere à intensa migração populacional de indivíduos cronicamente infectados para os grandes centros urbanos de regiões/países não endêmicos como os Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália

e Japão, o que tem tornando a doença um problema de preocupação global. Como nestas regiões o conhecimento ou experiência da doença são limitados e as medidas de vigilância e de controle são insuficientes, a transmissão por transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e por via congênita frequentemente constituem as principais causas de infecção (RASSI; RASSI JR; MARIN-NETO, 2010).

Desta forma, para enfrentar estes novos desafios epidemiológicos da doença, esforços devem ser focados no sentido de evitar a redução do interesse político e de investimento de recursos, a fim de garantir que as conquistas no controle e vigilância da doença de Chagas sejam mantidas nas áreas onde foi obtida, e expandidas às áreas de baixa endemicidade.

2.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

Clinicamente, a doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda seguida de evolução para uma fase crônica. A fase aguda, que pode durar de um a três meses após a infecção, é caracterizada por uma intensa parasitemia. Esta fase pode ser sintomática ou assintomática e inicia-se após o período de incubação que varia de quatro a dez dias quando a transmissão é vetorial (CHAGAS, 1916).

Geralmente, quando sintomático, o indivíduo na fase aguda pode apresentar febre, mal-estar, anorexia e cefaléia. Os sinais de porta de entrada do parasito (sinal de Romaña e chagoma de inoculação) e manifestações sistêmicas (hepatomegalia, esplenomegalia, edema, alterações nervosas, comprometimento cardíaco) também podem estar presentes (HUGGINS, 1996). Porém, na maioria dos indivíduos, a fase aguda é imperceptível devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas. A fase crônica da doença inicia-se cerca de dois a quatro meses após o final da fase aguda. Este período é marcado pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados níveis de anticorpos.

Estudos realizados em zona endêmica mostram que cerca de 20-30% dos indivíduos infectados desenvolvem, na fase crônica, a cardiomiopatia chagásica, que representa a maior causa de falência congestiva do coração na América Latina,

acometendo mais de 3 milhões de pessoas (PETHERICK, 2010). Outros 8-10% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma digestiva, 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 do cólon. Contudo, a maioria dos pacientes (50-60%) pode permanecer por um longo período de latência clínica, denominado de forma indeterminada, caracterizada pela ausência sintomatologia relacionada com o coração e o sistema digestivo, apresentando apenas a sorologia positiva para a infecção (SIQUEIRA-BATISTA, et al., 2007).

Os portadores da forma indeterminada podem permanecer com ausência de sintomas por toda a extensão de suas vidas ou podem iniciar uma lenta e gradativa progressão para as formas sintomáticas (Figura 2). Assim, esta fase indeterminada da doença, sempre despertou grande interesse médico e científico, pois se acredita que é durante este período clínico que é determinada a evolução para as demais formas clínicas crônicas. Desta forma, a elucidação do mecanismo pelo qual ocorre esta evolução clínica, representa um grande desafio científico e poderia fornecer novos alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico, que auxiliassem a comunidade médica em sua conduta medicamentosa e manejo dos pacientes.

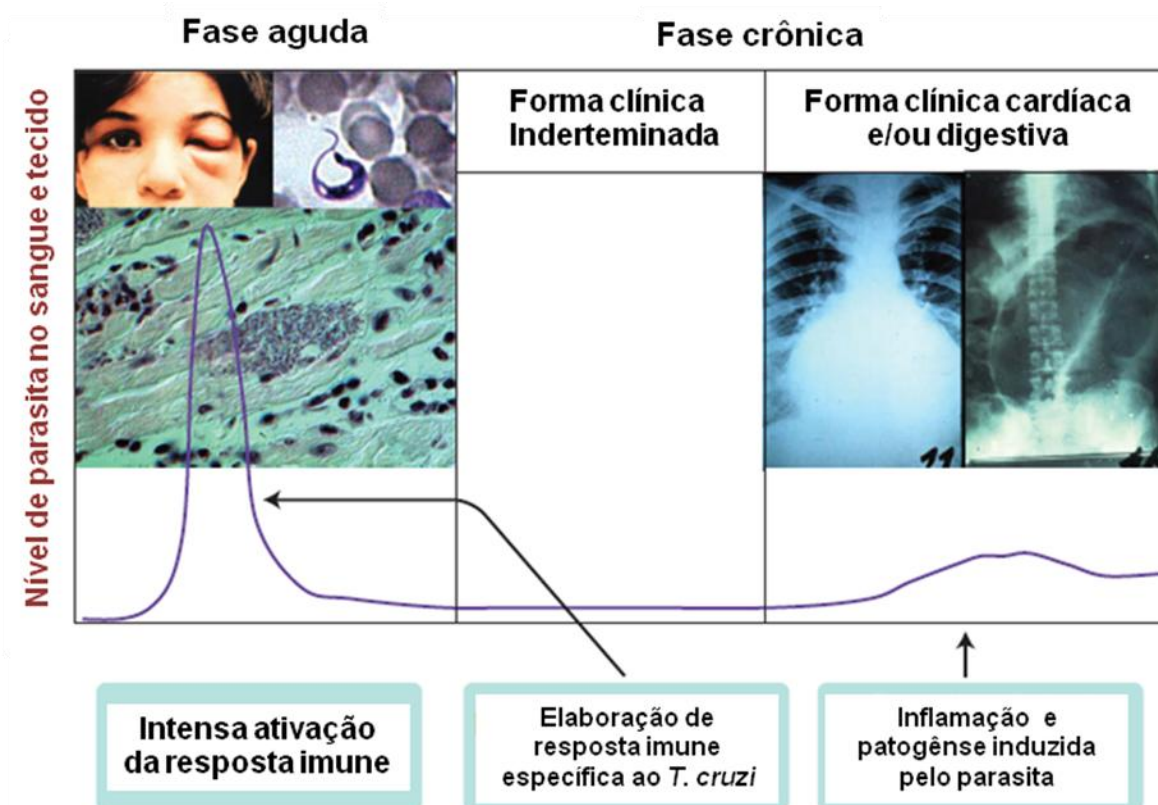


Figura 2. Formas clínicas da doença de Chagas. Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA et al., 2010.

Para a determinação das formas clínicas crônicas e sua gravidade, os exames de eletrocardiograma, ecocardiograma e as radiografias do tórax e do abdômen são realizados. Contudo, esses métodos, além de terem uma sensibilidade limitada, só detectam as formas moderadas e graves, sem detectar as alterações primárias da doença, além de não fornecerem seu prognóstico (OLIVEIRA JR et al., 1996). Desta forma, devido à elevada prevalência e morbidade da doença, o desenvolvimento de pesquisas que visem à identificação de marcadores de evolução clínica é de grande importância, no sentido de melhor tratar muitos indivíduos que já apresentam os graves acometimentos clínicos, mas que carecem de um tratamento específico, e no sentido de poder realizar um melhor acompanhamento daqueles que ainda permanecem assintomáticos, contudo sem prognóstico precoce.

Com relação ao diagnóstico etiológico, na fase aguda da infecção, este pode ser facilmente realizado utilizando-se métodos parasitológicos convencionais diretos (esfregaços, gota espessa, exame a fresco e método de Strout) ou indiretos

(xenodiagnóstico e hemocultura). Na fase crônica, devido a uma baixa parasitemia o diagnóstico laboratorial é realizado preferentemente empregando métodos sorológicos (GOMES, 1997).

Os métodos sorológicos atualmente mais empregados para o diagnóstico da infecção crônica da doença de Chagas bem como para triagem de doadores em bancos de sangue são a hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Segundo a Organização Mundial da Saúde, para um diagnóstico sorológico confiável é necessário obter resultados concordantes em pelo menos dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes (BRASIL, 2005). Porém, na triagem da doença de Chagas em bancos de sangue é recomendada a utilização de apenas um teste sorológico, sendo este um ELISA de alta sensibilidade (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2004). Neste contexto, é importante ressaltar que apesar do diagnóstico laboratorial de fase crônica encontrar-se bem consolidado, o desenvolvimento de kits de fase aguda e testes que possam avaliar a cura pós tratamento etiológico, ainda representa um grande desafio.

Com relação à terapêutica utilizada na doença de Chagas, esta é feita basicamente pelo uso de um dos medicamentos: o nifurtimox ou o benzonidazol que, além de serem parcialmente eficazes apenas na fase aguda (CANÇADO, 1985), devido ao potencial de cura parasitológica depender do tipo de cepa albergada, são muito tóxicos (ANDRADE; MAGALHÃES; PONTES, 1985).

Atualmente, um estudo randômico vem sendo realizado com indivíduos portadores de cardiopatia chagásica em diversos países, com o objetivo de avaliar a eficácia do tratamento com benzonidazol na fase crônica da doença (MARIN-NETO et al., 2008). Além disso, vêm sendo realizadas pesquisas que objetivam a identificação de novos fármacos para tratamento da fase crônica e com menores efeitos colaterais, como, por exemplo, o composto K777 que passou pelos testes pré-clínicos e se encontra pronto para entrar na fase clínica com um bom indicativo de chance de se tornar um novo fármaco antichagásico (SOUZA, 2014). Contudo, se faz necessário o desenvolvimento de posologias e formulações pediátricas, visto que este público alvo é o principal afetado pela transmissão vetorial em áreas de transmissão ativa e o que apresenta o melhor benefício com menor desenvolvimento

de efeitos colaterais.

Desta forma, de acordo com o que foi exposto, observamos que os enfrentamentos no campo da doença de Chagas ainda estão longe de ter um fim. Estes necessitam ser assumidos por grupos de pesquisa que possam atuar no melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese das diferentes formas clínicas observadas na fase crônica, e assim contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos e de marcadores de prognóstico; no desenvolvimento de kits sorológicos que possam ser empregados na fase aguda da doença; e no desenvolvimento de novas drogas para tratamento etiológico bem como o desenvolvimento de formulações pediátricas.

2.3 Aspectos imunopatológicos

A cardiopatia crônica observada em portadores de doença de Chagas apresenta alta gravidade e pior prognóstico que cardiopatias de outras etiologias, e diversas são as hipóteses postuladas na tentativa de melhor explicar o dano tissular cardíaco que é observado. Dentre estas, estão o envolvimento de processos de auto-imunidade (BONNEY;ENGMAN, 2008), genética do hospedeiro (DEL PUERTO et al., 2012), genética do parasita (RODRIGUES et al., 2010) e a resposta imune específica do hospedeiro elaborada ao parasita.

Achados histopatológicos têm evidenciado a ocorrência de infiltrado leucocitário mononuclear e escassez de parasitas, denotando o envolvimento de um processo inflamatório exacerbado na patofisiologia desta miocardite (LANNES-VIEIRA et al., 2009). Além disso, é proposto que indivíduos cardiopatas apesar de manterem uma resposta imune eficaz ao parasita não teriam a mesma capacidade imunorregulatória e/ou imunomodulatória que os indivíduos indeterminados, persistindo com um processo inflamatório acentuado com consequentes efeitos deletérios para o tecido (SATHLER-AVELAR et al., 2009). Desta forma, a identificação de moléculas envolvidas no controle e/ou manutenção desta inflamação, que não alterem a resposta imune específica ao parasita, seriam alvos eficazes para o tratamento de pacientes cardiopatas, bem como para o

monitoramento da progressão da doença em pacientes indeterminados.

2.3.1 Resposta imune humoral

Diversos estudos vem sendo realizados na tentativa de identificar uma resposta imune humoral que pudesse ser diferencial entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Neste sentido, já foram observados níveis mais elevados de anticorpos líticos no soro de pacientes indeterminados em relação aos indivíduos cardiopatas, sugerindo que este grupo de imunoglobulinas apresente papel protetor (KRETTLI; BRENER, 1982; MONTALVÃO, et al., 2010). Por outro lado, o estudo de outras classes de anticorpos, sugere sua participação na patogenia da doença, uma vez que foram encontrados anticorpos reativos contra diversas estruturas do hospedeiro em indivíduos chagásicos crônicos (GIRONES, et al., 2005; LEVITUS, et al., 1991).

*Além disso, já foi demonstrado que a presença de anticorpos IgA específicos às formas amastigota ou epimastigotas do parasita pode está relacionada com o desenvolvimento da forma clínica crônica digestiva (PRIMAVERA, et al. 1988, 1990, MORGAN, et al., 1996), e maiores níveis de IgM também já foram encontrados em pacientes cardíacos em comparação com pacientes indeterminados, associando este resultado à hipótese da autoimunidade na doença de Chagas (MORGAN et al., 1996). O monitoramento da resposta imune humoral de pacientes com a forma cardíaca foi realizado por Zauza e Borges-Pereira (2001) durante 10 anos. Por meio deste estudo, os autores verificaram que o agravamento da cardiopatia nesse grupo de pacientes apresentou uma correlação positiva com o aumento dos títulos de IgG total para antígenos complexos de *T. cruzi*. Desta forma, os autores afirmaram que a intensidade da resposta imune humoral, representada por essas imunoglobulinas, esteve diretamente associada à evolução clínica da cardiopatia chagásica crônica.*

Assim, estes estudos demonstram a importância que o conhecimento acerca do papel das imunoglobulinas possui no desenvolvimento da imunopatologia da doença de Chagas.

2.3.2 Resposta imune celular

Com relação à resposta celular, trabalhos pioneiros mostraram que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes indeterminados ou cardíacos são capazes de proliferar quando expostas, *in vitro*, a antígenos do parasita e a componentes do hospedeiro (BARROS-MAZON et al, 2004; DUTRA et al., 1997; DUTRA et al, 2000). Além de proliferarem em resposta a esses estímulos, PBMC de pacientes chagásicos, especialmente células T CD4⁺ e monócitos, produziram uma grande quantidade de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (SOUZA et al., 2004). Assim, acredita-se que essas células sejam fundamentais em orquestrar a resposta imune nos pacientes chagásicos, influenciando a evolução clínica destes. Por isso, diversas investigações têm sido realizadas com o objetivo de se caracterizar, fenotípica e funcionalmente, diferentes populações celulares e assim compreender seu papel no estabelecimento de respostas protetoras ou patogênicas frente à infecção com *T. cruzi*.

Neste sentido, foi observado que uma frequência elevada de células T ativadas CD4⁺CD28⁻ no sangue periférico de pacientes chagásicos estaria associada com a expressão de TNF- α e IL-10 em pacientes das formas cardíaca e indeterminada, respectivamente, sugerindo papéis funcionais distintos para essas células (DUTRA et al., 1996; MENEZES et al., 2004). Já células T CD8⁺ ativadas com expressão de granzima A e TNF- α seriam predominantes no infiltrado inflamatório associado às lesões cardíacas da doença (REIS, 1993). Além disso, acredita-se que a produção local de citocinas como IL-15 e IL-7 contribua para a sobrevivência das células T CD8⁺ no tecido cardíaco (FONSECA et al., 2007). Um dado interessante é que células com fenótipo consistente com o de populações regulatórias, CD4⁺CD25^{high} e NKT (CD3⁺CD16⁻CD56⁺), foram encontradas no sangue periférico de indivíduos indeterminados, sugerindo que a falta de populações regulatórias em indivíduos sintomáticos poderia levar à exacerbação das atividades citotóxicas, culminando em dano tecidual (VITELLI-AVELAR et al., 2005).

Recentemente, a dosagem de citocinas em plasma de 176 portadores de doença de Chagas crônica evidenciou maiores níveis para IL-10 em pacientes indeterminados em comparação aos pacientes com cardiomiopatia dilatada, com

estes últimos em contrapartida, apresentaram elevados níveis para as citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL1- β (SOUSA et al., 2014). Neste sentido, autores já demonstraram uma clara associação entre a expressão de IFN- γ e a ocorrência de doença cardíaca grave, sugerindo, na fase crônica, uma relação entre a produção de IFN- γ e a morbidade da doença (CORREA-OLIVEIRA et al, 1999). Além disso, já foi mostrado que clones de células T derivadas do infiltrado inflamatório de pacientes chagásicos cardiopatas são excelentes produtores de IFN- γ (CUNHA-NETO et al, 2006).

Por outro lado, estudo conduzido por Bahia-Oliveira e colaboradores (2000) verificou que pacientes chagásicos tratados curados apresentavam uma maior produção de IFN- γ que os não curados, sugerindo um papel protetor para essa citocina no processo de cura associada ao tratamento químico. Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que o tratamento de pacientes indeterminados, no início da fase crônica, levou à produção de IFN- γ (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). Além disso, embora a produção de IL-10 seja correlacionada com o estabelecimento de um perfil modulatório em pacientes indeterminados da doença, esta citocina, de perfil anti-inflamatório, também foi produzida por PBMC de pacientes cardiopatas (SOUZA et al., 2004).

Assim, como podemos observar na Figura 3, crescentes evidências suportam a hipótese de que um fino balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas de distintas subpopulações de células T exerça um papel crucial em prevenir danos teciduais ao hospedeiro (DUTRA; GOLLOB, 2009; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

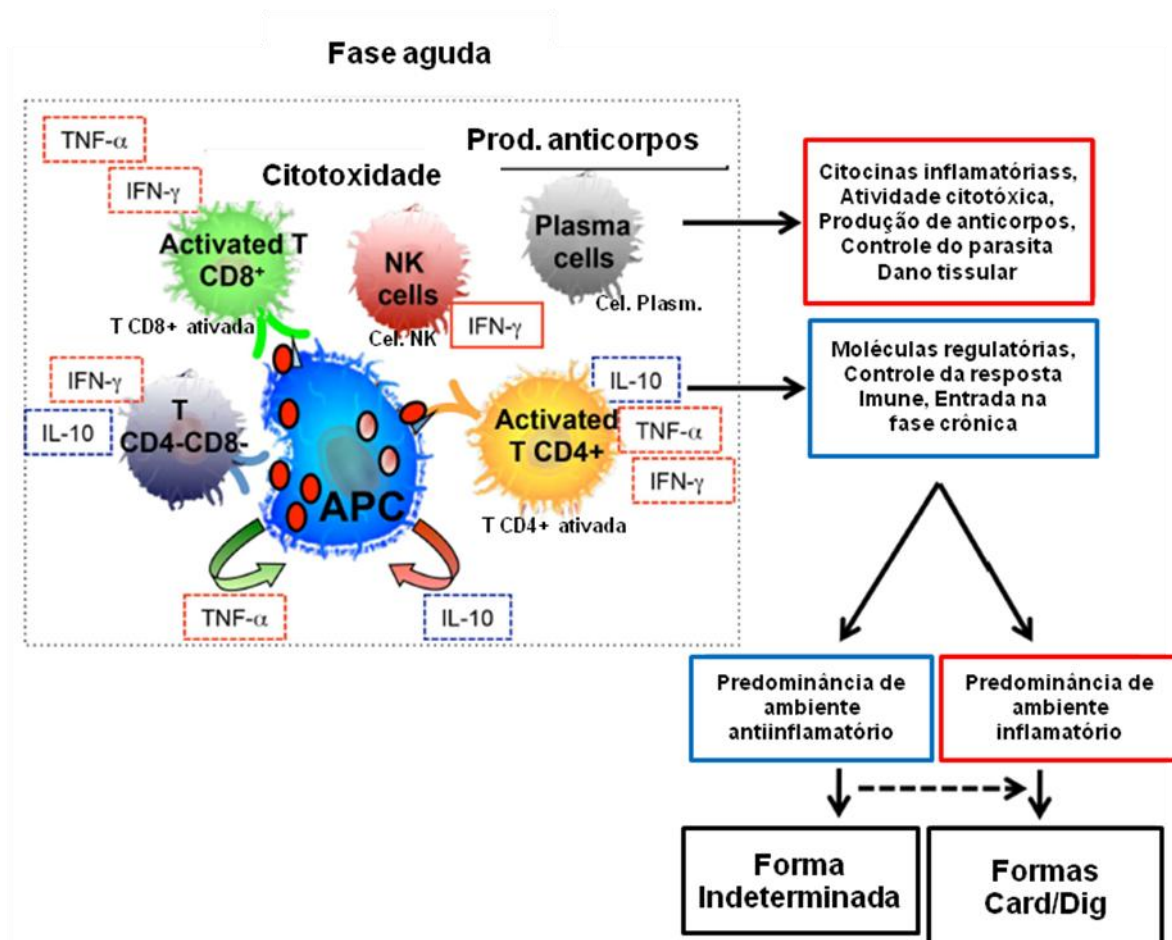


Figura 3. Modelo esquemático de mecanismo de imunopatogênese da doença de Chagas crônica. Na fase aguda da doença, ocorre a ativação de macrófagos e células Natural killer (NK) bem como a produção de anticorpos pelas células plasmáticas. Esses eventos levam ao controle dos níveis de parasitas, observado nos estágios finais desta fase e ao longo da fase crônica. A produção de citocinas por células NK e macrófagos ativam diversas subpopulações de células T, tais como CD4+ e CD8+. A produção de IL-10 e outras moléculas anti-inflamatórias por estes subtipos celulares pode contribuir para um controle da resposta imune, reduzindo os danos do tecido e permitindo que a doença progrida para a fase crônica apresentando uma forma assintomática (indeterminada). Por outro lado, a predominância de um ambiente inflamatório está associada à uma progressão para a fase crônica com estabelecimento das formas sintomáticas (cardíaca e digestiva). Fonte: Adaptado de ANDRADE; GOLLOB DUTRA. (2014).

Interessantemente, Laucela et al. (2004) demonstraram correlação inversa entre níveis de células T CD8+ produtoras de IFN-γ e gravidade da doença de Chagas. Este estudo, o qual analisou a resposta específica para peptídeos ou para lisado total de *T. cruzi*, em conjunto com os dados de maior resposta em pacientes residentes em área endêmica, sugere que células de memória produtoras de IFN-γ são cruciais para o controle da infecção e da progressão para formas sintomáticas graves. Além disso, um estudo em camundongos sugeriu que células regulatórias T CD4+CD25+ não teriam participação efetiva na imuno-regulação da resposta imune

anti-T. cruzi, visto que a depleção das mesmas não alterou o curso da infecção aguda ou crônica pelo parasito (MENEZES; TEIXEIRA; DUTRA, 2009).

Desta forma, embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos em relação à resposta imune de pacientes chagásicos, importantes aspectos ainda não foram esclarecidos. É possível que mecanismos imunológicos envolvidos na interação conjunta de células do sistema imune, além da susceptibilidade genética diferencial do hospedeiro, ocasionem uma patologia altamente complexa, impondo dificuldades para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias eficientes (DUTRA et al., 2009). Assim, considerando-se a complexidade das interações parasita-hospedeiro, é improvável que apenas um braço do sistema imunológico esteja associado à evolução da doença, sendo esta o resultado da interação dos diversos compartimentos do sistema imune que incluem, desde o direcionamento pela da imunidade inata, a interação entre as diversas células bem como sua função e o balanço da produção de mediadores como citocinas, quimiocinas e seus receptores.

2.3.2.1 O papel das quimiocinas e seus receptores

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-12 kDa) e com aproximadamente 70 a 80 aminoácidos de comprimento. São conhecidas cerca de 50 quimiocinas, todas possuem estruturas terciárias similares e são classificadas em quatro subfamílias (C, CC, CXC e CX₃C) de acordo com o número e espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína de sua extremidade N-terminal (GUERREIRO, et al., 2011). Além da divisão nestas quatro subfamílias, as quimiocinas podem também ser classificadas a nível funcional como homeostáticas ou inflamatórias, ou de forma menos usual, podem também ser representadas pelas letras do alfabeto grego α , β , γ e δ .

Inicialmente, as quimiocinas foram descobertas pela sua capacidade de controle da adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. No entanto, sabe-se hoje que seus efeitos estendem-se para além da atração de leucócitos para os sítios de inflamação, estando envolvidas também em processos de angiogênese, hematopoiese, desenvolvimento embriológico, recirculação de leucócitos,

desenvolvimento de linfócitos T e B, maturação de células dendríticas, inflamação e infecção, crescimento tumoral e metástase (OLIVEIRA, et al., 2007). Logo, o crescente interesse no papel das quimiocinas e seus receptores deve-se não só às suas propriedades quimioatrativas, mas também à sua possível contribuição nos demais processos imunológicos.

As quimiocinas medeiam as suas funções através da ligação a receptores transmembranares de sinalização intracelular acoplados a proteínas G. Estes, são classificados de acordo com suas especificidades para as classes existentes de quimiocinas, por exemplo, receptores CCRs reconhecem quimiocinas CC e receptores CXCRs reconhecem quimiocinas CXC. A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor (COMERFORD; MCCOLL, 2011). Após a ligação da quimiocina em seu receptor, ocorre a ativação de proteínas G, iniciando uma cascata de transdução de sinais que gera segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) e cálcio. As vias de transdução de sinais ativadas pelas quimiocinas promovem desde modificações na transcrição gênica até a ativação de integrinas nos leucócitos, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos, e ativação de proteases de neutrófilos (BILATE, 2007).

Assim, diversos estudos têm demonstrado que esses fatores podem ter grande contribuição no desenvolvimento de doenças inflamatórias e crônicas (LUSTER et al., 1997; GOTTLIEB et al., 1998; KODALI et al., 2005; POPE et al., 2005), visto que o tipo de infiltrado inflamatório que caracteriza uma determinada doença é controlado, em parte, pelo subgrupo de quimiocinas expresso no tecido afetado (CHOLLET-MARTIN et al., 1993).

*Contudo, o papel de quimiocinas e seus receptores na doença de Chagas humana ainda é pouco conhecido. É observado que no início da infecção pelo *T. cruzi*, quando este invade as células epiteliais e macrófagos do hospedeiro, produtos provenientes de suas forma tripomastigotas como as glicoproteínas semelhante às mucinas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (tGPI mucinas) e o DNA parasitário, sejam os principais fatores responsáveis por induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001)(TEIXEIRA et al., 2002).*

A partir de estudos utilizando animais de experimentação, foi observado que a

expressão e produção de β -quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, possui atuação sinérgica ao induzir a isoforma da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos, demonstrando assim um papel protetor na infecção pelo T. cruzi (ALIBERTI et al., 1999) visto que os macrófagos são células efetoras essenciais no controle e eliminação do parasita. Também foi observado que estas quimiocinas, bem como as citocinas inflamatórias IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , foram produzidas por cardiomiócitos de camundongos infectados e associadas à indução da iNOS, altos níveis locais de nitrito e uma notável atividade tripanocida (MACHADO et al., 2000). Além disso, foi observado que algumas quimiocinas como CXCL9, CXCL10, e CCL5, produzidas por macrófagos pró-inflamatórios, permanecem em níveis elevados após a fase aguda e que níveis altos dessas quimiocinas durante a fase crônica coincidiram com o aumento da expressão de IFN- γ e com o grau de inflamação no coração, sugerindo distintos papéis para essas moléculas em ambos defesa do hospedeiro e desenvolvimento da imunopatologia da doença de Chagas (TALVANI et al., 2000; HARDISON et al., 2006).

Em outro estudo, também foram observados altos níveis de CXCL9, CXCL10 e CCL5 concomitante ao aumento do infiltrado de células TCD8+ ativadas no tecido cardíaco de camundongos infectados (DOS SANTOS et al., 2001). Contudo, em estudo conduzido por Petray et al. (2002) ao ser realizada a neutralização de CCL3/MIP-1 α , apesar de ser observada uma diminuição do infiltrado macrofágico no baço dos animais, observou-se um aumento da inflamação em seu tecido cardíaco concomitante a uma elevação nos níveis de parasitas teciduais. Assim, juntos, estes resultados demonstram uma complexa interação onde quimiocinas específicas podem estar exercendo distintos papéis na patofisiologia da doença.

Em animais knockout para IFN- γ , foram encontrados baixos níveis de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 e significativa redução do infiltrado leucocitário (ALIBERTI et al., 2001). Resultados semelhantes também foram observados em camundongos knockout para CCR5 (MACHADO et al., 2005), bem como em animais tratados com o inibidor para CCR5 (Met-Rantes) (MARINO et al., 2005). Demonstrando, o envolvimento destas quimiocinas no desenvolvimento do processo inflamatório no tecido cardíaco nestes animais e a modulação de sua expressão por citocinas proinflamatórias como IFN- γ . Além disso, o tratamento de animais com Met-RANTES além de não interferir nos níveis de parasitas, diminuiu

significativamente o infiltrado leucocitário por células T CD4+ e CD8+, CCR5+, concomitantemente a uma diminuição na deposição de fibronectina (MARINO et al., 2004). Desta forma, a grande concentração de células CCR5+ no tecido cardíaco embora não seja crucial para o controle do parasita, parece ser crítica para o desenvolvimento da miocardite. Desta forma, os receptores para β -quimiocinas parecem ser promissores alvos terapêuticos na avaliação da infecção pelo T. cruzi.

Assim, pode ser observado que a interação de células da imunidade inata com as formas tripomastigotas de T. cruzi desencadeia a produção de inúmeros mediadores envolvidos na regulação da resposta imune. Além disso, a síntese de citocinas e quimiocinas induzidas pelo T. cruzi é decisiva para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa que está envolvida no controle parasitário e na formação das lesões características da fase crônica da doença de Chagas (REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012) (Figura 4).

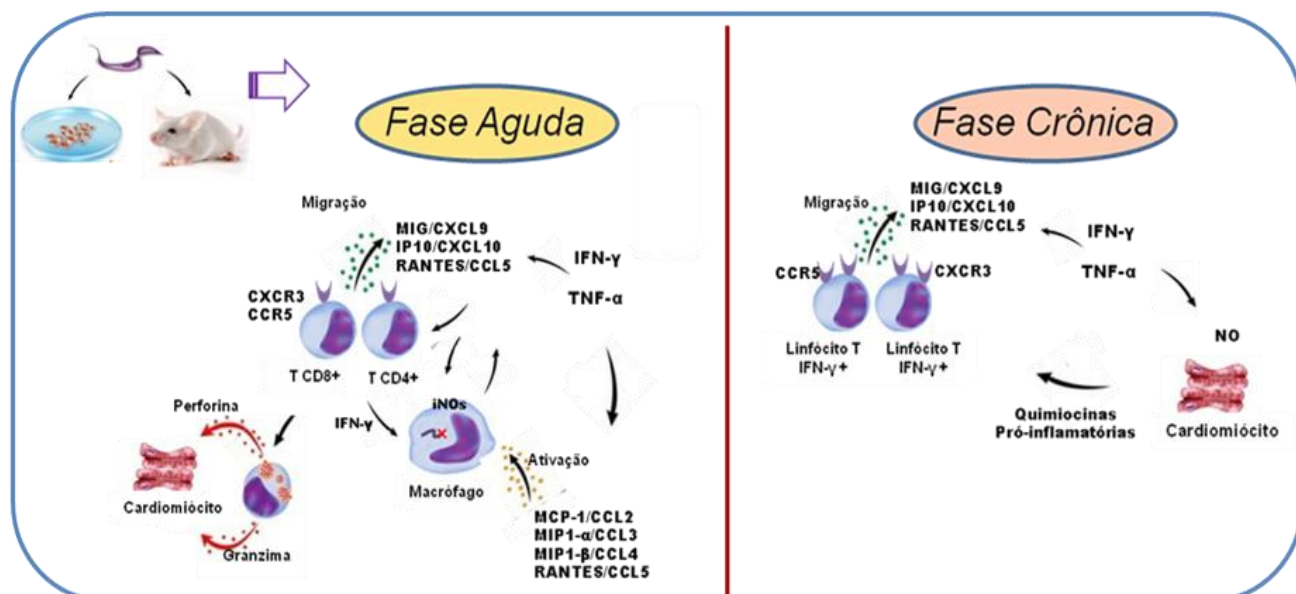


Figura 4. Mecanismo proposto de atuação de quimiocinas na doença de Chagas experimental. Controle da infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda e estabelecimento da miocardiopatia na fase crônica da doença. Fonte: a autora.

Estudos em humanos, ainda são escassos e a expressão e o papel do sistema de quimiocinas não foram estudados com muito detalhe. Neste contexto, já foram observados níveis elevados para co-expressão de receptores de quimiocinas e citocinas de perfil inflamatório (Th1) CCR5-IFN-γ, CXCR3-IFN-γ, e CXCR3-TNF-α em portadores de doença cardíaca em comparação aos indeterminados, por outro lado, os indivíduos indeterminados apresentaram maiores níveis de co-expressão para receptores e citocinas do perfil imunomodulatório (Th2) CCR3-IL-10 e CCR3-IL-4 (GOMES et al., 2005). Indicando que os receptores para quimiocinas podem realmente estar envolvidos no desenvolvimento precoce da cardiomiopatia chagásica. Mais recentemente, em estudo que buscou avaliar os níveis séricos para quimiocinas em indivíduos chagásicos crônicos observou-se que os níveis para CCL2, CXCL9 e CXCL10 estiveram mais elevados nos pacientes cardiopatas e correlacionados à piora da função cardíaca nesses indivíduos (SOUZA et al., 2014).

Interessantemente, Talvani et al. (2004) observaram uma maior expressão dos receptores CCR5 e CXCR4 por células CD4+, CD8+ e CD14+ de pacientes com disfunção cardíaca leve em relação àqueles com disfunção cardíaca grave. Além disso, eles observaram uma correlação positiva para a fração de ejeção e negativa para o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo com os níveis desses receptores.

Desta forma, os autores levantam duas possíveis explicações, a primeira considera que sendo os receptores CCR5 e CXCR4 importantes para o controle da doença na fase aguda, é possível que os pacientes com menor expressão de CCR5 e CXCR4 nesta fase possuam dificuldade em controlar a infecção de forma adequada e, portanto, sejam mais propensos a desenvolver uma infecção crônica mais grave. No entanto, não existem dados na literatura que possam suportar esta hipótese. Alternativamente, a menor expressão para CCR5 e CXCR4 observada em pacientes com doença mais severa poderia ser devido à acentuada disfunção no tecido cardíaco, visto o remodelamento do tecido cardíaco modifica os parâmetros imunes em indivíduos infectados com disfunção cardíaca grave.

Ao estudar a susceptibilidade genética que polimorfismos em genes de quimiocinas e seus receptores poderiam conferir, Calzada et al. (2001) observaram uma maior frequência para o polimorfismo na região promotora para o gene do receptor CCR5 (CCR5 59029 A→G) em pacientes indeterminados em comparação com portadores da forma cardíaca da doença de Chagas. Assim, foi sugerido que a diminuição da expressão de CCR5 em células Th1 pode proteger contra o desenvolvimento de miocardiopatia chagásica neste grupo de pacientes.

Oliveira et al. (2015) ao analisar este mesmo polimorfismo observaram que o genótipo A→G encontrado mais frequentemente em pacientes indeterminados pelo estudo anterior, esteve em maior frequência nos pacientes com a forma crônica digestiva da doença, já os pacientes cardiopatas apresentaram o genótipo A→A de maior frequência para a expressão de CCR5. Além disso, já foi observado que variantes para os genes dos receptores CCR5 e CCR2, também referentes à maior expressão destes, estiveram correlacionados à maior severidade da forma cardíaca da doença (MACHUCA et al., 2014).

*Em outro estudo, também foi observado que a variante para o gene de CCL2 (CCL2 -2518^a/G), relacionada a um baixo nível de transcrição para este gene, se comportou como um modificador genético do desfecho clínico para a infecção por *T. cruzi*, pois os indivíduos com o genótipo homozigoto (CCL2 -2518^a/A) apresentaram um risco quatro vezes maior de desenvolver a cardiopatia chagásica crônica do que aqueles sem este genótipo (RAMASAWMY et al., 2006).*

Desta forma, muito ainda necessita ser compreendido. Contudo, não há

dúvidas que a avaliação da produção de quimiocinas e seus receptores, por células da resposta imunológica, em portadores de doença de Chagas crônica, possa representar um caminho para o melhor entendimento das manifestações clínicas observadas nesta imunopatologia. A tabela 1 lista os principais estudos realizados na área até o momento, ressaltando a importância destes tipos de abordagens para o desenvolvimento de alvos terapêuticos e à identificação de marcadores imunológicos de fase crônica da doença.

Tabela 1: Principais estudos acerca do papel de quimiocinas e seus receptores na doença de Chagas.

Autor/Ano	Modelo experimental	Método Empregado	Principais Achados
ALIBERTI et al., 1999	Exudato peritoneal e macrófagos de camundongos infectados	RT-PCR/Imunohistoquímica.	Correlação de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, à atividade da Inos e controle parasitário.
MACHADO et al., 2000	Cardiomiócitos de camundongos infectados	RT-PCR	Correlação de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , à indução da Inos e controle parasitário.
TALVANI et al. 2000	Cardiomiócitos de camundongos infectados	RT-PCR	Permanência de níveis elevados de CXCL9, CXCL10, e CCL5 após a fase aguda.
ALIBERTI et al., 2001	Camundongos knockout para IFN- γ e TNF	IFI/RT-PCR	Baixos níveis de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 e redução do infiltrado leucocitário
CALZADA et al. 2001	Sangue periférico de indivíduos soronegativos e pacientes com DChC	PCR-RFLP	Polimorfismo no promotor do gene do CCR5 em pacientes assintomáticos
DOS SANTOS et al., 2001	Cardiomiócitos de camundongos infectados	RT-PCR/Citometria de fluxo	Altos níveis de CXCL9, CXCL10 e CCL5 e aumento de células TCD8+ ativadas
PETRAY et al. 2002	Camundongos infectados	Imunohistoquímica.	Neutralização de CCL3 e aumento da inflamação no tecido cardíaco e nos níveis de parasitas
MARINO et al., 2004	Camundongos tratados com o inibidor para CCR5	RT-PCR/Citometria de fluxo	Diminuição de células T CD4+ e CD8+, de CCR5+, de IL-4 e da deposição de fibronectina.
TALVANI et al. 2004	Avaliação ex vivo do sangue total de pacientes com DChC	Citometria de fluxo	Maior expressão de CCR5 e CXCR4 por CD4+, CD8+ e CD14+ de pacientes com disfunção cardíaca leve em relação àqueles cardiopatas grave.
GOMES et al., 2005	Cultivo de PBMC com estimulação por Ag de epimastigota, de pacientes com DChC	Citometria de fluxo	Co-expressão de receptores e citocinas inflamatórias (TH1) CCR5-IFN- γ , CXCR3-IFN- γ , e CXCR3-TNF- α por pacientes cardiopatas e co-expressão de receptores e citocinas imunomodulatórias (TH2) CCR3-IL-10 e CCR3-IL-4 por pacientes assintomáticos.
MACHADO et al., 2005	Camundongos knockout para CCR5	RT-PCR/Citometria de fluxo	Inibição da migração de células T ao tecido cardíaco e maior susceptibilidade à infecção.
HARDISON et al., 2006;	Cardiomiócitos de camundongos infectados	M. confocal/RPA	Correlação de altos níveis de CXCL9, CXCL10, e CCL5 com aumento da expressão de IFN- γ e com o grau de inflamação no coração.
RAMASA WMY et al., 2006	Sangue periférico de pacientes com DChC	PCR-RFLP	Risco 4x maior para cardiopatia naqueles com polimorfismo para CCL2.
REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012	Cultivo celular de indivíduos soronegativos, com tripomastigotas	ELISA	Aumento dos níveis de CXCL9 e NO.
SOUZA et al., 2014	Sangue periférico de pacientes com DChC	CBA	Elevados níveis para CCL2, CXCL9 e CXCL10 em pacientes cardiopatas.
MACHUCA et al., 2014	Sangue periférico de pacientes com DChC	PCR-RFLP	Variantes polimórficas que confere aumento na expressão de CCR2 e CCR5 e severidade da cardiopatia chagásica.
OLIVEIRA et al., 2015	Sangue periférico de pacientes com DChC	PCR-RFLP	Frequência elevada para o polimorfismo que confere aumento na expressão de CCR5 por pacientes cardiopatas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar, em indivíduos com doença de Chagas crônica, a associação da expressão fenotípica para receptores de quimiocinas (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5) e da produção de quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10), com a presença e gravidade da manifestação cardíaca.

3.2 Objetivos específicos

- *Comparar a expressão fenotípica para os receptores de quimiocinas por linfócitos T CD4+, CD8+ e CD4+CD8+ duplo-positivos, entre os portadores das formas clínicas crônica cardíaca e indeterminada;*
- *Comparar a produção de quimiocinas de sobrenadante de cultura celular entre os portadores das formas clínicas crônica cardíaca e indeterminada.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios laboratoriais presentes nesta seção foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia/Depto. de Imunologia e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), ambos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz).

4.1 Tipo de estudo

Estudo analítico observacional do tipo caso-controle que buscou verificar em indivíduos portadores de doença de Chagas crônica, a associação da produção de quimiocinas e da expressão fenotípica para receptores de quimiocinas com a presença e gravidade da manifestação cardíaca. Para compor o grupo dos casos, foram selecionados portadores da forma clínica cardíaca (CARD), confirmada por exames clínico/complementares (exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago), com resultados compatíveis com a infecção pelo *T. cruzi*. Este grupo foi subdividido em dois de acordo com a gravidade da cardiopatia: os indivíduos com cardiopatia leve (CARD1) e os que apresentaram cardiopatia severa (CARD2). Para compor o grupo dos controles, foram selecionados portadores da forma clínica indeterminada (IND), confirmada pelos mesmos exames clínico/complementares.

4.2 População da pesquisa

Foram selecionados, no período de março de 2013 a março de 2015, cinquenta e seis indivíduos (trinta mulheres e vinte e seis homens) portadores da doença de Chagas, procedentes e naturais do estado de Pernambuco e atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) - Universidade de Pernambuco, Recife-PE.

Atualmente, o referido local é considerado de referência estadual para o acompanhamento e tratamento destes pacientes, sendo estimada em 2.000 a população de pacientes cadastrados e que freqüentam suas instalações periodicamente.

Os indivíduos participantes foram selecionados por nosso grupo de pesquisa juntamente com médicos colaboradores deste estudo, de acordo com os seguintes critérios: 1) possuir sorologia reagente para a infecção chagásica por dois testes de princípios metodológicos distintos, 2) possuir exames clínicos/complementares (exame físico, eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma (ECO), radiografia (RX) de tórax e de esôfago) que permitiram sua caracterização nos estágios de envolvimento cardíaco A, B (B1 e B2), C e D, estabelecida pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011), 3) possuir exames clínicos/complementares (hemograma completo e parasitológico de fezes) para avaliação do estado de saúde global, atualizados e com resultados normais, 4) apresentar ausência de comorbidades (hipertensão arterial e/ou diabetes e/ou tireoidopatias e/ou doenças inflamatórias/infecciosas), 5) apresentar ausência de dilatação do esôfago e/ou queixas digestivas (engasgos e constipação), e 6) não ter sido submetido ao tratamento etiológico pelo benzonidazol até sua inclusão no projeto de pesquisa.

No grupo de indivíduos IND (N=20, média de idade de $53 \pm 11,84$), estiveram os pacientes classificados no estágio A de envolvimento cardíaco, ou seja, aqueles sem sintomas presentes ou pregressos de Insuficiência Cardíaca (IC) e com ECG, ECO e RX de tórax e esôfago normais. No grupo CARD 1 (n=20, média de idade de $64 \pm 9,5$), estiveram os pacientes classificados no estágio B1, ou seja, aqueles que apresentaram alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas que não possuíam disfunção ventricular. Além disso, esses pacientes puderam ter alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades da contratilidade regional), porém a função ventricular global apresentou-se normal. O grupo CARD 2 (n=16, média de idade de $59,6 \pm 9,5$), foi composto por pacientes classificado no estágio C, ou seja, aqueles com sintomas prévios ou atuais de IC e que possuíram disfunção ventricular (New York Heart Association I, II, III e IV).

Todas as informações acerca dos aspectos clínicos dos pacientes foram

registradas em formulário de pesquisa específico, e obtidas através dos prontuários dos pacientes e informadas pelos médicos responsáveis. Neste formulário, preenchido no momento da coleta de sangue, também foram registradas informações sociodemográficas do paciente (idade, gênero e município de residência e de origem).

4.3 Amostragem

As amostras foram obtidas pela demanda espontânea de pacientes que aceitaram participar do estudo no momento da consulta clínica. Com o objetivo de avaliar a diferença de médias para receptores de quimiocinas entre os grupos de pacientes cardíacos e indeterminados, foi realizado um cálculo amostral baseando-se nos dados encontrados pelo estudo de Talvani et al., 2004. Neste estudo, foi avaliada a expressão dos receptores CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR4 na superfície de células sanguíneas de portadores de doença de Chagas crônica e dependendo do subtipo celular analisado foram encontradas diferenças de médias entre os grupos de pacientes que variaram de 0,7 a 9,9 % cél. duplo-positivas. Desta forma, utilizando-se o software Win episcopo 2.0, e considerando-se para o cálculo uma significância do teste de 5%, Power de 80% e uma razão entre o número de casos e controles de 1:1, o tamanho amostral para amostras independentes (bi-caudal) variou de 5 a 821 indivíduos por grupo, dependendo da diferença de médias tomada como referência. Assim, por ter sido observada uma variação muito grande na estimativa do tamanho amostral, a amostra foi definida a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência.

4.4 Operacionalização e categorização das variáveis

As variáveis dependentes e independentes foram categorizadas de acordo com a sua natureza de poder ou não assumir diferentes valores (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Operacionalização e categorização das variáveis dependentes.

VARIÁVEIS DEPENDENTES (Forma clínica crônica da doença de Chagas)	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
Forma clínica indeterminada	Indivíduos que não possuam alterações cardíacas e/ou digestivas, confirmada por exames clínicos/complementares (exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago).	IND
Forma clínica cardíaca grau leve	Indivíduos que não apresentem alterações digestivas, contudo com alterações no eletrocardiograma, ecocardiograma e/ou raio-X de tórax que não representem disfunção ventricular global.	CARD1
Forma clínica cardíaca grau severo	Indivíduos que não apresentem alterações digestivas, contudo com alterações no eletrocardiograma, ecocardiograma e/ou raio-X de tórax compatíveis com disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.	CARD 2

Tabela 3. Operacionalização e categorização das variáveis independentes.

VARIÁVEIS LABORATORIAIS		
Variáveis independentes	Definição	Categorização
Expressão fenotípica para CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5 por linfócitos T	Proporção de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD4+CD8+ com expressão, na superfície celular, para os receptores de quimiocinas. Método: citometria de fluxo.	Variável contínua (%)
Intensidade média de fluorescência (MIF) para CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5 por linfócitos T	Intensidade média de fluorescência para receptores de quimiocinas na superfície de linfócitos T. Método: citometria de fluxo.	Variável contínua (%)
Elevada expressão fenotípica para CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5.	Proporção de indivíduos, por grupo de pacientes, com valores superiores ao cut-off. O valor do cut-off foi estabelecido para cada receptor estudado e obtido calculando-se a média aritmética dos valores	Variável contínua (% Acima do cut-off)

	médios de expressão fenotípica obtido por todos os grupos de pacientes.	
Produção de CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10.	Quantidade de quimiocinas solúveis presentes no sobrenadante de cultura celular. Método: CBA.	Variável contínua (pg/ml)
Elevada produção de CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10.	Proporção de indivíduos, por grupo de pacientes, com valores superiores ao cut-off. O valor do cut-off foi estabelecido para cada quimiocina estudada e obtido calculando-se a média aritmética dos valores médios de produção obtido por todos os grupos de pacientes.	Variável contínua (% Acima do cut-off)

4.5 Antígeno solúvel de epimastigota

O antígeno solúvel foi obtido segundo Pereira et al. (2000). Para Isso, epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidas em estufa incubadora a 27°C. Após sete dias de cultivo, os parasitos foram então lavados em solução salina-PBS (0,15 M; pH 7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada. Posteriormente a massa foi ressuspensa em inibidor de protease (Phenylmethanesulfonylfluoride-PMSF 1 mM e Ethylenediamine tetraacetic acid- EDTA 1 mM), sendo realizada a ruptura dos parasitos através de quatro ciclos de repetição do processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C.

Após esta etapa, o lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi submetido então à centrifugação a 100.000 x g por 60min a 4°C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) do antígeno de epimastigota (EPI). Após esterilização por filtração do antígeno solúvel de EPI em filtro Millipore 0,45 µm foi realizada a dosagem de proteína (kit DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories), com posterior armazenamento a -70°C até o momento de sua utilização.

4.6 Coleta e cultura de sangue periférico

Foram coletados 9 mL de sangue em tubos contendo heparina sódica (para cultivo celular, imunofenotipagem e CBA). Um mililitro de sangue total heparinizado foi utilizado para cultivo em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH[®], St Louis, MO, USA) suplementado com L-glutamina, 1% de antibiótico (10,000 U de penicilina, 10,000 U de estreptomicina; SIGMA-ALDRICH[®]) e 10% de soro bovino fetal (SIGMA-ALDRICH[®]), na presença de fitoemaglutinina-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5µg/mL) (controle positivo), do antígeno solúvel de epimastigota-EPI (25 µg/mL) e uma cultura sem estímulo também foi realizada.. O volume final das culturas foi de 2 mL, sendo incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ por 1 dia.

4.7 Imunofenotipagem

Após o período de cultivo o sobrenadante da cultura foi retirado e armazenado à -20°C para posterior quantificação de quimiocinas. As células sanguíneas foram tratadas com EDTA (20 mM) (SIGMA-ALDRICH[®]), seguido de lavagem por centrifugação (300g / 5min / T.A.) em PBS contendo 0.5% de albumina sérica bovina (SIGMA-ALDRICH[®]) e 0.1% de azida sódica (SIGMA-ALDRICH[®]) (PBS-Wash). O sobrenadante foi removido com auxílio de bomba a vácuo, restando o volume final de 1 mL no tubo. Cem microlitros da suspensão celular foram depositados em tubos de poliestireno devidamente identificados contendo anticorpos monoclonais de superfície (Figura 5). Após incubação por 30 min ao abrigo da luz, foram realizados procedimentos de lavagem com PBS-Wash por centrifugação (300 x g por 5 minutos). Após estes procedimentos as células foram então estocadas a 4°C até o momento da aquisição em citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickson Immunocytometry Systems) onde 20.000 eventos dentro da região de linfócitos foram analisados através do software CellQuest Pro.

Anticorpo	Fluorocromo	Titulação (μL)	Clone	Fabricante
CD4	PerCP	1,5	S3.5	Invitrogen™
CD8	FITC	1,5	3B5	Caltag
CCR1	AF	1,5	5354	BD™
CCR3	AF	1,5	SF8	BD™
CCR4	PE	2,5	161	BD™
CCR5	PE	5	2D7/CCR5	BD™
CXCR2	PE	2,5	6C6	BD™
CXCR3	PE	5	1C6/CXCR3	BD™
CXCR4	PE	2,5	1D9	BD™
CXCR5	AF	1,5	PF8B2	BD™

Figura 5. Anticorpos utilizados na imunofenotipagem. Legenda: (CD) Cluster of differentiation; (FITC) Isotiocianato de fluoresceína; (PE) Ficoeritrina; (PerCP) Proteína Clorofila Peridinina; (AF) Alexa Fluor; (CCR) Receptor de β -quimiocina; (CXCR) Receptor de α -quimiocina. Fonte: A autora.

4.8 Aquisição e análise por citometria de fluxo

A estratégia de aquisição baseou-se na seleção da população de linfócitos (janela R1) através dos parâmetros de tamanho/granulosidade [Forward Scatter Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC)] apresentados em gráficos dot plot. (Figura 6).

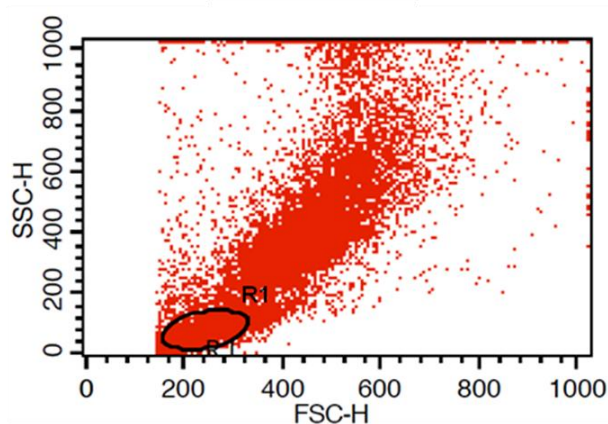


Figura 6. Exemplo de aquisição demonstrando os parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC). Legenda: R1 – Marcação realizada para determinar a população celular de linfócitos. Fonte: A autora.

Para avaliar a frequência dos linfócitos TCD4⁺ e os receptores de quimiocinas, foram analisados os quadrantes estatísticos FL3 (CD4) versus FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4), (Figura 7).

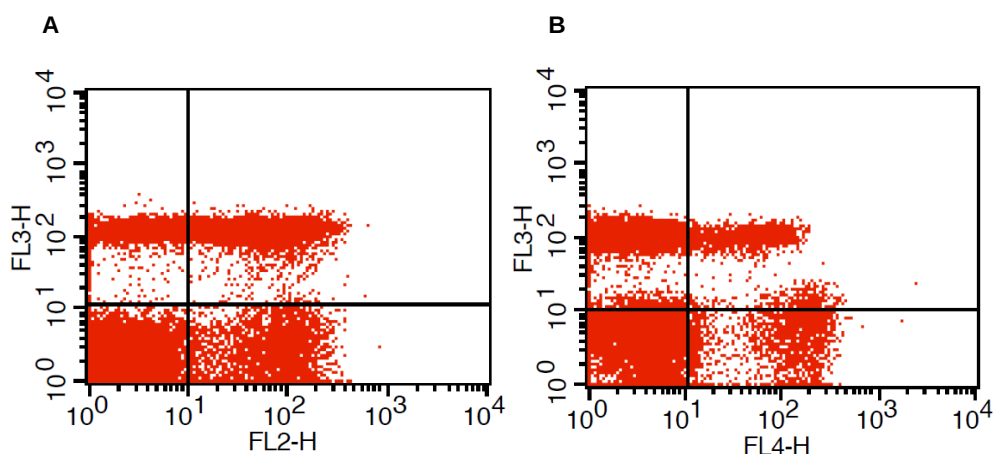


Figura 7. Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4⁺ no citômetro de fluxo. Legenda: (A) FL3 versus FL2, demonstrando a marcação CD4 versus receptores de fluorescência FL2. (B) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4 versus receptores de fluorescência FL4. Fonte: A autora.

De maneira semelhante, para avaliar a frequência dos linfócitos TCD8⁺ e os receptores de quimiocinas, foram analisados os quadrantes estatísticos FL1 (CD8) versus FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4) (Figura 8).

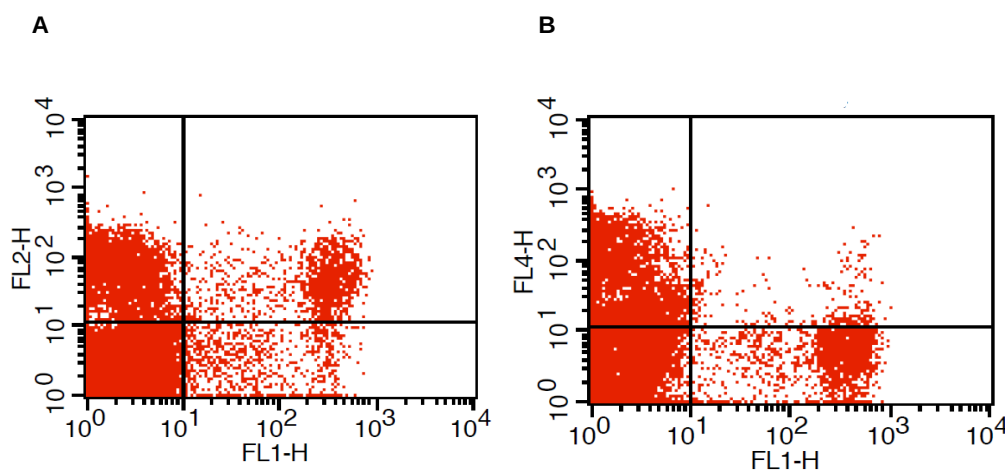


Figura 8. Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD8+ no citômetro de fluxo. Legenda: (A) FL1 versus FL2, demonstrando a marcação CD8 versus receptores de fluorescência FL2. (B) FL1 versus FL4, demonstrando a marcação CD8 versus receptores de fluorescência FL4. Fonte: A autora.

Para avaliar a frequência dos linfócitos TCD4+CD8+ e os receptores de quimiocinas foi analisado primeiramente os quadrantes estatísticos FL3 (CD4) versus FL1 (CD8). A partir deste, foi realizado um novo gráfico dot plot selecionando-se para análise apenas a região correspondente ao quadrante de dupla marcação CD4+CD8+ (janela R2). A partir desta nova região de análise foram então contabilizadas as frequências obtidas nos canais de fluorescência FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4). (Figura 9).

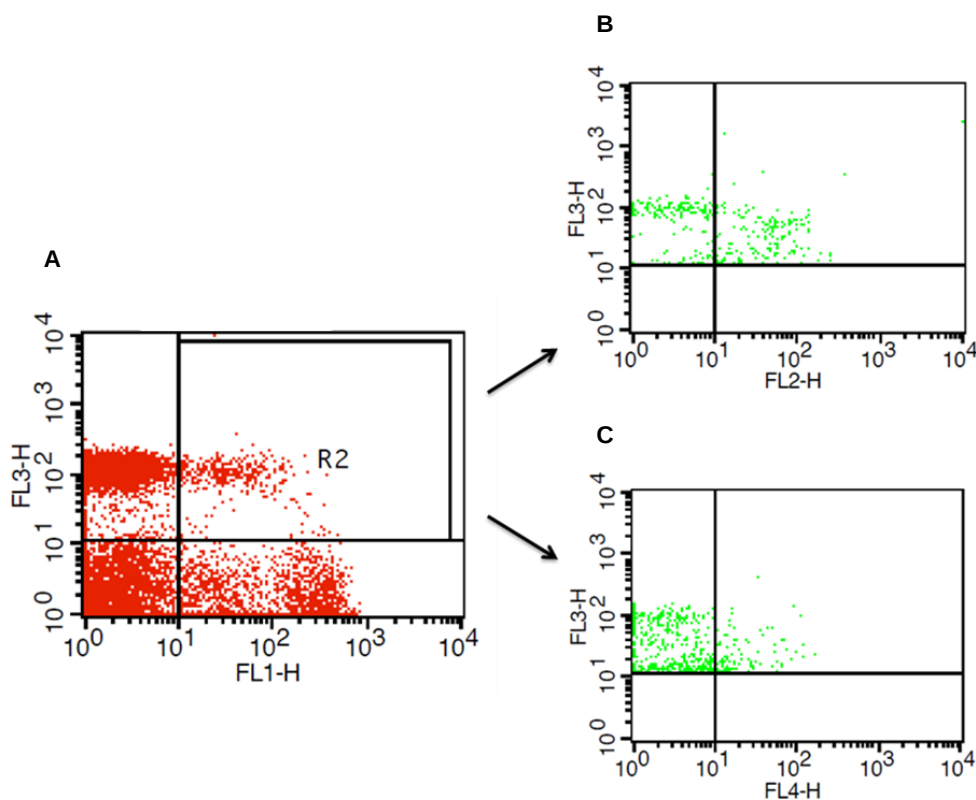


Figura 9. Exemplo de aquisição dos linfócitos T CD4+CD8+ no citômetro de fluxo. Legenda: (A) FL1 versus FL3, demonstrando a marcação CD8 versus CD4. R2 - população duplo positiva.. (B) FL3 versus FL2, demonstrando a marcação CD4+CD8+ versus receptores de fluorescência FL2. (C) FL3 versus FL4, demonstrando a marcação CD4+CD8+ versus receptores de fluorescência FL4. Fonte: A autora.

A avaliação da intensidade média de fluorescência (MIF) para os receptores de quimiocinas foi realizada a partir da análise de histogramas compostos por número de eventos da população de linfócitos (delimitada no gráfico FSC/SSC -

janela R1) (eixo Y) versus a intensidade dos valores para fluorescência específica dos receptores (FL2 ou FL4) (região M1, eixo X) (Figura 10).

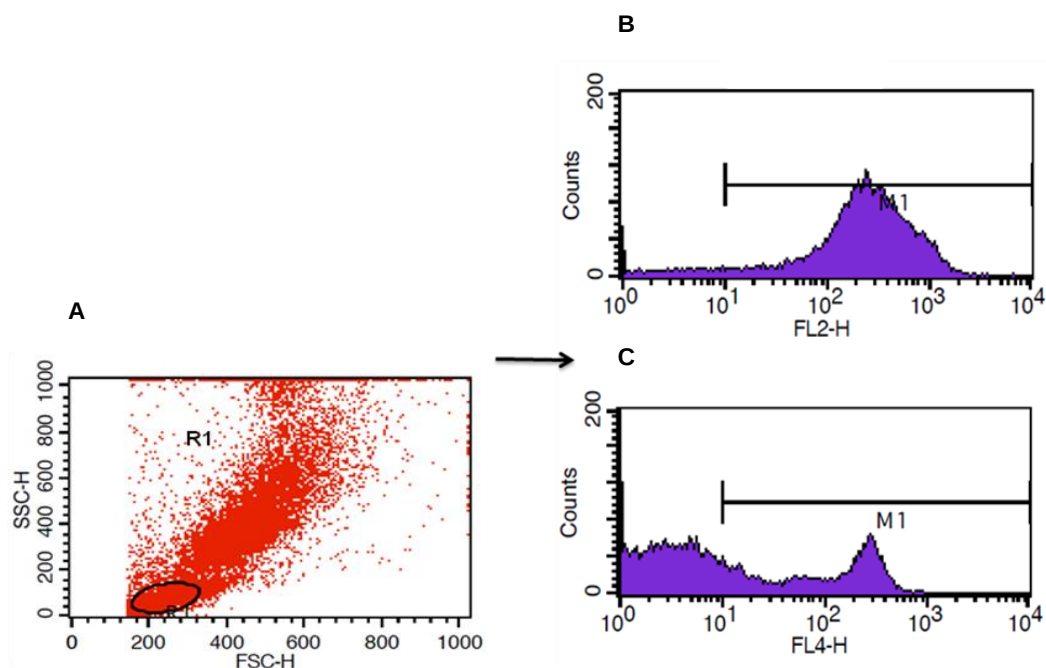


Figura 10. Exemplo de histograma para análise de intensidade média de fluorescência (MIF). Legenda: (A) SSC versus FSC, demonstrando a marcação para linfócitos, através da janela R1; (B) Histograma demonstrando a MIF de receptores com fluorescência para FL2. (C) Histograma demonstrando a MIF de receptores com fluorescência para FL4. Fonte: A autora.

4.9 Detecção de quimiocinas em sobrenadante de cultura

A quantificação das quimiocinas CCL2, CCL5, CCL8, CXCL9 e CXCL10, em sobrenadante de cultura foi realizada por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando-se o kit comercialmente disponível Human Chemokine (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Na realização do procedimento, foi adicionado um mix contendo beads de captura para cada quimiocina à tubos de ensaio contendo as diluições padrão do kit, controles, as amostras clínicas e o reagente de detecção, com posterior incubação por três horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O conteúdo dos tubos foi então lavado (tampão de lavagem) por centrifugação ($200 \times g$ por 5 minutos), com posterior descarte do sobrenadante, sendo adicionado novamente o tampão de lavagem para armazenamento a 4 °C e posterior análise por citometria de fluxo.

4. 10 Aquisição e análise das Beads de quimiocinas por citometria de fluxo

A aquisição das beads referentes a cada quimiocina foi realizada após ajuste dos parâmetros para detecção da fluorescência específica pelo citômetro de fluxo através do canal FL3. Desta forma, a partir de gráfico dot plot FSC (Forward Scatter) versus SSC (Side Scatter) foram adquiridos 2.500 eventos na região R1 (região de fluorescência de beads) e cada quimiocina avaliada de acordo o deslocamento e o pico de fluorescência diferencial de sua respectiva bead (Figura 11). A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson) e a análise realizada utilizando-se o software FCAP Array v3 (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA).

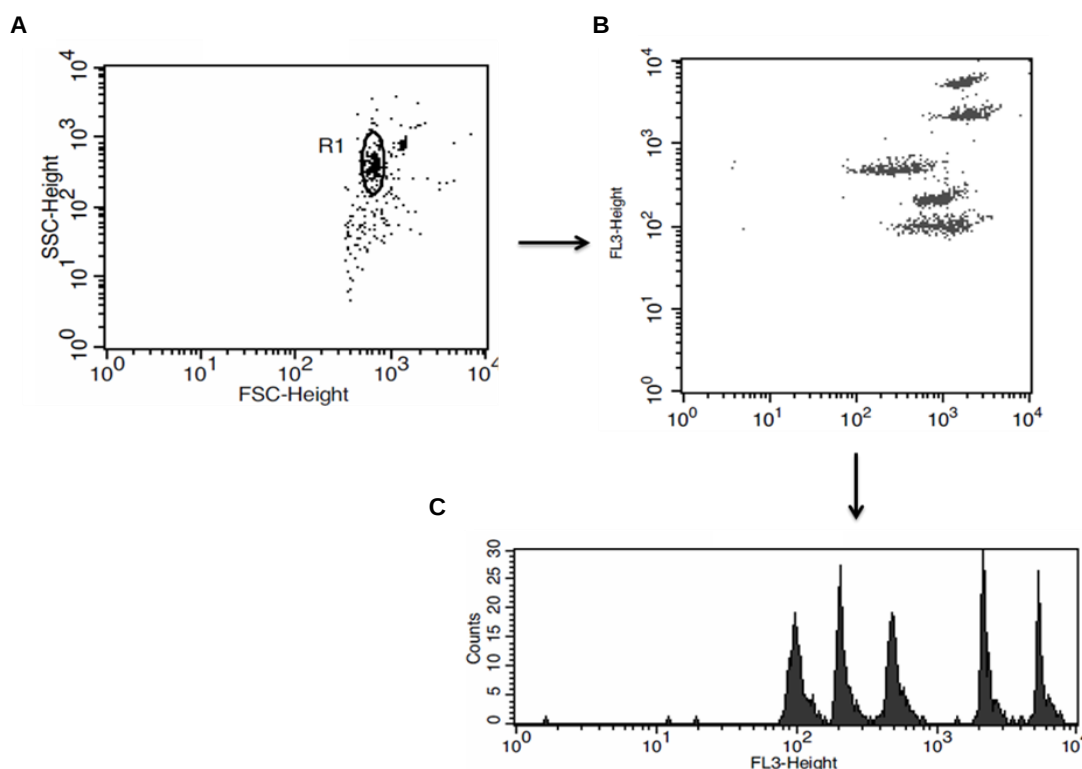


Figura 11. Exemplo de aquisição de beads para quimiocinas. Legenda: (A) Gráfico dot plot FSC versus SSC. Legenda: R1 – Marcação realizada para determinar a população de beads. (B) Gráfico de deslocamento diferencial das beads. (C) Gráfico de fluorescência diferencial das beads. Fonte: Adaptado do manual do Kit Human Chemokine (BD™).

4, 11 Análise estatística

Para avaliação da homogeneidade dos dados o teste de Bartlett foi

inicialmente aplicado. Para comparar as medias de expressão fenotípica e intensidade media de fluorescência para os receptores de quimiocinas, bem como a produção de quimiocinas em sobrenadante de cultivo, foi utilizado do teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn's. Para se avaliar a elevada expressão fenotípica para os receptores de quimiocinas e a elevada produção de quimiocinas, as frequências obtidas foram comparadas utilizando-se o teste de qui-quadrado. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os softwares utilizados foram Excel 2010 e GraphPad Prism 5.0.

4.12 Considerações éticas

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A). Todas as informações sobre o projeto de pesquisa foram fornecidas individualmente antes da coleta de sangue, com o intuito de explicar os objetivos do trabalho e esclarecer que os indivíduos eram livres para se recusarem a participar do estudo, bem como se retirarem quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico feito no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE. A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (CAEE: 0045.0.095.000-11)(ANEXO B). Os indivíduos que se recusaram a participar do estudo não tiveram nenhum comprometimento quanto ao seu acompanhamento médico.

5 RESULTADOS

5.1 *Produção de quimiocinas e expressão de seus receptores em linfócitos T por portadores crônicos da doença de Chagas*

Introdução

*Com elevada morbidade, a doença de Chagas crônica representa um sério enfrentamento para a saúde pública em regiões endêmicas [1]. Suas manifestações clínicas variam de ausência de sintomas e anormalidades estruturais (Forma assintomática ou indeterminada - IND) até distúrbios cardiovasculares (Forma cardíaca - CARD) e/ou digestivas (Forma digestiva) [2]. Com o objetivo de entender o mecanismo de desenvolvimento destas diferentes manifestações clínicas observadas, diversos estudos foram conduzidos no sentido de esclarecer o papel da resposta imune do hospedeiro frente ao *Trypanosoma cruzi* [3-14]. Desta forma, estudos implicam diretamente a existência de um processo inflamatório exacerbado na ausência de mecanismos imunomodulatórios como agente causal dos danos tissulares observados nas formas sintomáticas [15].*

Assim, considerando-se a grande contribuição que quimiocinas e seus receptores exercem para o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias e crônicas [16-19], visto que controlam, a partir de seu subgrupo expresso no tecido afetado, o tipo de infiltrado inflamatório que caracteriza uma determinada doença [20], tivemos como objetivo no presente estudo avaliar estes mediadores imunológicos em portadores de doença de Chagas crônica, visando o entendimento do processo inflamatório estabelecido no tecido cardíaco nestes indivíduos, e contribuindo desta maneira para a identificação de promissores alvos terapêuticos bem como de marcadores imunológicos de fase crônica da doença.

Métodos

População de estudo

A seleção de pacientes com doença de Chagas crônica foi realizado no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) - Universidade de Pernambuco. Os critérios de inclusão foram: (1) possuir confirmação sorológica para doença de Chagas por dois testes de princípios metodológicos distintos; (2) possuir exames (eletrocardiograma, radiografia de tórax, ecodopplercardiografia, e esofagograma) e história clínica para a classificação nos estágios de acometimento cardíaco da doença segundo a I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica [21]; (3) apresentar ausência de queixas digestivas e comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tireoidopatias e doenças inflamatórias e/ou infecciosas) e (4) não ter realizado tratamento etiológico com benzonidazol. Foram incluídos no estudo 56 indivíduos (trinta mulheres e vinte e seis homens) agrupados da seguinte forma: um grupo IND ($n = 20$, média de idade de $53 \pm 11,84$), pacientes classificados no estágio A de envolvimento cardíaco, ou seja, aqueles sem sintomas presentes ou pregressos de Insuficiência Cardíaca (IC) e com ECG e RX de tórax normais; um grupo CARD1 ($n = 20$, média de idade de $64 \pm 9,5$), pacientes classificados no estágio B1, ou seja, aqueles que apresentaram alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), porém com função ventricular global normal; e um grupo CARD2 ($n = 16$, média de idade de $59,6 \pm 9,5$), pacientes classificados no estágio C, ou seja, aqueles com sintomas prévios ou atuais de IC e que possuíram disfunção ventricular. Os protocolos descritos neste

estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CPqAM / Fiocruz (CAEE: 0032.0.095.000-10) de acordo com a Declaração de Helsinque 1975, revisto em 1983, e os indivíduos que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido no momento de sua inclusão no estudo.

Antígeno solúvel de epimastigota (EPI)

A solução antigênica foi obtida segundo Pereira et al. (2000) [22]. Para isso, epimastigotas da cepa Y do T. cruzi foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidos em estufa incubadora a 27°C. Após sete dias de cultivo, os parasitas foram então lavados em solução salina (Solução salina tamponada-PBS 0,15 M; pH 7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada. Posteriormente a massa foi ressuspensa em inibidor de protease (Fenilmetanosulfonilfluorido-PMSF 1 mM e Ácido Etilenodiamino Tetra-acético-EDTA 1 mM), sendo realizada a ruptura dos parasitas através de quatro ciclos de repetição do processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após esta etapa, o lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi submetido então a nova centrifugação a 100.000 xg por 60min a 4°C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) do antígeno de epimastigota (EPI). Após esterilização por filtração do antígeno solúvel de EPI em filtro Millipore 0,45 µm foi realizada a dosagem de proteína pelo kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories), com posterior armazenamento a -70°C até o momento de sua utilização.

Cultura celular

Após coleta de sangue em tubos contendo heparina sódica (BD Vacutainer), 1 mL de sangue foi cultivado na presença de 1 mL meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH[®], St Louis, MO, USA) suplementado com L-glutamina, 1% de antibiótico (10,000 U de penicilina, 10,000 U de estreptomicina; SIGMA-ALDRICH[®]) e 10% de soro bovino fetal (SIGMA-ALDRICH[®]). As culturas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ por 1 dia, e estimuladas com fitoemaglutinina-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5µg/mL) (controle positivo), antígeno solúvel de epimastigota-EPI (25µg/mL) e uma cultura sem estímulo também foi realizada.

Imunofenotipagem

Após o período de cultivo o sobrenadante da cultura foi retirado e armazenado à -20°C para posterior quantificação de quimiocinas. As células sanguíneas foram tratadas com EDTA (20 mM) (SIGMA-ALDRICH[®]), seguido de lavagem por centrifugação (300g / 5min / T.A.) em PBS contendo 0.5% de albumina sérica bovina (SIGMA-ALDRICH[®]) e 0.1% de azida sódica (SIGMA-ALDRICH[®]) (PBS-Wash).

As amostras foram incubadas com anticorpos de superfície anti-CD8 (clone: 3B5) (Caltag, Burlingame, CA, USA) conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD4 (clone: S3.5) (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA) conjugado ao complexo proteico peridina-chlorofil (PerCP), anti-CCR1 (clone: 5354), CCR3 (clone: SF8) e CXCR5 (clone: PF8B2) (BD[™], Franklin Lakes, NJ, USA) conjugados ao alexa fluor (AF) e anti-CCR4 (clone: 161), CCR5 (clone: 2D7/CCR5), CXCR2 (clone: 6C6), CXCR3 (clone: 1C6/CXCR3) e CXCR4 (clone: 1D9) (BD[™], Franklin

Lakes, NJ, USA) conjugados à ficoeritrina (PE). Após lavagens as células imunomarcadas foram estocadas a 4°C e posteriormente adquiridas e analisadas por citometria de fluxo.

Aquisição e análise em citômetro de fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson), e um mínimo de 20.000 eventos por amostra foram analisados. A estratégia de aquisição baseou-se na seleção da população de linfócitos através dos parâmetros de tamanho/granulosidade [Forward Scatter Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC)] apresentados em gráficos dot plot. Para avaliar a frequência dos linfócitos TCD4⁺ e os receptores de quimiocinas, foram analisados os quadrantes estatísticos FL3 (CD4) versus FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4), da mesma forma, para avaliar a frequência dos linfócitos TCD8⁺ e os receptores de quimiocinas, foram analisados os quadrantes estatísticos FL1 (CD8) versus FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4). A avaliação da intensidade média de fluorescência (MIF) para os receptores de quimiocinas foi realizada a partir da análise de histogramas compostos por contagem de eventos da população de linfócitos (delimitada no gráfico FSC/SSC) (eixo Y) versus o log dos valores para fluorescência específica dos receptores (FL2 ou FL4) (região M1, eixo X). A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando-se o software CellQuest Pro.

Quantificação de quimiocinas

A quantificação de quimiocinas em sobrenadante de cultura foi realizada por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando-se o kit comercialmente disponível Human Chemokine (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após os procedimentos, os dados para quantificação das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 foram adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson) e analisados através do software FCAP Array v3 (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA).

Análise estatística

Para avaliação da homogeneidade dos dados o teste de Bartlett foi inicialmente aplicado. Para comparar as medias de expressão fenotípica e intensidade media de fluorescência para os receptores de quimiocinas, bem como a produção de quimiocinas em sobrenadante de cultivo foi utilizado do teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn's. Para se avaliar a elevada produção de quimiocinas, as frequências obtidas foram comparadas utilizando-se o teste de qui-quadrado. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os softwares utilizados foram Excel 2010 e GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Expressão fenotípica para receptores de quimiocinas na superfície de linfócitos T CD4+ e CD8+

No presente trabalho observamos que os pacientes do grupo CARD1 (cardiopatia leve) apresentaram uma maior proporção de células T CD4+CXCR5+ (após estimulação com EPI) ($p=0,038$) e de células T CD4+CCR4+ (sem estimulação) ($p=0,038$) em relação aos pacientes do grupo IND (indeterminados) (Figura 1 A-B). Além disso, a MIF para o receptor CXCR5, em ambas as condições de estimulação (EPI, $p=0,008$) (SE, $p=0,017$), esteve mais elevada nos pacientes do grupo CARD1 em comparação aos pacientes do grupo IND (Figura 1 C-D).

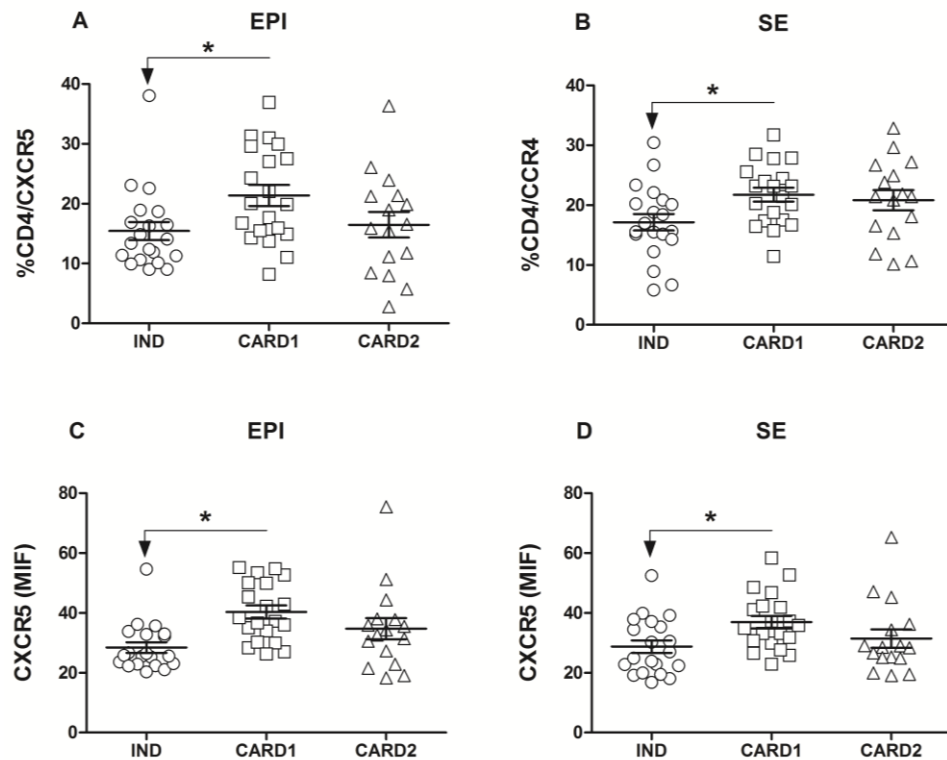


Figura 1. Expressão (%) para CD4+CXCR5+ (A), CD4+CCR4+ (B) e intensidade média de fluorescência (MIF) para CXCR5 (C-D), após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas. Pacientes com a forma clínica indeterminada (IND) ($n=20$), forma cardíaca grau leve (CARD1) ($n=20$) e forma cardíaca grau severo (CARD2) ($n=16$). As barras horizontais representam média aritmética e erro-padrão. Para comparação dos grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. Diferenças significativas (p -valor $<0,05$) estão indicadas por setas e pelo símbolo (*) na figura.

Obseamos que os pacientes do grupo CARD2 (cardiopatia grave) apresentaram células T CD8+ expressando os receptores CCR1 (após estimulação com EPI) ($p=0,020$) e CCR3 (sem estimulação) ($p=0,014$), em maior proporção que os pacientes do grupo IND (Figura 2 A-B). Além disso, nos pacientes do grupo CARD2, a MIF para estes receptores, em ambas as condições de cultivo citadas (CCR1/EPI, $p=0,016$) (CCR1/SE, $p=0,015$) (CCR3/EPI, $p=0,115$) (CCR3/SE, $p=0,030$), também se apresentou aumentada em comparação aos pacientes do grupo IND (Figura 2 C-D).

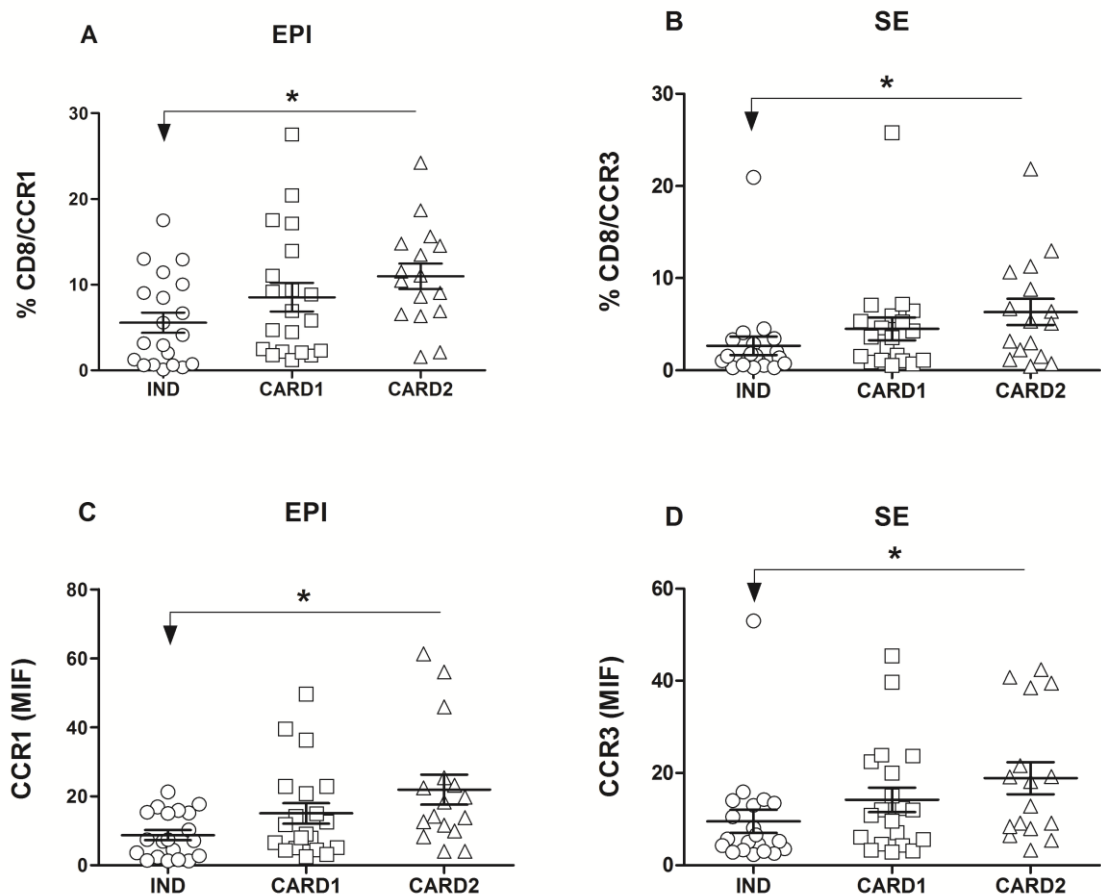


Figura 2. Expressão fenotípica para células T CD8+CCR1+ (A) e T CD8+CCR3+ (B); e intensidade de fluorescência (MIF) para CCR1 e CCR3 (C-D), após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas. Pacientes com a forma clínica indeterminada (A) ($n=20$), forma cardíaca grau leve (B1)

Elevada produção para quimiocinas em sobrenadante de cultura celular

Com o objetivo de detectar a elevada produção para quimiocinas, foi obtido um cut-off correspondente à média dos valores de produção de todos os grupos avaliados (IND, CARD1 e CARD2), e os indivíduos dispostos acima (altos produtores) ou abaixo (baixos produtores) desse valor, de acordo com seus níveis de produção para as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Desta forma, após estímulo por EPI, foi observado que um maior percentual de pacientes do grupo CARD2 apresentaram uma elevada produção para as quimiocinas CCL5 (68,75%) ($p=0,042$) e CXCL8 (87,50%) ($p=0,022$) quando comparado aos indivíduos IND, e elevada produção de CXCL10 (31,25%) ($p=0,011$) comparado aos pacientes CARD1. Também observamos elevada produção para CXCL8 por 80% dos pacientes do grupo CARD1 em relação aos indivíduos IND. Com relação à análise sem estimulação antigênica, não foram observadas diferenças significativas entre as proporções de quimiocinas apresentadas pelos grupos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Elevada produção de quimiocinas em sobrenadante de cultura celular por portadores de doença de Chagas crônica baseado no cut-off (média global) com ou sem estimulação por EPI.

Quimiocina	Média Global (cut-off)	Alto Produtor (%)		
		IND	CARD1	CARD2
CCL5				
EPI	4,84 (1,86 - 7,56)	30,00	60,00	68,75 ^(a)
SE	4,07 (1,95 - 6,20)	45,00	60,00	43,75
CXCL8				

<i>EPI</i>	11,26 (1,47 - 14,80)	40,00	80,00 ^(a)	87,50 ^(a)
<i>SE</i>	8,01 (1,15 - 13,04)	50,00	45,00	62,50
CXCL10				
<i>EPI</i>	25,04 (13,81 - 46,01)	20,00	00,00	31,25 ^(b)
<i>SE</i>	28,35 (6,66 - 86,81)	45,00	20,00	31,25

EPI, antígeno solúvel de epimastigota, *SE*, sem estimulação antigênica. Os dados expressam a porcentagem de indivíduos que apresentaram valores de produção de quimiocinas maior ou igual à média global (cut-off) calculado a partir dos valores de todos os grupos de pacientes avaliados. Pacientes com a forma clínica indeterminada (IND) (n=20), forma cardíaca grau leve (CARD1) (n=20) e forma cardíaca grau severo (CARD2) (n=16). Foi utilizado o teste de qui-quadrado e a significância estatística (p -valor<0,05) está representada pela letra (a) para comparação com os indivíduos do grupo IND e pela letra (b) para comparação com os indivíduos do grupo CARD1.

Discussão

Investigações acerca da etiopatogênese da miocardiopatia inflamatória observada em indivíduos cronicamente infectados com a doença de Chagas, atentam para mecanismos envolvendo processos de auto-imunidade [23], genética do hospedeiro [24], genética do parasita [25] e a resposta imune específica ao parasita elaborada pelo hospedeiro [26]. Os mecanismos pelos quais esta resposta é estabelecida e regulada nos indivíduos infectados ainda não estão completamente esclarecidos.

Diversos estudos implicam, ao desenvolvimento das lesões teciduais e progressão da doença, uma resposta imune celular de perfil predominantemente Th1 com produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α [27-32] além da ação de diferentes classes de imunoglobulinas [33-37]. Contudo, a contribuição de outras

subpopulações celulares e mediadores imunológicos responsáveis pela ativação, adesão e quimioatração destas células aos locais de inflamação, como quimiocinas e seus receptores, também vêm sendo investigados [38-40].

Neste sentido, no presente trabalho, observamos que pacientes com a cardiopatia leve (CARD1) apresentaram uma maior proporção de células T CD4+ expressando o receptor CXCR5+ bem como maior MIF para CCR5 que os pacientes assintomáticos (IND).

É de amplo conhecimento que os receptores CXCR5 e CCR7 são responsáveis pelo tráfego e direcionamento dos linfócitos T e B até as regiões foliculares e perifoliculares de interação entre essas células nos órgão linfoides secundários. Assim, células T CD4+CXCR5+ tem sido relatadas como células T helper foliculares (TFh) ativadas após contato com o antígeno, mais de polaridade ainda não definida, um estágio anterior à diferenciação Th1/Th2, ou seja, o estágio Th0 [41]. Sabe-se que essa população específica de células TFh está envolvida com a indução da produção de imunoglobulinas de alta afinidade por linfócitos B nos folículos secundários e vem sendo implicadas no desenvolvimento de diversas doenças auto-imunes. Contudo, além do receptor para quimiocinas CXCR5, este subtipo celular expressa outros marcadores funcionais (BCL6, ICOS, CD40L, CD44, OX40, BTLA, CCR7-, CD62-) [42] que também são necessários à sua correta classificação. Além disso, células T de fenótipo CD4+CXCR5+FOXP3+ com elevada expressão para ICOS, presentes nos centros germinativos e atuantes na interação T-B, foram descritas como células T reguladoras foliculares (TFR) que teria por função inibir a ação de células TFh regulando a indução da produção de anticorpos por essas células [43].

Também já foi observada elevada produção para CXCL13 (único ligante de CXCR5) e células de fenótipo T CD4+CXCR5+ em focos de tecido linfóide terciário (dispersos ao redor de tecidos com inflamação crônica) em doenças auto-imunes como lúpus e artrite reumatoide, ou seja, locais fora dos órgãos linfoides secundários, levando-se a acreditar que estes sítios seriam de fundamental importância para a ativação e diferenciação de células T CD4+CXCR5+ de memória (TM) em novas células efectoras [41].

Assim, de acordo com as evidências encontradas em nosso estudo, suspeitamos que as células T CD4+ expressando o receptor CXCR5 possam estar contribuindo em processos autoimunes relacionados à etiopatogênese da cardiopatia chagásica nos indivíduos CARD1. Contudo, devido à pluralidade de funções efectoras possíveis para estas células imunomarcadas, aliando-se à ausência de relatos anteriores para este subtipo celular na doença de Chagas, ponderamos serem necessárias maiores investigações avaliando-se um maior número de marcadores funcionais, para que se possa definir que subtipo de células T CD4+CXCR5+ encontra-se predominante nesses indivíduos e assim inferir sua correta participação no processo imunopatológico da doença.

No presente estudo, também observamos uma maior proporção de células de fenótipo T CD8+CCR1+ bem como elevada MIF para o receptor CCR1 pelos pacientes com cardiopatia grave (CARD2), em relação aos assintomáticos. Os pacientes CARD2 também apresentaram uma elevada produção para as quimiocinas CCL5 e CXCL8 com relação aos indivíduos IND, e uma elevada produção para CXCL10 com relação aos pacientes CARD1. Além disso, os pacientes CARD1 apresentaram uma elevada produção para CXCL8 em relação aos indivíduos IND.

Com relação a esta população de células T CD8+CCR1+ encontrada e a produção de quimiocinas observada, estudos sugerem que a predominância de células T CD8+ em tecido miocárdico de indivíduos infectados está intimamente relacionada ao perfil de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas exibidos por estas células [44]. Desta forma, em tecido cardíaco de animais infectados pelo T. cruzi já foram observados altos níveis de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CCL5 concomitante ao aumento do infiltrado de células TCD8+ ativadas [45]. Além disso, foi observado que a maioria das células T CD8+ presentes no tecido cardíaco de camundongos infectados expressavam o receptor para β -quimiocinas CCR5 [46]. Outro estudo mostrou que em animais knockout para IFN- γ , foram encontrados baixos níveis de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9 e CXCL10 e significativa redução do infiltrado leucocitário [47]. Resultados semelhantes também foram observados em camundongos knockout para CCR5 [48], bem como em animais tratados com o inibidor para CCR1/CCR5 (met-Rantes) [49]. Demonstrando o envolvimento de β -quimiocinas induzidas por IFN- γ na manutenção do infiltrado inflamatório de células T CD8+ no miocárdio, pelo recrutamento diferencial das células que exibam receptores complementares a estas quimiocinas em sua superfície.

Estudos em humanos, já evidenciaram níveis elevados para co-expressão de receptores e citocinas de perfil inflamatório (Th1) CCR5-IFN- γ , CXCR3-IFN- γ , e CXCR3-TNF- α em portadores de doença cardíaca em comparação aos assintomáticos [50]. A investigação da susceptibilidade genética que polimorfismos em genes de quimiocinas e seus receptores poderiam conferir demonstrou uma baixa expressão para CCR5 em pacientes IND [51] e alta expressão para CCL2 por pacientes cardiopatas [52]. Ademais, também foram encontrados níveis séricos elevados para CCL2, CXCL9 e CXCL10 por pacientes cardiopatas, onde a elevação

desses níveis esteve relacionada com a piora da função cardíaca nesses pacientes [53].

Assim, no presente estudo, é possível que esta maior proporção de células T CD8+CCR1+ em pacientes CARD2 represente a população de células T CD8+ estabelecida no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco desses pacientes, evidenciando um processo inflamatório estabelecido principalmente pela resposta Th1 e produção de quimiocinas induzidos pelo IFN- γ , como as observadas no sangue periférico dos pacientes com cardiopatia, responsáveis pela atração de células T CD8+ via CCR1.

Interessantemente, em nosso trabalho, também observamos que os indivíduos CARD2 apresentaram maiores níveis de células T CD8+CCR3+ bem como elevada MIF para o receptor CCR3 em comparação aos indivíduos IND e que os indivíduos CARD1 apresentaram maiores níveis de células T CD4+CCR4+ em comparação ao grupo IND.

Convencionalmente, o receptor para quimiocinas CCR3 é definido como de perfil Th2 e em muitos estudos encontram-se implicados no desenvolvimento de manifestações alérgicas [54,55]. Contudo, além das marcações de superfície celular, acreditamos que para se definir com exatidão se uma célula pode ser descrita como de perfil Th1 ou Th2, é necessária a avaliação de suas funções efetoras como, por exemplo, a sua produção de citocinas. Além disso, a CCL5 (quimiocina produzida principalmente por macrófagos) que possui produção induzida pelo IFN- γ , possui como ligantes os receptores CCR1, CCR3 e CCR5 [56]. Também, os receptores CCR5 e CCR3, juntamente com selectinas e moléculas de adesão, possuem um papel fundamental na migração de células T efetoras de memória para áreas inflamatórias e granulomatosas de doenças autoimunes [57]. Desta forma, como em

nosso estudo também foram observados uma maior produção para CCL5 e elevados níveis para células CD8+CCR1+ por pacientes com cardiopatia severa, sugerimos que consequentemente os maiores níveis para CD8+CCR3+ em pacientes CARD2, venha corroborar a ideia de que este receptor possa estar agindo conjuntamente ao CCR1 na atração de células T CD8+ ao tecido cardíaco desses pacientes mediante um perfil da resposta Th1.

Já o receptor para quimiocinas CCR4 é conhecido por ser seletivamente expresso em células T auxiliares do tipo 2 (Th2), Th17 e células T regulatórias (Treg) concomitante à respectiva produção de IL-4, IL-17 e IL-10 [58]. Contudo, níveis elevados de células TCD4+CCR4+ associados à produção de IL-10 tem sido observada e implicada na patogênese de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LES), espondilite anquilosante (EA) e artrite reumatoide (AR) [59]. De fato, estudos já proporam que o desequilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 estaria associado à patogênese do LES, onde a produção elevada de citocinas tipo Th2, visto que promovem a produção de anticorpos por células B, poderia exercer um papel chave no desenvolvimento de autoanticorpos por estes pacientes [60].

Na doença de Chagas humana nunca foi definido o envolvimento de um perfil Th1 ou Th2, no estabelecimento de suas formas clínicas crônicas. O perfil Th1 parece ser o mais indicado a estar envolvido no mecanismo imunopatogênico de lesão tissular, contudo, processos de autoimunidade não foram descartados [68]. Desta forma, nossos achados corroboram a ideia da existência de mecanismos autoimunes em pacientes com cardiopatia leve que poderiam estar agindo conjuntamente a um perfil inflamatório do tipo Th1 no estabelecimento desses danos e progressão clínica com sintomatologia neste grupo de pacientes.

Por fim, apesar de mais expressos em um perfil ou outro, os receptores para quimiocinas não são marcadores definitivos de diferenciação celular (como por exemplo a avaliação da molécula CCR2⁺ para o perfil Th2), também seria necessária a observação da produção intracelular de citocinas e quimiocinas por estas células [61]. Assim, sem outras marcações mais específicas poderemos inferir apenas qual receptor poderia estar atuando preferencialmente na migração destas células para as áreas de inflamação.

Conclusão

A partir da produção de quimiocinas e expressão de receptores de quimiocinas por células T, os resultados observados em nosso estudo, permitiram diferenciar a resposta imune de pacientes assintomáticos daqueles apresentando as cardiopatias leve e severa da doença. Desta forma, ratificamos a idéia de que estes mediadores imunológicos estão intimamente envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica podendo virem a ser utilizados, após estudo longitudinal, como marcadores de forma clínica crônica e prognóstico da doença.

Agradecimentos *Os autores agradecem às médicas Cristina Tavares e Marisa Melo do PROCAPE/UPE pela seleção dos pacientes incluídos neste estudo e à Mineo Nakazawa do CPqAM/Fiocruz pelo suporte técnico. Os autores também agradecem ao Programa para Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Ferramentas da Saúde-PDTISFIOCRUZ pela utilização de suas instalações. Este estudo recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Edital nº 474926/2012-5) e da Coordenação de*

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes é pesquisador vinculado ao CNPq (No. 304543/2012-8). Durante o estudo, AS Melo recebeu bolsa de estudos da CAPES (06407432421) para realização de doutorado.

Conflito de interesses Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- [1] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26, 275-91, 2012. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- [2] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, MARIN-NETO J. A. Chagas disease. *Lancet*. 375, 1388–402, 2010. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- [3] ALBAREDA M. C. et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 18, 465–471, 2006. doi:10.1093/intimm/dxh387
- [4] ALBAREDA M. C. et al. Chronic Human Infection with Trypanosoma cruzi Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence. *J Immunol*. 183, 4103-4108, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0900852
- [5] BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology?. *Braz J Med Biol Res*. 31, 127-131. 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>
- [6] BARROS-MAZON S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol*. 111, 137-145, 2004. doi:10.1016/j.clim.2004.01.002
- [7] CARDOSO G. M. et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci*. 11, 1158-1163, 2006. DOI: 10.2741/1870
- [8] GOMES J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 71,1185-1193, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003
- [9] LORENA V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from Trypanosoma cruzi. *Scand J Immunol*. 72, 529-539. 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [10] MENEZES C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 137,129-138. 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [11] SILVEIRA A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol*. 70, 65-67. 2009. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.015

- [12] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62, 297-308. 2005. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x
- [13] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 145, 81–92. 2006. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x
- [14] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Strategy to asses the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 68, 516-525. 2008. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x
- [15] 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, Vol.104, n.1, p. 208-218, 2009.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900027>
- [16] LUSTER AD; ROTHENBERG, ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 62, 5, 620-633, 1997.
- [17] GOTTILIEB, A. B. et al. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *Journal of Experimental Medicine.* 168, 941-48, 1998. doi: 10.1084/jem.168.3.941
- [18] KODALI, R. et al. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovascular Research,* 706-715, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.012>
- [19] POPE, S. M. et al. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *The Journal of Immunology,* 175, 8, 5341-50, 2005. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5341
- [20] CHOLLET-MARTIN, S. et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces os patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome, *Infection and Immunity,* 61, 11, 4553-59, 1993. <http://iai.asm.org/content/61/11/4553.short>
- [21] SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 97, 2, 1, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/abc/v97n2s1/a01v97n2s1.pdf>
- [22] PEREIRA V.R.A.et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 4, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000400006>
- [23] BONNY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?, *Current Molecular Medicine,* 8, 6, 510–518, 2008. doi: 10.2174/156652408785748004
- [24] DEL PUERTO, F. et al. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 6, 3, e1587, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001587
- [25] RODRIGUES, C. M. et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* 4, 10, e846, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000846

- [26] GUTIERREZ F.R.S, GUEDES P.M.M., GAZZINELLI, R.T., SILVA, J.S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673-685. 2009. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x
- [27] DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology.* 43, 88-93, 1996. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-9.x
- [28] CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94, 1, 253-255, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700042>
- [29] 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.* 137, 1, 129-138, 2004. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [30] CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39, 41-54, 2006. doi:10.1080/08916930500485002
- [31] DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 21, 287-292, 2008. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f88b80
- [32] LORENA V.M.B. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal of Immunology* 72, 6, 529-539 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [33] LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clinical and experimental immunology.* 85, 413-417, 1991. doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb05741.x
- [34] MORGAN, J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 55, 355-359, 1996. <http://europepmc.org/abstract/med/8916788>
- [35] ZAUZA, P.L.; BORGES-PEREIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-T. cruzi na evolução da cardiopatia chagásica, no período de 10 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 4, 5, 399-405, 2001. <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n5/5987.pdf>
- [36] GIRONES, N., et al. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease, *Current topics in microbiology and immunology.* 296, 89-123, 2005. doi: 10.1007/3-540-30791-5_6
- [37] Verçosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal.* 21, 271-276, 2007. doi: 10.1002/jcla.20186
- [38] LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104, 1, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900029>

- [39] MELO, A.S. et al. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine*. 58, 2, 210-212, 2012. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.008
- [40] BRAZ, S.C.M. et al. Increase in the Expression of CD4 + CD25+ Lymphocytic T Cells in the Indeterminate Clinical Form of Human Chagas Disease After Stimulation With Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*, *Journal of Clinical Immunology*. 34, 8, 991-998, 2014. doi: 10.1007/s10875-014-0092-6
- [41] MÜLLER, G.; LIPP, M. Shaping Up Adaptive Immunity: The Impact of CCR7 and CXCR5 on Lymphocyte Trafficking. *Microcirculation* . 10, 325–334, 2003. doi doi:10.1080/mic.10.3-4.325.334
- [42] MORITA, R. et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*. 34, 1, 28, 108–121, 2011. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
- [43] Sage, P.T., L.M. Francisco, C.V. Carman, and A.H. Sharpe. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol*. 14:152–161, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2496>
- [44] LANNES-VIEIRA J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98, 3, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000300002>
- [45] DOS-SANTOS, P.V.A. et al. Prevalence of CD8+ $\alpha\beta$ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes and Infection*, 3, 971-84, 2001. doi:10.1016/S1286-4579(01)01461-7
- [46] MARINO, A. P. M. P. et al. Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) Antagonist (Met-RANTES) Controls the Early Phase of *Trypanosoma cruzi*–Elicited Myocarditis. *Circulation*. 110, 1443-1449, 2004. doi: 10.1161/01.CIR.0000141561.15939.EC
- [47] ALIBERTI, J. C. S. et al. Modulation of Chemokine Production and Inflammatory responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. *The American Journal of Pathology*. 158, 4, 1433–1440, 2001. doi:10.1016/S0002-9440(10)64094-1
- [48] MACHADO, F. S. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Diseases*. 191, 4, 627-636, 2005. doi: 10.1086/427515
- [49] MARINO, A.P.M.P. et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 1, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000900015>
- [50] GOMES, J. A. S. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. *Infection and Immunity*. 73, 12, 7960-7966, 2005. doi: 10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005

- [51] CALZADA, J. E. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 58, 154–158, 2001. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2001.580302.x
- [52] RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 43, 305–11, 2006. doi: 10.1086/505395
- [53] SOUZA, G. et al. Plasma chemokine as potencial biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease . *The Journal of Immunology*. 192 ,(1 Supplement) 185.5. 2014. http://www.jimmunol.org/content/192/1_Supplement/185.5.short
- [54] GERBER, B.O. et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Current Biology* . 7, 836–843, 1997. doi:10.1016/S0960-9822(06)00371-X
- [55] WANG, CR. et al. Increased circulating CCR3+ Type 2 Helper T cells in House Dust Mite-Sensitive Chinese Patients With Allergic Diseases. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21, 205-201, 2003.
- [56] LAMPRECHT, P. et al. Heterogeneity of CD4+ and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res Ther* . 5, R25-R31. 2003. doi:10.1186/ar610
- [57] NISSINEN, R. et al. CCR3, CCR5, interleukin 4, and interferon gamma expression on synovial and peripheral T cells and monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 30, (9), 1928-1934, 2003. <http://www.jrheum.org/content/30/9/1928.short>
- [58] YE H OO. et al. The Role of Chemokines in the Recruitment of Lymphocytes to the Liver. *Dig Dis*. 28, 31–44. 2010. doi: 10.1159/000282062
- [59] YANG, P.T. et al. Increased CCR4 expression on circulating CD4+ T cells in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 138, 342–347, 2004. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02617.x
- [60] YAMADA, M. et al. Selective Accumulation of CCR4 T Lymphocytes Into Renal Tissue of Patients With Lupus Nephritis, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 46, 3, 735–740, 2002. DOI 10.1002/art.10112
- [61] COSMI, L. et al. CCR2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease . *Eur. J. Immunol*. 30, 2972–2979. 2000. doi:10.1002/1521-4141(200010)30:10<2972::AID-IMMU2972>3.0.CO;2-%23/pdf

5.2 Expressão diferencial de receptores para quimiocinas por linfócitos T CD4⁺CD8⁺ duplo-positivos em portadores crônicos da doença de Chagas

Introdução

A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, apresenta formas crônicas com elevada gravidade e morbidade, representando um sério enfrentamento para a saúde pública em regiões endêmicas [1]. As manifestações clínicas observadas nesta fase da doença variam de ausência de sintomas e anormalidades estruturais (Forma assintomática ou indeterminada - IND) até distúrbios cardiovasculares (Forma cardíaca - CARD) e/ou digestivas (Forma digestiva) [2]. No sentido de entender os mecanismos pelos quais estes diferentes quadros clínicos se desenvolvem, estudos foram conduzidos procurando esclarecer o papel da resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo parasita [3-14].

Na fase aguda da doença, uma robusta resposta imune elaborada pelo hospedeiro é a responsável em favorecer o controle efetivo da parasitemia. Este controle parasitário é alcançado principalmente pela ação de células da resposta imune inata como células Natural Killer (NK), neutrófilos e macrófagos e através da liberação de citocinas próinflamatórias como o interferon (IFN)-gamma e o fator de necrose tumoral (TNF)-alpha por estas células [15]. Assim, o direcionamento e manutenção da resposta imune adaptativa celular e humoral em resposta ao *T. cruzi* na fase crônica da doença, seria orquestrada desde o início por esta produção de citocinas observadas desde a sua fase inicial [16].

Neste sentido, estudos implicam que a permanência de um processo inflamatório, na ausência de mecanismos imunomodulatórios, atuaria como agente causal dos danos tissulares observados nas formas crônicas sintomáticas [17].

Assim, já foi observado que células T CD8+ ativadas com expressão de granzima A e TNF- α seriam predominantes no infiltrado inflamatório associado às lesões cardíacas da doença [18]. Além disso, a associação entre a expressão de IFN- γ e a ocorrência de doença cardíaca grave foi observada, sugerindo, na fase crônica, uma relação entre a produção de IFN- γ e a morbidade da doença [19]. E já foi mostrado que clones de células T derivadas do infiltrado inflamatório de pacientes chagásicos cardiopatas são excelentes produtores de IFN- γ [20].

Por outro lado, a forma crônica assintomática da doença de Chagas, tem sido associada com a capacidade de maior produção de citocinas regulatórias tais como a IL-10 e menor produção de citocinas inflamatórias como o IFN-gamma e o TNF-alpha [21,22]. Desta forma, é possível que a habilidade em produzir IL-10 em etapas mais tardias da fase aguda seria importante para controlar a resposta imune e permitir a cronificação da doença sem danos aos tecidos cardíaco e/ou digestivo. Assim, este fino balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias bem como uma resposta celular efetiva precisaria ser atingidos para manter os níveis parasitários estáveis na ausência de danos teciduais [16].

Contudo, na doença de Chagas humana, apesar do perfil Th1 parecer ser o mais indicado a estar envolvido no mecanismo imunopatogênico de lesão tissular e estabelecimento de suas formas clínicas crônicas, nunca foi definitivo o envolvimento de um perfil Th1 ou Th2, nem descartados possíveis processos de autoimunidade [17]. Desta forma, faz-se extremamente importante dar continuidade na avaliação das células e mediadores imunológicos que possam exercer papéis fundamentais para o desenvolvimento desta imunopatologia.

Interessantemente, células ativadas de fenótipo T CD4+CD8+ duplo-positivas (DP) apresentaram-se predominantes em portadores crônicos da forma cardíaca da

doença de Chagas [23, 24]. A presença destas células desafia o conhecimento atual acerca das subpopulações de linfócitos T envolvidas com a resposta imune adaptativa durante a infecção T. cruzi, e apesar do papel da atuação in vivo destas células permanecer incerto, o fato de serem potencialmente autorreativas pode influenciar os eventos imunopatológicos observados na doença de Chagas [25]. Desta forma, se for verificado que os níveis de células T DP estão correlacionados com a extensão ao dano no miocárdio, na forma cardíaca da doença, estas células poderiam atuar como marcadores clínicos de progressão da doença e contribuir para o desenvolvimento de tratamentos alternativos. Assim, estudos que avaliem o papel das células T DP podem fornecer novos conhecimentos acerca da relação parasita-hospedeiro estabelecido durante a infecção pelo T. cruzi [26].

Considerando-se o potencial autorreativo que células T DP possam estar exercendo para o estabelecimento da forma cardíaca da doença de Chagas, bem como a migração diferencial de células da resposta imunológica via complexos quimiocinas-receptor, tivemos como objetivo no presente estudo avaliar a expressão de receptores para quimiocinas por células T DP em portadores de doença de Chagas crônica. Desta forma, visamos o entendimento dos possíveis mecanismos de migração diferencial destas células e sua contribuição para o processo inflamatório estabelecido no tecido cardíaco nestes indivíduos.

Métodos

População de estudo

A seleção de pacientes com doença de Chagas crônica foi realizado no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) - Universidade de Pernambuco. Os critérios de inclusão foram: (1) possuir confirmação sorológica para doença de Chagas por dois testes de princípios metodológicos distintos; (2) possuir exames (eletrocardiograma, radiografia de tórax, ecodopplercardiografia, e esofagograma) e história clínica para a correta classificação nos estágios de acometimento cardíaco da doença segundo a I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica [27]; (3) apresentar ausência de queixas digestivas e comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tireoidopatias e doenças inflamatórias e/ou infecciosas) e (4) não ter realizado tratamento etiológico com benzonidazol. Foram incluídos no estudo 56 indivíduos (trinta mulheres e vinte e seis homens) agrupados da seguinte forma: um grupo IND ($n = 20$, média de idade de $53 \pm 11,84$), pacientes classificados no estágio A de envolvimento cardíaco, ou seja, aqueles sem sintomas presentes ou pregressos de Insuficiência Cardíaca (IC) e com ECG e RX de tórax normais; um grupo CARD1 ($n = 20$, média de idade de $64 \pm 9,5$), pacientes classificados no estágio B1, ou seja, aqueles que apresentaram alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), porém com função ventricular global normal; e um grupo CARD2 ($n = 16$, média de idade de $59,6 \pm 9,5$), pacientes classificados no estágio C, ou seja, aqueles com sintomas prévios ou atuais de IC e que possuíam disfunção ventricular. Os protocolos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CPqAM / Fiocruz (CAEE: 0032.0.095.000-10) de acordo com a Declaração de Helsinque 1975, revisto em 1983, e os indivíduos que concordaram em participar

assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido no momento de sua inclusão no estudo.

Antígeno solúvel de epimastigota (EPI)

A solução antigênica foi obtida segundo Pereira et al. (2000) [28]. Para isso, epimastigotas da cepa Y do T. cruzi foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e mantidos em estufa incubadora a 27°C. Após sete dias de cultivo, os parasitas foram então lavados em solução salina (Solução salina tamponada-PBS 0,15 M; pH 7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada. Posteriormente a massa foi ressuspensa em inibidor de protease (Fenilmetanosulfonilfluorido-PMSF 1 mM e Ácido Tetracético Etilenodiamino-EDTA 1 mM), sendo realizada a ruptura dos parasitas através de quatro ciclos de repetição do processo de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após esta etapa, o lisado foi centrifugado a 10.000 xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi submetido então a nova centrifugação a 100.000 xg por 60min a 4°C para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) do antígeno de epimastigota (EPI). Após esterilização por filtração do antígeno solúvel de EPI em filtro Millipore 0,45 µm foi realizada a dosagem de proteína pelo kit DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories), com posterior armazenamento a -70°C até o momento de sua utilização.

Cultura celular

Após coleta de sangue em tubos contendo heparina sódica (BD Vacutainer), 1 mL de sangue foi cultivado na presença de 1 mL meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH®, St Louis, MO, USA) suplementado com L-glutamina, 1% de antibiótico (10,000 U de penicilina, 10,000 U de estreptomicina; SIGMA-ALDRICH®) e 10% de soro bovino fetal (SIGMA-ALDRICH®). As culturas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ por 1 dia, e estimuladas com fitoemaglutinina-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5µg/mL) (controle positivo), antígeno solúvel de epimastigota-EPI (25µg/mL) e uma cultura sem estímulo também foi realizada.

Imunofenotipagem

Após o período de cultivo as células sanguíneas foram tratadas com EDTA (20 mM) (SIGMA-ALDRICH®), seguido de lavagem por centrifugação (300g / 5min / T.A.) em PBS contendo 0.5% de albumina sérica bovina (SIGMA-ALDRICH®) e 0.1% de azida sódica (SIGMA-ALDRICH®) (PBS-Wash).

As amostras foram incubadas com anticorpos de superfície anti-CD8 (clone: 3B5) (Caltag, Burlingame, CA, USA) conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD4 (clone: S3.5) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) conjugado ao complexo proteico peridrina-chlorofil (PerCP), anti-CCR1 (clone: 5354), CCR3 (clone: SF8) e CXCR5 (clone: PF8B2) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA) conjugados ao alexa fluor (AF) e anti-CCR4 (clone: 161), CCR5 (clone: 2D7/CCR5), CXCR2 (clone: 6C6), CXCR3 (clone: 1C6/CXCR3) e CXCR4 (clone: 1D9) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA) conjugados à ficoeritrina (PE). Após lavagens as células imunomarcadas foram estocadas a 4° C e posteriormente adquiridas e analisadas por citometria de fluxo.

Aquisição e análise em citômetro de fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson), e um mínimo de 20.000 eventos por amostra foram analisados. A estratégia de aquisição baseou-se na seleção da população de linfócitos através dos parâmetros de tamanho/granulosidade [Forward Scatter Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC)] apresentados em gráficos dot plot. Para avaliar a frequência dos linfócitos TCD4+CD8+ e os receptores de quimiocinas foi analisado primeiramente os quadrantes estatísticos FL3 (CD4) versus FL1 (CD8). A partir deste, foi realizado um novo gráfico dot plot selecionando-se para análise apenas a região correspondente ao quadrante de dupla marcação CD4+CD8+. A partir desta nova região de análise foram então contabilizadas as frequências obtidas nos canais de fluorescência FL2 (CCR1, CCR3 e CXCR5) ou FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 e CXCR4). A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando-se o software CellQuest Pro.

Análise estatística

Para avaliação da homogeneidade dos dados o teste de Bartlett foi inicialmente aplicado. Para comparar as medias de expressão fenotípica e intensidade média de fluorescência para os receptores foi utilizado do teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn's. Para se avaliar a elevada expressão fenotípica para os receptores, as frequências obtidas foram comparadas utilizando-se o teste de qui-quadrado. Em todas as análises foi considerado um nível de

significância de 5% ($\alpha=0,05$). Os softwares utilizados foram Excel 2010 e GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Expressão fenotípica para receptores de quimiocinas na superfície de linfócitos T CD4+CD8+ duplo-positivos

No presente trabalho observamos que os pacientes do grupo CARD2 (cardiopatía grave) apresentaram células de fenótipo T CD4+CD8+ duplo-positivos expressando os receptores CCR1 (após estimulação com EPI) ($p=0,041$) e CCR3 (sem estimulação) ($p=0,008$), em maior proporção que os pacientes do grupo IND (indeterminados) (Figura 1. A-B).

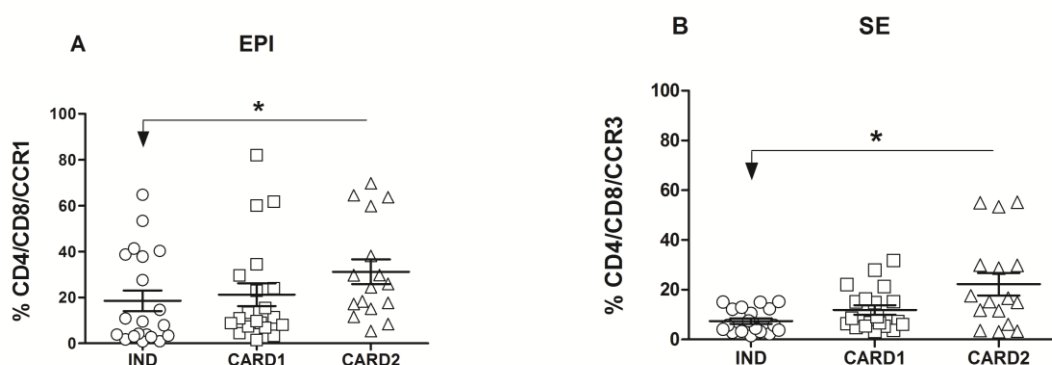


Figura 1. Expressão (%) para CCR1 (A) e CCR3 (B) em células T CD4+CD8+; após estimulação com antígeno solúvel de epimastigota (EPI) e sem estimulação antigênica (SE), em portadores das formas crônicas da doença de Chagas. Pacientes com a forma clínica indeterminada (IND) ($n=20$), forma cardíaca grau leve (CARD1) ($n=20$) e forma cardíaca grau severo (CARD2) ($n=16$). As barras horizontais representam média aritmética e erro-padrão. Para comparação dos grupos foi aplicado o

teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. Diferenças significativas (P -valor $<0,05$) estão indicadas por setas e pelo símbolo (*) na figura.

Para os demais receptores de quimiocinas avaliados, não foram obtidas diferenças significativas acerca de sua expressão na superfície de linfócitos T DP entre os grupos de pacientes.

Elevada expressão fenotípica para receptores de quimiocinas na superfície de linfócitos T CD4+CD8+ duplo-positivos

Com o objetivo de detectar a elevada expressão fenotípica para receptores de quimiocinas, foi obtido um ponto de corte correspondente à média dos valores de expressão de todos os grupos avaliados (IND, CARD1 e CARD2), e os indivíduos dispostos acima ou abaixo desse valor, de acordo com seus níveis de expressão para os receptores. Desta forma, com relação à análise sem estimulação antígenoica (SE), foi observada uma elevada expressão para o receptor CCR3 em células T CD4+CD8+ duplo-positivas ($p=0,001$), por 62,5% dos indivíduos CARD2 em comparação aos indivíduos do grupo IND (Tabela 1).

Tabela 1. Elevada expressão para receptores de quimiocinas na superfície de células T CD4+CD8+ por portadores de doença de Chagas crônica baseado no cut-off (média global) com ou sem estimulação por EPI.

Cél. CD4+CD8+ T	Média global (cut-off)	Alto produtor (%)		
		IND	CARD1	CARD2
CCR3+				
EPI	16,70 (1,93 - 90,45)	25,00	40,00	38,00

SE	13,29 (1,58 - 55,20)	10,00	40,00	62,50*
----	----------------------	-------	-------	--------

EPI, antígeno solúvel de epimastigota, SE, sem estimulação antigênica. Os dados expressam a porcentagem de indivíduos que apresentaram valores de expressão fenotípica maior ou igual à media global (cut-off) calculado a partir dos valores de todos os grupos de pacientes avaliados. Pacientes com a forma clínica indeterminada (IND) (n=20), forma cardíaca grau leve (CARD1) (n=20) e forma cardíaca grau severo (CARD2) (n=16). Foi utilizado o teste de qui-quadrado e a significância estatística (P-valor<0,05) está representada pelo símbolo () para comparação com os indivíduos do grupo IND.*

Para os demais receptores de quimiocinas avaliados, não foram obtidas diferenças significativas acerca de sua elevada expressão na superfície de linfócitos T DP entre os grupos de pacientes.

Discussão

O infiltrado celular associado à miocardite observado na infecção aguda pelo T. cruzi é induzido por uma resposta imune polarizada do tipo Th1, com elevada expressão das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1, IFN- γ e TNF-alpha [29,30], as quais controlam a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão nos tecidos afetados. Enquanto esta reação inflamatória controla a replicação parasitária e o parasitismo, com a cronificação da doença, sua persistência também representa a principal causa dos danos aos tecidos, acarretando morbidade e mortalidade aos indivíduos acometidos [18].

No decorrer da infecção, a maioria das células mononucleares recrutadas e encontradas no infiltrado inflamatório ao redor dos cardiomiócitos infectados são linfócitos T CD8+. De fato, camundongos deficientes em citocinas inflamatórias e em

células T CD8+ são susceptíveis à infecção pelo T. cruzi [31]. Células T CD4+ também exercem um importante papel ao orquestrar a resposta imune via produção de citocinas. Menos frequente, mas funcionalmente relevantes, outras subpopulações de células T como as (duplo-negativas) CD4-CD8- e as (duplo-positivas) CD4+CD8+, também têm sido descritas como atuantes na resposta imune ao T. cruzi, embora suas funções não se encontrem completamente esclarecidas [26,32].

Células T duplo-positivas CD4+CD8+ representam uma subpopulação tímica, precursora de células T CD4+ ou CD8+ monopositivas, com distribuição considerada até pouco tempo atrás como restrita ao timo [26]. Contudo, sabe-se que em indivíduos saudáveis as células T DP circulantes representam cerca de 1–3% do total da população de linfócitos T [33] e que a frequência destas células pode estar aumentada em diversas desordens inflamatórias [34-37].

Estudos também relatam uma frequência aumentada para as células T DP em doenças humanas crônicas e infecciosas com persistência antigênica [38,39]. Assim, já foi observado que a porcentagem de células T DP bem como a expressão de marcadores de ativação celular por estas células esteve aumentado em pacientes chagásicos crônicos em comparação aos indivíduos controle, incluindo indivíduos sem cardiomiopatia chagásica [25].

Com relação à origem destas células T DP periféricas, dados experimentais apontam tanto para a ocorrência de um escape destas células do timo [40] quanto para uma diferenciação tardia de células T monopositivas CD4+ ou CD8+ T após exaustiva estimulação antigênica [41,42]. Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado uma associação entre atrofia tímica com severa depleção de timócitos CD4+CD8+ e um aumento em até dezesseis vezes no número destas células

encontradas na periferia (linfonodos subcutâneos) após infecção aguda pelo *T. cruzi* em camundongos [43,44], o que suporta a teoria do “escape tímico”. Contudo, a expressão do “segundo” correceptor pelos linfócitos *T* monopositivos como consequência da contínua estimulação antigênica também se apresenta viável, visto o elevado grau de ativação encontrado nestas células por alguns estudos [25]. Contudo, mais estudos são necessários para se determinar a origem destas células em pacientes chagásicos, e a detecção destas células em sangue periférico de modelos murinos de infecção pelo *T. cruzi* e em portadores de doença de Chagas levanta novas questões acerca da sua importância na patogênese desta importante doença.

No mesmo contexto, quimiocinas e seus receptores representam mediadores da resposta imunológica e possuem papel chave nos processos de permeabilidade vascular, atração, migração e ativação de células imunes, estando envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias e crônicas [16][45-47], visto que o tipo de infiltrado inflamatório que caracteriza uma determinada doença é controlado, em parte, por seu subgrupo de quimiocinas expresso no tecido afetado.

Na doença de Chagas humana, já foram evidenciados níveis elevados para co-expressão de receptores de quimiocinas e citocinas de perfil inflamatório (*Th1*) *CCR5-IFN- γ* , *CXCR3-IFN- γ* , e *CXCR3-TNF- α* em portadores crônicos de doença cardíaca em comparação aos assintomáticos [48]. A investigação da susceptibilidade genética que polimorfismos em genes de quimiocinas e seus receptores poderiam conferir demonstrou uma baixa expressão para *CCR5* em pacientes IND [49] e alta expressão para *CCL2* por pacientes cardiopatas [50]. Ademais, também foram encontrados níveis séricos elevados para *CCL2*, *CXCL9* e *CXCL10* por pacientes cardiopatas, onde a elevação desses níveis esteve

relacionada com a piora da função cardíaca nesses pacientes [51]. Indicando que o complexo quimiocina-receptor também possui envolvimento com o desenvolvimento precoce da cardiomiopatia chagásica ao recrutar subpopulações específicas de células aos tecidos afetados.

Desta maneira, no presente estudo, ao avaliarmos o perfil de expressão fenotípica para receptores de quimiocinas por células T DP de portadores crônicos da doença de Chagas, observamos que indivíduos com cardiopatia severa apresentaram níveis significativamente mais elevados para os receptores CCR1 e CCR3 por estas células que os indivíduos assintomáticos.

Interessantemente, resultados semelhantes foram encontrado em outro estudo conduzido por nosso grupo, no qual observamos que os pacientes cardiopatas apresentaram maiores níveis para células T CD8+ monopositivas expressando CCR1 e CCR3 que os pacientes IND (artigo em preparação). Estes resultados estiveram de acordo com a literatura visto ser proposto que a manutenção do processo inflamatório estabelecido no tecido cardíaco nos indivíduos avaliados se deve principalmente pela resposta Th1 e produção de quimiocinas induzidos pelo IFN- γ , que por intermédio de seus receptores nas células-alvo, como o CCR1 e CCR3, seriam responsáveis pelo seu recrutamento diferencial ao tecido cardíaco dos pacientes.

Neste sentido, estudos já demonstraram uma elevada expressão para perforina em células T DP periféricas de pacientes chagásicos em geral, contudo, com um aumento na taxa de degranulação desta enzima apresentada apenas pelos pacientes sintomáticos. Além disso, também foi observada a capacidade migratória das células T DP ao tecido cardíaco [25]. Desta forma, considerando que o fenótipo das células encontradas no sangue periférico é responsável e reflete a manutenção

do infiltrado inflamatório, seria possível associar uma ação citotóxica das células T DP periféricas encontradas no presente estudo ao dano cardíaco observado nos indivíduos avaliados.

Além disso, neste mesmo estudo anterior realizado por nós, (artigo em preparação) também observamos que o fenótipo diferencial de células T CD4+ expressando os receptores para quimiocinas CXCR5 e CCR4, esteve em maior proporção em pacientes cardiopatas em relação aos pacientes IND (indeterminados) tendo sido relacionados à possível existência de processos autoimunes nos pacientes com a sintomatologia cardíaca.

Assim, os resultados do presente estudo, de certa forma, também corroboram esta hipótese, visto que a expressão de ambos os co-receptores CD4 e CD8 nas células extratímicas duplo-positivas poderia vir a diminuir seu limiar funcional de reconhecimento antigênico específico via MHC e/ou diminuir a necessidade de sinais co-estimulatórios fornecidos pelas células apresentadoras de antígeno na ativação das células T, ao aumentarem a afinidade do TCR pelo seu ligante [52,53]. Como resultado, as células T DP poderiam ser ativadas por baixas concentrações antigênicas como nas encontradas em infecções crônicas pelo parasita, e esta ativação diferenciada poderia induzir atividade citotóxica não apenas contra os antígenos parasitários, mas também em direção à células que expressam antígenos próprios, levando à formação de uma reação cruzada ou neoepítopos e assim favorecendo reações autoimunes no tecido afetado [24,27].

Neste sentido, estudos já afirmaram que a produção IFN- γ por células T DP também poderia estar envolvida com a indução de células protetoras/autorreativas de perfil Th1, e que independente de sua origem, as células T DP extratímicas podem estar associadas ao componente autoimune de desenvolvimento da forma cardíaca

da doença de Chagas, já que elas apresentam características de células monopositivas de fenótipo ativado e de memória, como a produção $IFN-\gamma$, expressão dos marcadores de ativação CD44 e CD69 e atividade citotóxica [26,27].

Desta forma, no presente estudo, considerando que o perfil Th1 por citotoxicidade parece ser o mais indicado a estar envolvido no mecanismo imunopatogênico de lesão tissular observado no estabelecimento da cardiopatia grave da doença de Chagas crônica, todavia sem descartar possíveis processos de autoimunidade [23], é possível que esta maior proporção de células T DP expressando os receptores para quimiocinas CCR1 e CCR3 encontradas no sangue periférico de pacientes com cardiopatia grave, represente uma subpopulação de células T estabelecida no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco desses pacientes, e esteja envolvidas tanto em mecanismos de autoimunidade quanto de citotoxicidade para a progressão clínica com sintomatologia neste grupo de indivíduos.

Por fim, após análises em modelos experimentais de susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* na ausência destas células específicas e realização de estudos longitudinais para avaliação de seus níveis em pacientes crônicos, poderia se estabelecer a importância das células T DP CCR1+ e CCR3+ como alvos terapêuticos e marcadores de progressão clínica da doença.

Conclusão

Com base em nossos achados, as células T DP através da expressão dos receptores para quimiocinas CCR1 e CCR3 encontram-se intimamente envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia grave da doença de Chagas, visto que

estiveram diferencialmente expressas neste grupo de pacientes. Desta forma, após estudo longitudinal, ratificamos a idéia de que os níveis destes subtipos celulares possam vir a ser utilizados como marcadores de forma clínica crônica e prognóstico da doença.

Agradecimentos *Os autores agradecem às médicas Cristina Tavares e Marisa Melo do PROCAPE/UPE pela seleção dos pacientes incluídos neste estudo e à Mineo Nakazawa do CPqAM/Fiocruz pelo suporte técnico. Os autores também agradecem ao Programa para Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Ferramentas da Saúde-PDTISFIOCRUZ pela utilização de suas instalações. Este estudo recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Edital nº 474926/2012-5) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes é pesquisador vinculado ao CNPq (No. 304543/2012-8). Durante o estudo, AS Melo recebeu bolsa de estudos da CAPES (06407432421) para realização de doutorado.*

Conflito de interesses *Os autores declaram não haver conflito de interesses.*

Referências

- [1] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26, 275-91, 2012. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- [2] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, MARIN-NETO J. A. Chagas disease. *Lancet*. 375, 1388–402, 2010. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- [3] ALBAREDA M. C. et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 18, 465–471, 2006. doi:10.1093/intimm/dxh387

- [4] ALBAREDA M. C. et al. Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4⁺ T Cells to Immune Senescence. *J Immunol.* 183, 4103-4108, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0900852
- [5] BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology?. *Braz J Med Biol Res.* 31, 127-131. 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>
- [6] BARROS-MAZON S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol.* 111, 137-145, 2004. doi:10.1016/j.clim.2004.01.002
- [7] CARDOSO G. M. et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci.* 11, 1158-1163, 2006. DOI: 10.2741/1870
- [8] GOMES J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71,1185-1193, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003
- [9] LORENA V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 72, 529-539. 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [10] MENEZES C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 137,129-138. 2004. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [11] SILVEIRA A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3⁺ cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol.* 70, 65-67. 2009. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.015
- [12] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁺CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62, 297-308. 2005. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x
- [13] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 145, 81–92. 2006. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x
- [14] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Strategy to asses the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 68, 516-525. 2008. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x
- [15] JUNQUEIRA C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 12, e29, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399410001560>
- [16] ANDRADE, D. V. et al. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 8, 7, e3010, 2014. Dóí: 10.1371/journal.pntd.0003010
- [16] LUSTER AD; ROTHENBERG, ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 62, 5, 620-633, 1997.

- [17] 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, Vol.104, n.1, p. 208-218, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900027>
- [18] REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48, 637–644, 1993. (PMID:8517482)
- [19] CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 94, 1, 253-255, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700042>
- [20] CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39, 41-54, 2006. doi:10.1080/08916930500485002
- [21] SOUZA, P.E. et al. T. cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 75, 1886–1894, 2007. doi: 10.1128/IAI.01931-06
- [22] DE ARAUJO F. F. et al. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 217, 768–777, 2012.
- [23] MORROT, A. et al. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Neglected Tropical Disease.* 5, 8, Article ID e1268, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001268
- [24] GIRALDO, N. A. et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic chagasic patients, *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 5, 8, Article ID e1294, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001294
- [25] PEREZ, A.R. et al. Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1262, 27–36, 2012. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06627.x
- [26] MORROT, A. et al. The Development of Unconventional Extrathymic Activated CD4+CD8+ T Cells in Chagas Disease. *ISRN Infectious Diseases*, v. 2013, 2013. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/801975>
- [27] SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 97, 2, 1, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/abc/v97n2s1/a01v97n2s1.pdf>
- [28] Pereira V.R.A. et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 4, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000400006>
- [29] SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury experimental T. cruzi- elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog* 8: e1002645. 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002645

- [30] PETRAY P., CORRAL, R., MECKERT, P.C., Laguens, R. Role of macrophage inflammatory protein- 1a (MIP-1a) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 83, 205–211, 2002.
- [31] TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulindeficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* 356: 338–340, 1992. doi:10.1038/356338a0
- [32] NAGIB, P. R. A., Dutra, W. O., Chiari, E., Machado, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD42CD82 T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol*, 116, 366–374, 2007.
- [33] BLUE, M, L. et al. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J Immunol* , 134, 2281–2286, 1985. <http://www.jimmunol.org/content/134/4/2281.short>
- [34] IWATANI, Y. et al. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4+CD8+ cells and CD3loTCR alpha beta loy-CD42CD82 cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 93, 430–436, 1993. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb08196.x
- [35] BERRIH, S. et al. Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* , 45, 1–8, 1981. PMCID: PMC1537262
- [36] PAREL, Y. et al. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* . 56, 3459–3467, 2007. doi: 10.1002/art.22927
- [37] BANG, K. et al. CD4+CD8+ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br J Dermatol*, 144, 1140–1147, 2002. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04223.x
- [38] NASCIMBENI , M. et al. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* , 104, 478–486, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-12-4395>
- [39] HOWE, R. et al. Phenotypic and functional characterization of HIV-1-specific CD4+CD8+ double-positive T cells in early and chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* , 50, 444–456, 2009. doi: 10.1097/QAI.0b013e31819aa8c4
- [40] Mizuki, M. et al. Phenotypical heterogeneity of CD4+CD8+ double-positive chronic T lymphoid leukemia. *Leukemia* , 12, 499–504, 1998. (PMID:9557607)
- [41] FLAMAND, L. et al. Activation of CD8+ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 3111–3116, 1998. <http://www.pnas.org/content/95/6/3111.short>
- [42] BLUE, M. L. et al. Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4+ cells in vitro. *J Immunol* , 137, 4, 202–7. 1986. <http://www.jimmunol.org/content/137/4/1202.short>
- [43] MENDES DA CRUZ, D.A. et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*, 5, 825–832. 1993. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457903001564>
- [44] LEITE DE MORAES, M. C. et al. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol*, 77, 95–98, 1992. PMCID: PMC1421586

- [45] GOTTILIEB, A. B. et al. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *Journal of Experimental Medicine*. 168, 941-48, 1998. doi: 10.1084/jem.168.3.941
- [46] KODALI, R. et al. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 706-715, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.012> [50] POPE et al., 2005)
- [47] CHOLLET-MARTIN, S. et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces os patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome, *Infection and Immunity*, 61, 11, 4553-59, 1993. <http://iai.asm.org/content/61/11/4553.short>
- [48] GOMES, J. A. S. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. *Infection and Immunity*. 73, 12, 7960-7966, 2005. doi: 10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005
- [49] CALZADA, J. E. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 58, 154–158, 2001. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2001.580302.x
- [50] RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 43, 305–11, 2006. doi: 10.1086/505395
- [51] SOUZA ET AL., 2014. Plasma chemokine as potencial biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease .Giovane Sousa¹, Juliana Gomes^{1,2}, Marcos Paulo Damásio², Rafaelle Fares³, Ana Chaves¹, Karine Ferreira², Nayara Medeiros², Maria do Carmo Nunes¹, Rodrigo Corrêa-Oliveira^{3,4} and Manoel Otávio Rocha. *The Journal of Immunology*. May 1, 2014 vol.192 (1 Supplement) 185.5.
- [52] BARBER, L. D., Parham, P. Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Cell Biology*. 9, 163–206, 1993. doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.001115
- [53] BRINK, R. et al. Visualizing the effects of antigen affinity on T-dependent B-cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*. 86, 1, 31–39, 2008. doi:10.1038/sj.icb.7100143

6 CONCLUSÕES

Os resultados observados em nosso estudo para quimiocinas e seus receptores permitiram diferenciar a resposta immune de pacientes com doença de Chagas crônica a partir da produção diferencial para:

- Células T CD4+CXCR5+ e CR4+CCR4+ por pacientes com cardiopatia leve em comparação aos assintomáticos;*
- Células T CD8+CCR1+ e CD8+CCR3+ por pacientes com cardiopatia severam em relação aos assintomáticos;*
- Células T CD4+CD8+CCR1+ e CD4+CD8+CCR3+ por pacientes com cardiopatia severam em relação aos assintomáticos;*
- CCL5 e CXCL8 por pacientes com cardiopatia severam em relação aos assintomáticos, e;*
- CXCL10 por pacientes com cardiopatia severam em relação aos com cardiopatia leve.*

Desta forma, ratificamos a idéia de que estes mediadores imunológicos estão intimamente envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica podendo virem a ser utilizados, após estudo longitudinal, como marcadores de forma clínica crônica e prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada. N. 153, **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 jun, 2004.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.70, p.467-77, 2001.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.63, p.721-6, 1985.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old Neglected disease. **Plos neglected tropical diseases**, San Francisco, v.8, i. 7, e3010, 2014.

ALIBERTI, J. C. S. et al. β -Chemokines Enhance Parasite Uptake and Promote Nitric Oxide-Dependent Microbiostatic Activity in Murine Inflammatory Macrophages Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.9, p.4819-26, 1999.

ALIBERTI, J. C. S. et al. Modulation of Chemokine Production and Inflammatory responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. **The American Journal of Pathology**, New York, v.158, n.4, p.1433-40, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, s.3, p.29, 2005.

BARROS-MAZON, S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v.111, n.1, p.137-145, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v.31, p.127-135, 1998.

BILATE, A. M. B. *Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas*, **Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo, v.8, n.3, p.86-90, 2007.

BONNY, K. M.; ENGMAN, D. M. *Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?*, **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v.8, n.6, p.510–18, 2008.

CALZADA, J. E. *Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy*. **Tissue Antigens**, Oxford, v.58, p.154–8, 2001.

CANÇADO, J. R. *Tratamento específico*. In: CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p.99-113, 1985.

CARNEIRO, M. *História da doença de Chagas*. Curitiba: s.n., 1963. 91p.

CHAGAS, C. *Tripanossomíase americana. Forma aguda da moléstia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.8, p.37-60, 1916.

CHOLLET-MARTIN, S. et al. *High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome*, **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p.4553-59, 1993.

COMERFORD, I.; MCCOLL, S. R. *Mini-review series: focus on chemokines*. **Immunology and Cell Biology**, London, v.89, p.183–184, 2011.

CORREA-OLIVEIRA, R. et al. *The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.1, p.253-5, 1999.

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, n.1, p.31-40, 2009.

COURA, J. C.; JUNQUEIRA, A. C. V. *Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.107, n.2, p.145-154, 2012.

CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, London, v.39, p.41-54, 2006.

DEL PUERTO, F. et al. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.6, n.3, p.e1587, 2012.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, s.1, p.S13-S22, 2007.

DOS-SANTOS, P.V.A. et al. Prevalence of CD8+ $\alpha\beta$ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes and Infection**, Paris, v.3, p.971-84, 2001.

DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.43, p.88-93, 1996.

DUTRA, W. O. et al. Cytokine mRNA Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.45, p.74-80, 1997.

DUTRA, W. O. et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells chagasic patients, respectively. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.51, p.91-97, 2000.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v.21, p.287-92, 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, Vol.104, n.1, p. 208-18, 2009.

FONSECA, S.G. et al. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8⁺ T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.63, n.2-3, p.362-71, 2007.

GIRONES, N., et al. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. **Current topics in microbiology and immunology**, Berlin, v.296, p.89–123, 2005.

GOMES, Y. M. *PCR and serodiagnosis in chronic Chagas' disease: biotechnological advances*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Clifton, v.66, p.107-119, 1997.

GOMES, J. A. S. *Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.73, n.12, p.7960-66, 2005.

GOTTILIEB, A. B. et al. *Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.168, p.941-48, 1998.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. *As quimiocinas e os seus receptores: Características e Funções Fisiológicas*. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v.24, p.967-76, 2011.

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

HARDISON, J. L. *The CC Chemokine Receptor 5 Is Important in Control of Parasite Replication and Acute Cardiac Inflammation following Infection with Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.1, p.135–143, 2006.

HUGGINGS, W. D. *Quadro Clínico: Fase Aguda*. In: MALTA, J. (Org). **Doença de Chagas**. São Paulo: Ed. Savier, 1996, p.39-42.

JUNQUEIRA, C. et al. *The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease*. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v.12, e29, 2010.

KODALI, R. et al. *Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells*. **Cardiovascular Research**, Oxford, v.69, n.3, p.706-15, 2005.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.128, n.5, p.2009-12, 1982.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, s.1, 2009.

LAUCELLA, S. A. et al. Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.189, n.5, p.909-18, 2004.

LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v.85, p.413-417, 1991.

LUSTER, A. D.; ROTHENBERG, M. E. Role of the chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v.62, p.620-33, 1997.

MACHADO F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. **Circulation**, Hagerstown, v.102, p.3003-8, 2000.

MACHADO, F. S. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.191, n.4, p.627-36, 2005.

MACHUCA, M. A. et al. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. **Human Immunology**, New York, v.75, p. 1210-5, 2014.

MARIN-NETO, J. A. 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**, St. Louis, v.156, p.37-43, 2008.

MARINO, A. P. M. P. et al. Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) Antagonist (Met-RANTES) Controls the Early Phase

of *Trypanosoma cruzi*–Elicited Myocarditis. **Circulation**. Hagerstown, v.110, p.1443-49, 2004.

MARINO, A.P.M.P. et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, s.1, 2005.

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**, Londres, v.137, n.1, p.129-138, 2004.

MENEZES C. A. S.; TEIXEIRA M. M.; DUTRA W. O. A resposta imunológica dos pacientes chagásicos. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>>. Acesso em: 20 maio 2010.

MONTALVÃO, F. Apoptotic lymphocytes treated with IgG from *Trypanosoma cruzi* infection increase TNF- α secretion and reduce parasite replication in macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.40, n.2, p.417–25, 2010.

MORGAN, J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.55, p.355–59, 1996.

OLIVEIRA, A. P. Genetic Susceptibility to Cardiac and Digestive Clinical Forms of Chronic Chagas Disease: Involvement of the CCR5 59029 A/G Polymorphism. **Plos One**, San Francisco, p.1-13, 2015.

OLIVEIRA JR. L. C. B. et al. Antigen-specific IL-4 and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, New York, v.170, p.41-53, 1996.

OLIVEIRA, K. B. et al. Involvement of chemokines and its receptors in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases, **Biosaúde**, Londrina, v.9, n. 1/2, p.41-64, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **EXECUTIVE BOARD** - Chagas disease: control and elimination. Provisional agenda item 4.14, EB124/17, 124th Session, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of Neglected Tropical Diseases (NTD) - Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/. Acesso em 02/03/2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas disease (American trypanosomiasis): fact sheet 340. Março de 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 23/11/2015.

OSTERMAYER, A. L. et al. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.44, s.2, p.108-21, 2011.

OTTAVIANI, C. et al. CD56(bright)CD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.36, p.118-28, 2006.

PEREIRA V.R.A.et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.33, n.4, 2000.

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

PETRAY, P. et al. Role of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Vancouver, v.83, n.3, p.205–11, 2002.

POPE, S. M. et al. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.175, n.8, p.5341-50, 2005.

PRIMAVERA, K. S. C. et al. Chagas' disease: IgA, IgM e IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.32, n.3, p.172-180, 1990.

PRIMAVERA, K. S. C. et al Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.10, p.2101-04, 1988.

RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease.

Clinical Infectious Diseases, Oxford, v.43, p.305–11, 2006.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, New York, v.375, e.9723, p.1319-1406, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. Philadelphia, v.26, p.275-91, 2012.

REIS, D. D. et al. Characterization of Inflammatory Infiltrates in Chronic Chagasic Myocardial Lesions: Presence of Tumor Necrosis Factor Cells and Dominance of Granzyme A+, CD8+ Lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 637-644, 1993.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SARMENTO, R. R.; RODRIGUES-JUNIOR V. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.45, n.1,p. 45-50, 2012.

RODRIGUES, C. M. et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.4, n.10, p.e846, 2010.

SATHLER-AVELAR. R. et al. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v.104, n.1, p. 246-251, 2009.

SIQUEIRA-BATISTA. Et al. Moléstia de Chagas. **Rubio**, 2a ed., Rio de Janeiro, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n.2, s.1, 2011.

SOUSA, R. S. et al. Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. **Plos One**, San Francisco, v.9, i.3, e87082, 2014.

SOUZA, J. B. T. Alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos. **Revista Augustus**, Rio de Janeiro, v.19, n.38, p.9-28, 2014.

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. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.72, n.9, p.5283-91, 2004.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, p.851-66, 2000.

TALVANI, A. et al. Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.189, p.214-20, 2004.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection, **Trends in parasitology**, v.18, n.6, p.262-65, 2002.

VILLALTA, F. et al. The Cysteine-Cysteine Family of Chemokines RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β Induce Trypanocidal Activity in Human Macrophages via Nitric Oxide. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, n.10, p.4690-95, 1998.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v.62, n.3, p.297-308, 2005.

ZAUZA, P. L.; BORGES-PEREIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-T. cruzi na evolução da cardiopatia chagásica, no período de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.4, n.5, p.399-405, 2001.

APÊNDICE A

Artigo 1

Differential chemokine production and expression of chemokine receptors in chronic Chagas disease patients

Adriene Siqueira de Melo^{a,d} – Email: adrienesmelo@gmail.com

Virginia Maria Barros de Lorena^{a,b} – Email: lorena@cpqam.fiocruz.br

Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti^{b,c} – Email: mgamelo@cardiol.br

Sílvia Marinho Martins^{b,c} – Email: s.m.martins@uol.com.br

Wilson de Oliveira Júnior^{b,c} – Email: woliveirajr@uol.com.br

Yara de Miranda Gomes^{a,b} – Email: yara@cpqam.fiocruz.br

Vláudia Maria Assis Costa^{d*} – Email: vlaudiacosta@uol.com.br

^aDepartamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife, Brazil,

^bPrograma Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^cAmbulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil.

^dDepartamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Hospital das Clínicas - Bl. A - Térreo, Av. Prof. Moraes Rego - s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil. Phone/Fax: +55 812126 8527.

E-mail address: vlaudiacosta@uol.com.br (V. M.A. Costa).

Abstract

Chemokines are immunological mediators potentially involved with establishing inflammatory infiltrate observed in the cardiomyopathy of chronic Chagas Disease. Thus, this study analyzed the production of chemokines and their receptors on the surface of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in patients with the indeterminate form and cardiac form with varying degrees of cardiac impairment. After the culture of whole blood and stimulation with epimastigote antigen, chemokines in the culture supernatant and its receptors on the surface of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were evaluated by flow cytometry. The CARD2 group showed higher levels of CD8⁺CCR1⁺ and CD8⁺CCR3⁺ T cells, a greater expression for CCR1 and CCR3, and greater production of CCL5 and CXCL8 than the IND Group. CARD2 also presented a greater production for CXCL10 than the CARD1 Group. Furthermore, CARD1 had higher levels for CD4⁺CXCR5⁺ and CD4⁺CCR4⁺ T cells, a greater expression for CXCR5 and a greater production for CXCL8 than the IND patients. It is possible that the lymphocyte subpopulations and chemokines found in this study are involved with the development and establishment of the cardiac manifestation in the individuals evaluated. Such markers, after a longitudinal study, can predict morbidity in the chronic phase of the disease.

Keywords: chronic Chagas disease; cardiomyopathy; chemokines; chemokine receptors.

Introduction

As it has a high morbidity, Chagas disease (CD) is a serious challenge for public health in regions where it is endemic [1]. Its chronic clinical manifestations range from an absence of symptoms and structural abnormalities (indeterminate form - IND) to cardiovascular (cardiac form - CARD) and/ or digestive (digestive form) disorders [2]. In order to understand the development mechanism of these different clinical manifestations observed, several studies have been conducted to clarify the role of the immune response of the host against *Trypanosoma cruzi* [3-14]. Thus, studies directly imply there is an exacerbated inflammatory process in the absence of immunomodulatory mechanisms as a causal agent of the tissue damage observed in the symptomatic forms [15].

Therefore, considering the great contribution that chemokines and their receptors make to the development of various inflammatory and chronic diseases [16-19], since they control, according to their subgroup expressed in the affected tissue, the type of inflammatory infiltrate that characterizes a particular disease [20], our objective in this study was to evaluate these immunological mediators in patients with chronic Chagas disease, in order to understand the inflammatory process established in the cardiac tissue of these individuals, and thus to contribute to identifying promising therapeutic targets as well as immunological markers of the chronic phase of the disease.

Methods

Study population

The selection of patients with chronic CD was conducted at the Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)—Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil. The inclusion criteria were: (1) a serological confirmation of Chagas disease ((Enzyme-linked immunosorbent assay/ELISA and/or immunofluorescence reaction/RIFI); (2) the clinical form being characterized by the patient's medical history, physical examination and clinical tests (electrocardiogram, chest X-ray, echodopplercardiography and oesophagogram), in accordance with the I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of the Chagas Disease cardiomyopathy [21]; (3) absence of gastrointestinal symptoms and comorbidities (hypertension, diabetes, thyroid disease and inflammatory and/or infectious diseases) and (4) absence of previous etiological treatment with benznidazole.

After the screening process, the 56 patients (thirty women and twenty-six men) were grouped as follows: an IND group ($n = 20$, average age 53 ± 11.84) of patients classified as stage A of cardiac involvement, with the chronic asymptomatic form of CD, i.e. those without current or former symptoms of heart failure (HF) and whose clinical tests were normal; one CARD1 group ($n = 20$, average age 64 ± 9.5) of patients classified as stage B1, with mild chronic cardiac form of CD, i.e. those with electrocardiographic abnormalities (conduction disorders or arrhythmias) but with normal global ventricular function; and one CARD2 group ($n = 16$, average age 59.6 ± 9.5) of patients classified as stage C, with severe chronic cardiac form of CD, i.e. those with previous or current symptoms of HF and who had ventricular dysfunction confirmed by echodopplercardiogram. The protocols described in this study were

approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings of CPqAM/Fiocruz (CAEE: 0032.0.095.000-10) as per the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983, and the individuals who agreed to participate signed a properly informed consent form before being included in the study.

Epimastigote antigen (EPI)

The antigen was obtained as described by Pereira et al. (2000) [22]. Briefly, epimastigotes of the Y strain of *T. cruzi*, grown in a liquid medium (Liver Infusion Tryptose) and then washed in saline solution (phosphate buffered saline-0.15 M PBS, pH 7.4) by centrifugation. The mass was resuspended in a protease inhibitor (1 mM Phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM ethylenediamine teracetic acid (EDTA), and the parasites were ruptured by a 4-cycle repetition process of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. The cellular lysate was centrifuged at 10,000 X *g* for 10min at 4°C and the supernatant subjected to further centrifugation at 100,000 X *g* for 60 minutes at 4°C. The protein concentration was estimated in the supernatant by using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories). Aliquots of the epimastigote antigen were stored at -70°C.

Cell Culture

After collecting blood in tubes containing sodium heparin (BD Vacutainer), 1 mL was cultured in the presence of 1 mL RPMI 1640 medium (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA), supplemented with L-glutamine, 1% of antibiotic (10,000 U penicillin, 10,000 U streptomycin; SIGMA-ALDRICH®) and 10% fetal bovine serum (SIGMA-ALDRICH®). The cultures were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 1 day, and stimulated with

phytohemagglutinin-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5µg/ml) (positive control), epimastigote antigen-EPI (25 µg/mL) and unstimulated culture was also performed.

Immunophenotyping

After the end of cell culture, the supernatant was removed and stored at -20°C for later chemokine quantification. The blood cells were treated with (20 mM) EDTA (SIGMA-ALDRICH®) and washed by centrifugation (300 X g / 5 min / RT) in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (SIGMA-ALDRICH®) and 0.1% sodium azide (SIGMA-ALDRICH®) (PBS-Wash).

The samples were immunostained with fluorescein isothiocyanate (FITC) - Conjugated anti-CD8 (clone: 3B5) (Caltag, Burlingame, CA, USA), peridinin-chlorofil protein complex (PerCP) conjugated anti-CD4 (clone: S3.5) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), alexa fluor (AF) conjugated anti-CCR1 (clone: 5354), anti-CCR3 (clone: SF8) and anti-CXCR5 (clone: PF8B2) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA), and phycoerythrin (PE) conjugated anti-CCR4 (clone: 161), anti-CCR5 (clone: 2D7/CCR5), anti-CXCR2 (clone: 6C6), anti-CXCR3 (clone: 1C6/CXCR3) and anti-CXCR4 (clone: 1D9) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA). After washings, the cells were stored at 4°C until acquired and analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometry Acquisition and Analysis

Immunostained samples were run in a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson), and a minimum of 20,000 events/sample collected. The acquisition strategy began by selecting the lymphocyte population gate by means of the dot plot Forward Scatter

Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC). To assess the frequency of the CD4⁺ T lymphocytes and the chemokine receptors, the statistical quadrant FL3 (CD4) versus FL2 (CCR1, CCR3 and CXCR5) or versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 and CXCR4) was analyzed. Similarly, to evaluate the frequency of the CD8⁺ T lymphocytes and the chemokine receptors, the statistical quadrant FL1 (CD8) versus FL2 (CCR1, CCR3 and CXCR5) or versus FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 and CXCR4) was analyzed. The mean intensity of fluorescence (MIF) was determined by histogram analysis. Data acquisition and analysis were performed using CellQuest Pro software.

Chemokine Quantification

The quantification was performed by Cytometric Bead Array (CBA) using the Human Chemokine kit (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations. Samples were run in a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson), and 2,500 events/sample collected. Data acquisition were performed using CellQuest Pro software and analysis using v3 Array FCAP software (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA).

Statistical Analysis

Bartlett's test for the homogeneity of variances was firstly applied. The p value was obtained by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. To evaluate high production the chi-square test was performed. A significance level of 5% ($\alpha=0.05$) was considered in all analyses. The softwares used were Excel 2010 and GraphPad Prism 5.0.

Results

Expression for chemokine receptors on CD4+ and CD8+ T lymphocytes.

We observed that CARD1 Group showed a higher proportion of CD4+CXCR5+ T cells (EPI) ($p=0.038$) and CD4+CCR4+ T cells (SE) ($p=0.038$) compared to IND patients (Figure 1 A-B). Furthermore, the MIF for the CXCR5 (EPI, $p=0.008$) (SE, $p=0.017$) was higher in CARD1 patients compared to IND Group (Figure 1 C-D).

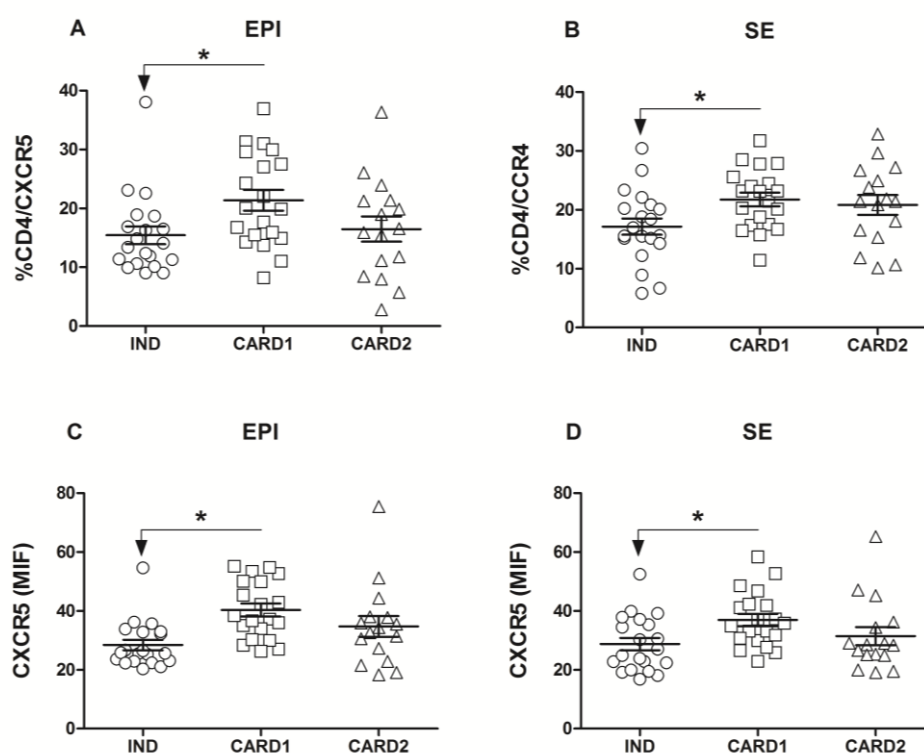


Figure 1. Levels for CD4+CXCR5+ T cells (A), CD4+CCR4+ T cells (B) and mean intensity of fluorescence (MIF) for CXCR5 (C-D), after stimulation with epimastigote antigen (EPI) and without antigenic stimulation (SE), in patients with the chronic forms of Chagas disease. Patients with the indeterminate clinical form (IND) (n=20), mild cardiac form (CARD1) (n=20) and severe cardiac form (CARD2) (n=16). The horizontal bars

represent the arithmetic mean and standard *error*. Kruskal-Wallis test followed by Dunns test was performed. Statistical differences (p -value <0.05), are indicated by arrows and by the symbol (*) in the Figure.

We also observed that CARD2 patients presented a higher proportion of CD8+ T cells expressing CCR1 (EPI) ($p=0.020$) and CCR3 (SE) ($p=0.014$) than the patients of the IND Group (Figure 2 A-B). Moreover, the MIF of CCR1 (EPI) ($p=0.016$) (SE) ($p=0.015$) and CCR3 (EPI) ($p=0.115$) (SE) ($p=0.030$), was increased in CARD2 group compared to the IND one (Figure 2 C-D).

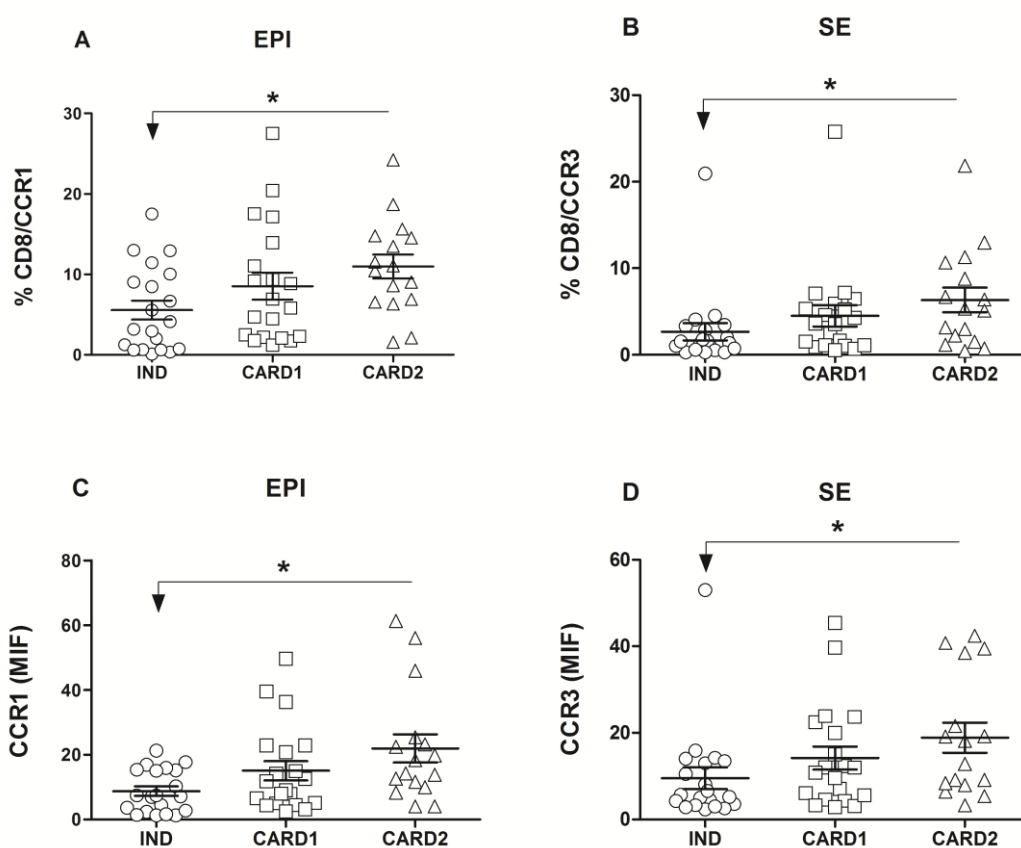


Figure 2. Levels for CD8+CCR1+ T cells (A), CD8+CCR3+ T cells (B); and mean intensity of fluorescence (MIF) for CCR1 and CCR3 (C-D), after stimulation with epimastigote antigen (EPI) and without antigenic stimulation (SE), in patients with the chronic forms of Chagas disease. Patients with the indeterminate clinical form (IND) (n=20), mild cardiac form (CARD1) (n=20) and severe cardiac form (CARD2) (n=16). The horizontal bars represent the arithmetic mean and standard *error*. Kruskal-Wallis test followed by Dunns test

was performed. Statistical differences (p -value <0.05), are indicated by arrows and by the symbol (*) in the Figure.

Chemokine production

Was observed that patients of the CARD2 group produced significantly higher levels of CXCL10 (EPI) ($p = 0.002$) than patients in the CARD1 (Figure 3).

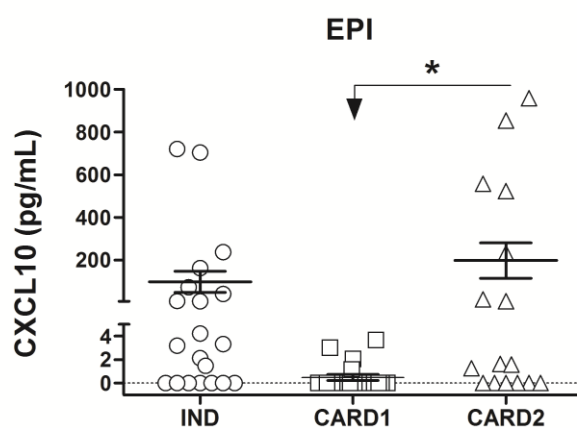


Figure 3. Production for CXCL10 in culture supernatant (pg/mL), after stimulation with epimastigote antigen (EPI) (A) and without antigenic stimulation (SE) (B), in patients with the chronic forms of Chagas disease. Patients with the indeterminate clinical form (IND) ($n=20$), mild cardiac form (CARD1) ($n=20$) and severe cardiac form (CARD2) ($n=16$). The horizontal bars represent the arithmetic mean and standard error. Kruskal-Wallis test followed by Dunns test was performed. Statistical differences (p -value <0.05), are indicated by arrows and by the symbol (*) in the Figure.

High chemokine production

In order to detect the high chemokine production, a cut-off was established corresponding to the average production values of all the Groups evaluated (IND, CARD1 and CARD2). The individuals were placed above or below this value, in accordance with their

production levels for chemokines. Thus, after stimulation with EPI, was observed that CARD2 Group had a high production for CCL5 (68.75%) ($p=0.042$) and CXCL8 (87.50%) ($p=0.022$) when compared to the IND, and a high production of CXCL10 (31.25%) ($p=0.011$) when compared to the CARD1 patients. We also observed a high production for CXCL8, by 80% of the CARD1 patients in relation to the IND group (Table 1).

Table 1. High production for chemokines by patients with chronic Chagas Disease with or without stimulation by EPI.

Chemokine	Global mean (cut-off)	High-producer (%)		
		IND	CARD1	CARD2
CCL5				
EPI	4,84 (1,86 - 7,56)	30,00	60,00	68,75 ^(a)
SE	4,07 (1,95 - 6,20)	45,00	60,00	43,75
CXCL8				
EPI	11,26 (1,47 - 14,80)	40,00	80,00 ^(a)	87,50 ^(a)
SE	8,01 (1,15 - 13,04)	50,00	45,00	62,50
CXCL10				
EPI	25,04 (13,81 - 46,01)	20,00	00,00	31,25 ^(b)
SE	28,35 (6,66 - 86,81)	45,00	20,00	31,25

Data are expressed as percentage of individuals displaying percentage of chemokine production higher or equal the global mean (cut-off) calculated using data from all groups.

EPI, epimastigote antigen, *SE*, without antigenic stimulation, *IND*, indeterminate clinical form, *CARD1*, mild cardiac form, *CARD2*, severe cardiac form.

The chi-square test was used, and statistical significance ($p\text{-value}<0.05$) is represented by superscript letter 'a' for comparisons with IND and by superscript letter 'b' for comparisons with CARD1.

Discussion

Investigations on the etiopathogenesis of the inflammatory cardiomyopathy observed in individuals chronically infected with CD look to mechanisms involving autoimmunity processes [23], genetics of the host [24], genetics of the parasite [25] and the immune response specific to the parasite elaborated by the host [26]. The mechanisms by which this response is established and regulated in infected individuals are not completely understood.

Several studies imply, to the development of tissue injuries and disease progresses, a immune response of predominantly Th1 profile with IFN- γ and TNF- α production [27-32] besides the action of different classes of immunoglobulins [33-37]. However, the contribution of other cell subpopulations and immunological mediators responsible for the activation, adhesion and chemo-attraction of these cells to the sites of inflammation, such as chemokines and their receptors, are also being investigated [38-40].

In this study, we observed that patients with a mild cardiopathy had a higher proportion of CD4+CXCR5+ T cells and a greater MIF for CCR5 than indeterminate patients.

It is well known that the CXCR5 and CCR7 receptors are responsible for the traffic and directioning of T and B lymphocytes to the follicular and perifollicular regions where they can interact in secondary lymphoid organs. Thus, CD4+CXCR5+ T cells have been reported as follicular helper (TFH) T cells activated after contact with the antigen and with an undefined polarity, a stage prior to the Th1/Th2 differentiation i.e. the Th0 stage [41]. It is known that this specific population of TFH cells is involved in the production of high-affinity immunoglobulins by B lymphocytes in the secondary follicles and has been implicated in the development of several autoimmune diseases. However, besides the CXCR5, this cell subtype expresses other functional markers (BCL6, ICOS, CD40L, CD44, OX40, BTLA, CCR7-, CD62-) [42] which are also necessary to correctly classify them. In addition,

CD4+CXCR5+FOXP3+ T cells with a high expression for ICOS, residing in the germinal centers and acting on the the T-B interaction, have been described as follicular regulatory (TFR) T cells, and have been reported to inhibit the action of TFH cells, regulating the influence of these cell in antibody production [43].

A high production for CXCL13 (the exclusive ligand for CXCR5) and CD4+CXCR5+ T cells, has also been observed in foci of tertiary lymphoid tissue (scattered around tissues with chronic inflammation) of autoimmune diseases such as lupus and rheumatoid arthritis. These tissue locations apart from the secondary lymphoid organs, could be sites of fundamental importance for the activation and differentiation of CD4+ CXCR5+ memory (TM) T cells in new effector cells [41].

Thus, according to the evidence found in our study, we suspect that these CD4+CXCR5+ T cells might be contributing to autoimmune processes in CARD1 individuals. However, due to the plurality of effector functions for these immunomarked cells, allied to the absence of previous reports for this cell subtype in CD, we consider that further investigations are necessary, evaluating a greater number of functional markers and defining wich sub-type of CD4+CXCR5+ T cells is predominant in these individuals. After these evaluations it would be possible infer correctly the participation of these cells in the immunopathological process of the disease.

In the presente study, was also observed a higher proportion of CD8+CCR1+ T cells, a higher MIF for CCR1 and a high production for CCL5, CXCL8 and CXCL10 by patients with severe cardiomiopathy. Furthermore, the group with mild cardiomiopathy showed a higher production for CXCL8.

With regard to the population of CD8+CCR1+ T cells found and chemokine production observed, studies suggest that the predominance of CD8+ T cells in the myocardial tissue of infected individuals is closely related to the profile of adhesion

molecules and chemokine receptors displayed by these cells [44]. Thus, in the cardiac tissue of animals infected by *T. cruzi*, have been found high levels of CXCL9, CXCL10 and CCL5 chemokines concomitant to the increase of the activated CD8⁺ T cells [45]. Furthermore, was observed that most CD8⁺ T cells present in the heart tissue of infected mice expresses the receptor CCR5 for β -chemokines [46].

Studies also showed that in knockout mice for IFN- γ , low levels of CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 and CXCL9 were found implying a significant reduction of the leukocyte myocardium infiltrate [47]. Similar results were also observed in knockout mice for CCR5 [48] as well as in animals treated with a CCR1/CCR5 (Met-Rantes) inhibitor [49]. This demonstrates the involvement of β -chemokines induced by IFN- γ in the myocardium T CD8⁺ cells inflammatory infiltrate, in a consequence of the differential recruitment of these cells by complementary chemokine receptors exhibited on their surface.

Studies in humans have already given evidence of high levels for chemokine receptors co-expression with inflammatory cytokines, namely as TH1 profile CCR5-IFN- γ , CXCR3-IFN- γ , and CXCR3-TNF- α , have already been found in chronic patients with heart disease compared to asymptomatic ones [50]. The investigation of genetic susceptibility showed a low expression for CCR5 in indeterminate patients [51] and a high expression for CCL2 by cardiac ones [52]. Moreover, high serum levels were also found for CCL2, CXCL9 and CXCL10 for cardiac patients, and the raising of these levels was associated with the worsening of cardiac function [53].

Therefore, in the present study, it is possible that this higher proportion of CD8⁺CCR1⁺ T cells in severe cardiomyopathy patients may represent the population of CD8⁺ T cells established in these patients heart tissue, giving evidence of an inflammatory

process mainly by the Th1 response and the production of chemokines induced by IFN- γ , which accounted for the attraction of T CD8⁺ cells via CCR1.

Interestingly, we also observed that severe cardiomyopathy individuals had higher levels of CD8⁺CCR3⁺ T cells and high MIF for CCR3 compared to indeterminate ones. Moreover, mild cardiomyopathy patients had higher levels of CD4⁺CCR4⁺ T cells compared to those indeterminate.

Conventionally, the CCR3 chemokine receptor is defined as having a Th2 profile and in many studies is implicated in the development of allergic manifestations [54, 55]. However, besides to the cell surface markers, to define exactly if a cell can be described as having a Th1 or Th2 profile, its effector functions must be evaluated, such as its production of cytokines. Furthermore, CCL5 which production is induced by IFN- γ , has CCR1, CCR3 and CCR5 receptors as binders [56]. Also, CCR3 and CCR5 together with selectins and adhesion molecules, play a fundamental role in the migration of effector memory T cells to inflammatory and granulomatous areas of autoimmune diseases [57]. Thus, as in present study, was also observed a greater production for CCL5 and elevated levels for CD8⁺CCR1⁺ T cells by patients with severe cardiomyopathy, we suggest that these highest levels of CD8⁺CCR3⁺ T also found in these patients, may come to corroborate the idea that this receptor may be acting jointly to the CCR1 to attract CD8⁺ T cells to the heart tissue by means of a Th1 response profile.

Concerning CCR4, it is known to be selectively expressed in Th2 and Th17 helper T cells and in regulatory T (Treg) cells concomitant to the respective production of IL-4, IL-17 and IL-10 [58]. However, high levels of CD4⁺CCR4⁺ T cells associated with IL-10 production have been observed and implied in the pathogenesis of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), ankylosing spondylitis (AS) and rheumatoid arthritis

(RA) [59]. In fact, studies have already proposed that the imbalance between the Th1 and Th2 profiles could be associated with the pathogenesis of SLE, where the high production of Th2-type cytokines, since they promote the production of antibodies by B cells, could play a key role in these patients developing autoantibodies [60].

In human CD, the involvement of a Th1 or Th2 profile, in establishing its chronic clinical forms has never been defined. The Th1 profile seems to be the most suitable one to be involved in the immunopathogenic mechanism of tissue damage. Nevertheless, autoimmune processes have not been discarded [15]. Thus, our findings corroborate the idea of an autoimmune mechanisms occurrence in patients with a mild cardiopathy which might be acting jointly with an inflammatory Th1 profile in establishing damage and a clinical progression in this group of patients.

Finally, chemokines receptors are not definitive markers of cell differentiation (as the example of the CRTH2⁺ evaluation for the Th2 profile), it would also be necessary to observe intracellular cytokine and chemokine production by these cells [61]. Therefore, without more specific markings, we can only infer which receptors could be acting preferentially in the migration of these cells to the areas of inflammation.

Conclusion

Based on chemokines production and the expression of chemokine receptors by T cells, the results observed in current study, enabled differentiate the immune response of asymptomatic patients from those with mild and severe cardiopathy of chronic CD. Thus, we confirm the idea that these immunological mediators are closely involved in the development of chronic Chagas cardiomyopathy and may come to be used, after a longitudinal study, as markers of chronic clinical form and disease prognosis.

Acknowledgements The authors are grateful to Doctors Cristina Tavares and Marisa Melo, from PROCAPE/UPE for selecting the patients included in this study and Mineo Nakazawa at CPqAM/Fiocruz for technical support. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities. This research study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Edital No. 474926/ 2012-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes is a fellow researcher of CNPq (No. 304543/2012-8). During the study, A.S. Melo received a CAPES (06407432421) Ph.D. scholarship.

Conflict of interest: none.

References

- [1] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26, 275-91, 2012. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- [2] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, MARIN-NETO J. A. Chagas disease. *Lancet*. 375, 1388–402, 2010. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- [3] ALBAREDA M. C. et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 18, 465–471, 2006. doi:10.1093/intimm/dxh387
- [4] ALBAREDA M. C. et al. Chronic Human Infection with Trypanosoma cruzi Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence. *J Immunol*. 183, 4103-4108, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0900852
- [5] BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology?. *Braz J Med Biol Res*. 31, 127-131. 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>
- [6] BARROS-MAZON S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol*. 111, 137-145, 2004. doi:10.1016/j.clim.2004.01.002
- [7] CARDOSO G. M. et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci*. 11, 1158-1163, 2006. DOI: 10.2741/1870

- [8] GOMES J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71,1185-1193, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003
- [9] LORENA V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 72, 529-539. 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [10] MENEZES C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 137,129-138. 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [11] SILVEIRA A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol.* 70, 65-67. 2009. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.015
- [12] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62, 297-308. 2005. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x
- [13] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 145, 81-92. 2006. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x
- [14] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 68, 516-525. 2008. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x
- [15] 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, Vol.104, n.1, p. 208-218, 2009.*
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900027>
- [16] Luster AD; Rothenberg, ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 62, 5, 620-633, 1997.
- [17] GOTTILIEB, A. B. et al. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *Journal of Experimental Medicine.* 168, 941-48, 1998. doi: 10.1084/jem.168.3.941
- [18] KODALI, R. et al. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovascular Research,* 706-715, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.012>
- [19] POPE, S. M. et al. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *The Journal of Immunology,* 175, 8, 5341-50, 2005. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5341
- [20] CHOLLET-MARTIN, S. et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome, *Infection and Immunity,* 61, 11, 4553-59, 1993. <http://iai.asm.org/content/61/11/4553.short>
- [21] SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 97, 2, 1, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/abc/v97n2s1/a01v97n2s1.pdf>

- [22] PEREIRA V.R.A. et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 4, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000400006>
- [23] BONNY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many?, *Current Molecular Medicine*, 8, 6, 510–518, 2008. doi: 10.2174/156652408785748004
- [24] DEL PUERTO, F. et al. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, 3, e1587, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001587
- [25] RODRIGUES, C. M. et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 10, e846, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000846
- [26] Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673-685. 2009. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x
- [27] DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology.* 43, 88-93, 1996. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-9.x
- [28] CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94, 1, 253-255, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700042>
- [29] 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.* 137, 1, 129-138, 2004. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [30] CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39, 41-54, 2006. doi:10.1080/08916930500485002
- [31] DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases.* 21, 287–292, 2008. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f88b80
- [32] LORENA V.M.B. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal of Immunology* 72, 6, 529–539 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [33] LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clinical and experimental immunology.* 85, 413-417, 1991. doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb05741.x
- [34] MORGAN, J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 55, 355–359, 1996. <http://europepmc.org/abstract/med/8916788>
- [35] ZAUZA, P.L.; BORGES-PEREIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-T. cruzi na evolução da cardiopatia chagásica, no período de 10 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 4, 5, 399-405, 2001. <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n5/5987.pdf>
- [36] GIRONES, N., et al. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease, *Current topics in microbiology and immunology.* 296, 89–123, 2005. doi: 10.1007/3-540-30791-5_6

- [37] Verçosa AFA, Lorena VMB, Carvalho CL et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal.* 21, 271-276, 2007. doi: 10.1002/jcla.20186
- [38] LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 104, 1, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900029>
- [39] MELO, A.S. et al. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine.* 58, 2, 210-212, 2012. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.008
- [40] BRAZ, S.C.M. et al. Increase in the Expression of CD4 + CD25+ Lymphocytic T Cells in the Indeterminate Clinical Form of Human Chagas Disease After Stimulation With Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*, *Journal of Clinical Immunology.* 34, 8, 991-998, 2014. doi: 10.1007/s10875-014-0092-6
- [41] MÜLLER, G.; LIPP, M. Shaping Up Adaptive Immunity: The Impact of CCR7 and CXCR5 on Lymphocyte Trafficking. *Microcirculation* . 10, 325–334, 2003. doi doi:10.1080/mic.10.3-4.325.334
- [42] MORITA, R. et al. Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity.* 34, 1, 28, 108–121, 2011. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.012
- [43] Sage, P.T., L.M. Francisco, C.V. Carman, and A.H. Sharpe. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat. Immunol.* 14:152–161, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2496>
- [44] LANNES-VIEIRA J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98, 3, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000300002>
- [45] DOS-SANTOS, P.V.A. et al. Prevalence of CD8+ $\alpha\beta$ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62LLowLFA-1HighVLA-4High activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes and Infection*, 3, 971-84, 2001. doi:10.1016/S1286-4579(01)01461-7
- [46] MARINO, A. P. M. P. et al. Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) Antagonist (Met-RANTES) Controls the Early Phase of *Trypanosoma cruzi*-Elicited Myocarditis. *Circulation.* 110, 1443-1449, 2004. doi: 10.1161/01.CIR.0000141561.15939.EC
- [47] ALIBERTI, J. C. S. et al. Modulation of Chemokine Production and Inflammatory responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. *The American Journal of Pathology.* 158, 4, 1433–1440, 2001. doi:10.1016/S0002-9440(10)64094-1
- [48] MACHADO, F. S. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Diseases.* 191, 4, 627-636, 2005. doi: 10.1086/427515
- [49] MARINO, A.P.M.P. et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 100, 1, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000900015>

- [50] GOMES, J. A. S. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. *Infection and Immunity*. 73, 12, 7960-7966, 2005. doi: 10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005
- [51] CALZADA, J. E. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 58, 154–158, 2001. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2001.580302.x
- [52] RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 43, 305–11, 2006. doi: 10.1086/505395
- [53] SOUZA, G. et al. Plasma chemokine as potencial biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease . *The Journal of Immunology*. 192 ,(1 Supplement) 185.5. 2014. http://www.jimmunol.org/content/192/1_Supplement/185.5.short
- [54] GERBER, B.O. et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Current Biology* . 7, 836–843, 1997. doi:10.1016/S0960-9822(06)00371-X
- [55] WANG, CR. et al. Increased circulating CCR3+ Type 2 Helper T cells in House Dust Mite-Sensitive Chinese Patients With Allergic Diseases. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 21, 205-201, 2003.
- [56] LAMPRECHT, P. et al. Heterogeneity of CD4+ and CD8+ memory T cells in localized and generalized Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res Ther* . 5, R25-R31. 2003. doi:10.1186/ar610
- [57] NISSINEN, R. et al. CCR3, CCR5, interleukin 4, and interferon gamma expression on synovial and peripheral T cells and monocytes in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* 30, (9), 1928-1934, 2003. <http://www.jrheum.org/content/30/9/1928.short>
- [58] YE H OO. et al. The Role of Chemokines in the Recruitment of Lymphocytes to the Liver. *Dig Dis*. 28, 31–44. 2010. doi: 10.1159/000282062
- [59] YANG, P.T. et al. Increased CCR4 expression on circulating CD4+ T cells in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 138, 342–347, 2004. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02617.x
- [60] YAMADA, M. et al. Selective Accumulation of CCR4 T Lymphocytes Into Renal Tissue of Patients With Lupus Nephritis, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 46, 3, 735–740, 2002. DOI 10.1002/art.10112
- [61] COSMI, L. et al. CCR2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease . *Eur. J. Immunol*. 30, 2972–2979. 2000. doi/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2972::AID-IMMU2972>3.0.CO;2-%23/pdf

28/01/2016

Gmail - Your recent submission to IMBIO



Adriene Siqueira de Melo <adrienesmelo@gmail.com>

Your recent submission to IMBIO

Immunobiology

25 de janeiro de 2016

<esubmissionsupport@elsevier.com>

03:08

Para: adrienesmelo@gmail.com

Dear Dr. Adriene Siqueira de Melo,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Immunobiology

Corresponding Author: Vláudia Costa

Co-Authors: Adriene Siqueira de Melo, Master; Virginia Maria Barros de Lorena, Doctorate; Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti, Master; Silvia Marinho Martins, Master; Wilson Oliveira Júnior, Master; Yara de Miranda Gomes, Doctorate;

Title: Differential chemokine production and expression of chemokine receptors in chronic Chagas disease patients

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at vlaudiacosta@uol.com.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/imbio/l.asp?i=16299&l=GHZFU4MF>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

APÊNDICE B

Artigo 2

Expression for chemokines receptors by CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in chronic Chagas disease patients

Adriene Siqueira de Melo^{a,d} – Email: adrienesmelo@gmail.com

Vláudia Maria Assis Costa^{d*} – Email: vlaudiacosta@uol.com.br

Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti^{b,c} – Email: mgamelo@cardiol.br

Sílvia Marinho Martins^{b,c} – Email: s.m.martins@uol.com.br

Wilson de Oliveira Júnior^{b,c} – Email: woliveirajr@uol.com.br

Yara de Miranda Gomes^{a,b} – Email: yara@cpqam.fiocruz.br

Virginia Maria Barros de Lorena^{a,b} – Email: lorena@cpqam.fiocruz.br

^aDepartamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife, Brazil,

^bPrograma Integrado de Doença de Chagas/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^cAmbulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil.

^dDepartamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Hospital das Clínicas - Bl. A - Térreo, Av. Prof. Moraes Rego - s/n. Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil. Phone/Fax: +55 812126 8527. E-mail address: vlaudiacosta@uol.com.br (V. M.A. Costa).

Abstract

Increased levels for double-positive CD4+CD8+ T cells with activated phenotype in chronic Chagas cardiomyopathy have raised questions on the role of these cells in the development of the cardiac lesions of disease. Given the importance of chemokines and their receptors for the migration and differential activation of leukocyte subpopulations, this study evaluated the expression for chemokine receptors on the surface of CD4+CD8+ T lymphocytes in patients with chronic Chagas Disease. Patients with the indeterminate form and cardiac form with varying degrees of cardiac impairment, were selected. After cultivation of whole blood and stimulation with epimastigote antigen, chemokines receptors on the surface of CD4+CD8+ T lymphocytes were evaluated by flow cytometry. The CARD2 group had higher levels of CD4+CD8+CCR1+ and CD4+CD8+CCR3+ T cells as well as greater expression for CCR3 than the IND group. It is possible that the lymphocyte populations found in this study may represent subpopulations of T cells that have been established in the inflammatory infiltrate of the heart tissue of these patients, recruited via CCR1 and CCR3 and which may be involved in both autoimmune and cytotoxicity mechanisms implicated in the progression with clinical symptoms in this group of individuals.

Key-words: chronic Chagas disease; cardiomyopathy; CD4+CD8+ T cells; chemokine receptors

Introduction

Chagas Disease (CD), caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, presents clinical chronic forms with a high severity and morbidity, which represents a major medical concern in regions where CD is endemic [1]. The clinical manifestations range from an absence of symptoms and structural abnormalities (indeterminate form - IND) to cardiovascular (cardiac form - CARD) and/ or digestive (digestive form) disorders [2]. In order to understand the mechanisms through which these different clinical scenarios develop, studies have been conducted to clarify the role of the immune response of the host regarding the infection caused by the parasite [3-14].

In the acute phase of CD, a robust immune response developed by the host is responsible for favoring the effective control of parasitaemia. This parasite control is achieved mainly by the action of cells of the innate immune response, as Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages, which release pro-inflammatory cytokines such as interferon IFN- γ and the tumor necrosis factor TNF- α [15]. Thus, the directioning and maintenance of the adaptive cellular and humoral immune response against *T. cruzi* in the chronic phase is orchestrated by this production of cytokines observed since its acute phase [16].

Therefore, studies imply that the permanence of an inflammatory process in the absence of immunomodulatory mechanisms is held to act as a causal agent of the tissue damage observed in symptomatic chronic forms [17]. Thus, it has been observed that activated CD8⁺ T cells expressing granzyme A and TNF- α predominate in the inflammatory infiltrate associated with the cardiac lesions of the disease [18]. Moreover, the association between the expression of IFN- γ and the occurrence of a severe cardiac disease was observed, thereby suggesting that, in the chronic phase, there is a relationship between the production of IFN- γ and the morbidity of the disease [19]. And it has already been shown that clones of T

cells derived from the inflammatory infiltrate of chagasic patients are excellent producers of IFN- γ [20].

On the other hand, the chronic indeterminate form of CD has been associated with the capability of a greater production of regulatory cytokines such as IL-10 and a lesser production of inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α [21, 22]. Thus, it is possible that the ability to produce IL-10 at later stages of the acute phase could be important to control the immune response and to allow the chronification of the disease without damaging the cardiac and/or digestive tissues. Thus, this fine balance between pro- and anti-inflammatory cytokines as well as an effective cell response would need to be achieved to maintain stable parasitic levels in the absence of tissue damage [16].

However, in human CD, although the Th1 profile appears to be the most likely involved in the immunopathogenic mechanism of tissue injury and in establishing its chronic clinical forms, neither the involvement of a Th1 or Th2 profile has been definitive, nor autoimmune mechanisms been discarded [17]. Thus, it is extremely important to continue evaluating cells and immunological mediators that may play key roles towards developing this immunopathology.

Interestingly, CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) activated T cells have been shown to predominate in individuals with the cardiac form of CD [23, 24]. The presence of these cells challenges current knowledge about T lymphocyte subpopulations involved in the adaptive immune response during *T. cruzi* infection. Despite the role of the *in vivo* activity of these cells remaining uncertain, the fact that they are potentially autoreactive may influence the immunopathological events observed in CD [25]. Thus, if verified that levels of DP T cells are correlated with the extension to the myocardium damage of the cardiac form, these cells could act as clinical markers and contribute to the development of alternative treatments.

Thus, studies evaluating the role of DP T cells can provide new knowledge about the parasite-host relationship established during infection by *T. cruzi* [26].

In view of the autoreactive potential that DP T cells may be exercising into the establishment of the cardiac form of CD and the differential migration of immune cells via the chemokine receptors, the purpose of this study was to evaluate the expression of chemokines receptors by DP T cells in patients with chronic CD. Thus, we set out to understand the possible differentiation in migratory mechanisms of these cells and their contribution to the inflammatory process established in the cardiac tissue in these individuals.

Methods

Study population

The selection of patients with chronic CD was conducted at the Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)—Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil. The inclusion criteria were: (1) a serological confirmation of Chagas disease ((Enzyme-linked immunosorbent assay/ELISA and/or immunofluorescence reaction/RIFI); (2) the clinical form being characterized by the patient's medical history, physical examination and clinical tests (electrocardiogram, chest X-ray, echodopplercardiography and oesophagogram), in accordance with the I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of the Chagas Disease cardiomyopathy [27]; (3) absence of gastrointestinal symptoms and comorbidities (hypertension, diabetes, thyroid disease and inflammatory and/or infectious diseases) and (4) absence of previous etiological treatment with benznidazole.

After the screening process, the 56 patients (thirty women and twenty-six men) were grouped as follows: an IND group ($n = 20$, average age 53 ± 11.84) of patients classified as stage A of cardiac involvement, with the chronic asymptomatic form of CD, i.e. those without current or former symptoms of heart failure (HF) and whose clinical tests were normal; one CARD1 group ($n = 20$, average age 64 ± 9.5) of patients classified as stage B1, with mild chronic cardiac form of CD, i.e. those with electrocardiographic abnormalities (conduction disorders or arrhythmias) but with normal global ventricular function; and one CARD2 group ($n = 16$, average age 59.6 ± 9.5) of patients classified as stage C, with severe chronic cardiac form of CD, i.e. those with previous or current symptoms of HF and who had ventricular dysfunction confirmed by echodopplercardiogram. The protocols described in this study were approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings of CPqAM/Fiocruz (CAEE: 0032.0.095.000-10) as per the 1975 Declaration of Helsinki, revised in 1983, and the individuals who agreed to participate signed a properly informed consent form before being included in the study.

Epimastigote antigen (EPI)

The antigen was obtained as described by Pereira et al. (2000) [28]. Briefly, epimasgotes of the Y strain of *T. cruzi*, grown in a liquid medium (Liver Infusion Tryptose) and then washed in saline solution (phosphate buffered saline-0.15 M PBS, pH 7.4) by centrifugation. The mass was resuspended in a protease inhibitor (1 mM Phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM ethylenediamine teracetic acid (EDTA), and the parasites were ruptured by a 4-cycle repetition process of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. The cellular lysate was centrifuged at 10,000 X *g* for 10min at 4°C and the supernatant subjected to further centrifugation at 100,000 X *g* for 60 minutes at 4°C. The

protein concentration was estimated in the supernatant by using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories). Aliquots of the epimastigote antigen were stored at -70°C.

Cell Culture

After collecting blood in tubes containing sodium heparin (BD Vacutainer), 1 mL was cultured in the presence of 1 mL RPMI 1640 medium (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA), supplemented with L-glutamine, 1% of antibiotic (10,000 U penicillin, 10,000 U streptomycin; SIGMA-ALDRICH®) and 10% fetal bovine serum (SIGMA-ALDRICH®). The cultures were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 1 day, and stimulated with phytohemagglutinin-PHA (GIBCO, Saranac, NY, USA) (5µg/ml) (positive control), epimastigote antigen-EPI (25 µg/mL) and unstimulated culture (SE) was also performed.

Immunophenotyping

After the end of cell culture, the blood cells were treated with (20 mM) EDTA (SIGMA-ALDRICH®), followed by washing by centrifugation (300g / 5 min / RT) in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (SIGMA-ALDRICH®) and 0.1% Sodium azide (SIGMA-ALDRICH®) (PBS-Wash).

The samples were immunostained with fluorescein isothiocyanate (FITC) - Conjugated anti-CD8 (clone: 3B5) (Caltag, Burlingame, CA, USA), peridinin-chlorofil protein complex (PerCP) conjugated anti-CD4 (clone: S3.5) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), alexa fluor (AF) conjugated anti-CCR1 (clone: 5354), anti-CCR3 (clone: SF8) and anti-CXCR5 (clone: PF8B2) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA), and phycoerythrin (PE) conjugated anti-CCR4 (clone: 161), anti-CCR5 (clone: 2D7/CCR5), anti-CXCR2 (clone:

6C6), anti-CXCR3 (clone: 1C6/CXCR3) and anti-CXCR4 (clone: 1D9) (BD™, Franklin Lakes, NJ, USA). After washings, the cells were stored at 4°C until acquired and analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometry Acquisition and Analysis

Immunostained samples were run in a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson), and a minimum of 20,000 events/sample collected. The acquisition strategy began by selecting the lymphocyte population gate by means of the dot plot Forward Scatter Channel (FSC) versus Side Scatter Channel (SSC). To assess the frequency of the CD4+CD8+ T lymphocytes and the chemokine receptors, first of all, the statistical quadrant FL3 (CD4) versus FL1 (CD8) of the population of DP T cells in the dot plots (R2 window) was analyzed. Thereafter, the window of interest R2 in the FL3 versus FL1 graph was selected, and FL2 (CCR1, CCR3 and CXCR5) or FL4 (CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 and CXCR4) versus FL1 two-bidimensional graphs were obtained. The mean intensity of fluorescence (MIF) was determined by histogram analysis. Data acquisition and analysis were performed using CellQuest Pro software.

Statistical Analysis

Bartlett's test for the homogeneity of variances was firstly applied. The p value was obtained by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. To evaluate high expression the chi-square test was performed. A significance level of 5% ($\alpha=0.05$) was considered in all analyses. The software used were Excel 2010 and GraphPad Prism 5.0.

Results

Chemokine receptors expression on CD4+CD8+ T lymphocytes.

We observed that CARD2 group showed a greater proportion of DP T cells expressing CCR1 (EPI) ($p=0.041$) and CCR3 (SE) ($p=0.038$) than the IND Group (Figure 1 A-B).

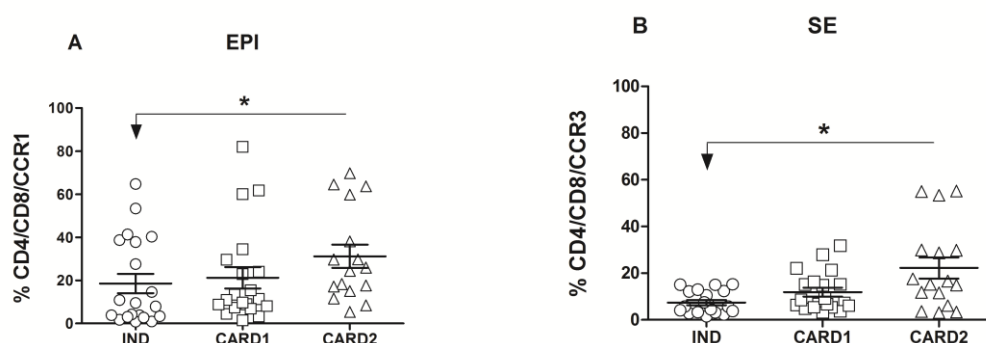


Figure 1. Levels for CCR1+ (A) and CCR3 (B) expression on CD4+CD8+ T cells, after stimulation with epimastigote antigen (EPI) and without antigenic stimulation (SE), in patients with the chronic forms of Chagas disease. Patients with the indeterminate clinical form (IND) (n=20), mild cardiac form (CARD1) (n=20) and severe cardiac form (CARD2) (n=16). The horizontal bars represent the arithmetic mean and standard error. Kruskal-Wallis test followed by Dunns test was performed. Statistical differences (p -value<0.05), are indicated by arrows and by the symbol (*) in the Figure.

High expression for chemokine receptors on CD4+CD8+ T lymphocytes

In order to detect the high expression for chemokine receptors, a cut-off was established corresponding to the average expression values of all the Groups evaluated (IND, CARD1 and CARD2). The individuals were placed above or below this value, in accordance with their expression levels for the receptors. Thus, was observed a high expression for the

CCR3 on DP T cells (SE) ($p=0.001$), by 62.5% of the CARD2 individuals in comparison to the IND Group (Table 1).

Table 1. High expression for CCR3 on CD4+CD8+ T cells by patients with chronic Chagas disease with or without stimulation by EPI.

CD4+CD8+ T Cells	Global mean (cut-off)	High-producer (%)		
		IND	CARD1	CARD2
CCR3+				
EPI	16,70 (1,93 - 90,45)	25,00	40,00	38,00
SE	13,29 (1,58 - 55,20)	10,00	40,00	62,50*

Data are expressed as percentage of individuals displaying percentage of cells higher or equal the global mean (cut-off) calculated using data from all groups.

EPI, epimastigote antigen, *SE*, without antigenic stimulation, *IND*, indeterminate clinical form, *CARD1*, mild cardiac form, *CARD2*, severe cardiac form.

The chi-square test was used, and statistical significance ($p\text{-value}<0.05$) is represented by the symbol (*) for comparisons with IND.

Discussion

Cell infiltrate associated with myocarditis observed in the acute *T. cruzi* infection is induced by a polarized Th1-type response and high production for IL-6, IL-1, IFN- γ and TNF- α [29, 30], which influences the expression of chemokines and adhesion molecules in the affected tissues. While this inflammatory reaction controls the parasite replication and parasitism, its persistence with the disease chronification is the major cause of damage to the tissues, resulting in morbidity and mortality for the individuals affected. [18]

During the infection, most of the mononuclear cells recruited and found in the inflammatory infiltrate around the cardiomyocytes are CD8⁺ T lymphocytes. In fact, mice deficient in inflammatory cytokines and in CD8⁺ T cells are susceptible to the infection with *T. cruzi*. [31] The CD4⁺ T cells also play an important role in orchestrating the immune response via the production of cytokines. Less common, but functionally relevant, other cell T subpopulations such as the double-negative CD4-CD8- and the DP T cells have also been described as active in the immune response to *T. cruzi*, though their functions are not completely understood [26,32].

DP T cells represent a thymus subpopulation, a precursor of CD4⁺ or CD8⁺ T monopositives (MP) cells, with a distribution regarded until recently as restricted to the thymus [26]. However, it is known that in healthy individuals, the circulating DP T cells represent about 1-3% of the total population of T lymphocytes [33] and that the frequency of these cells can be increased in various inflammatory disorders [34-37].

Studies also report an increased frequency for DP T cells in chronic and infectious human diseases with an antigenic persistence [38, 39]. Thus, it has been observed that the percentage of DP T cells expressing activation markers was increased in chronic Chagas patients compared to control subjects, including individuals without Chagas cardiomyopathy [25].

With regard to these peripheral DP T cells origin, experimental data indicate both the occurrence of an escape of these cells from the thymus [40] and a later differentiation of CD4⁺ or CD8⁺ MP T cells after exhaustive antigenic stimulation [41, 42]. Therefore, studies have shown an association, in mice, between thymic atrophy with severe depletion of CD4⁺CD8⁺ thymocytes and an increase in up to 16-fold the number of these cells found in the periphery (subcutaneous lymph nodes) after acute infection by *T. cruzi* [43, 44], which supports the theory of "thymic escape". However, the expression of the "second" correceptor

by MP T lymphocyte as a consequence of continuous antigenic stimulation also appears feasible, given the high degree of activation found in these cells by some studies [25]. Nevertheless, further studies are needed to determine the source of these cells in CD patients. Therefore, their detection in the peripheral blood of murine models of *T. cruzi* infection and in individuals with CD could raise new questions about their importance in the pathogenesis of this important disease.

In the same context, chemokines and their receptors represent immune response mediators involved in vascular permeability, attraction, migration and activation of immune cells. Thus, they have a key involvement in the development of various inflammatory and chronic diseases [16][45-47], since the type of observed cellular infiltrate, is controlled, in part, by its subgroup expressed in the affected tissue.

In the human CD, high levels for chemokine receptors co-expression with inflammatory cytokines, namely as TH1 profile CCR5-IFN- γ , CXCR3-IFN- γ , and CXCR3-TNF- α , have already been found in chronic patients with heart disease compared to asymptomatic ones [48]. The investigation of genetic susceptibility showed a low expression for CCR5 in indeterminate patients [49] and a high expression for CCL2 by cardiac ones [50]. Moreover, high serum levels were also found for CCL2, CXCL9 and CXCL10 for cardiac patients, and the raising of these levels was associated with the worsening of cardiac function [51]. This indicates that the chemokine and their receptors are also involved with the precocious development of CD cardiomyopathy on recruiting specific subpopulations of cells to the affected tissues.

Thus, in this study, the expression for chemokine receptors by DP T cells of chronic CD patients, demonstrated that individuals with severe heart cardiomyopathy presented significantly higher levels for the CCR1 and CCR3 receptors for these cells than the indeterminate ones.

Interestingly, similar results were found in another study conducted by our group, in which we observed that the cardiac patients presented higher levels for CD8⁺ MP T cells expressing CCR1 and CCR3 than the indeterminate ones (manuscript in preparation).

These results were in agreement with the literature, since it is proposed that the maintenance of the inflammatory process established in the cardiac tissue of chronic CD patients is mainly due to the Th1 response and the production of chemokines induced by IFN- γ . Therefore, with the intermediate of the correspondent chemokine receptors in target cells, such as CCR1 and CCR3, these CD8⁺ MP T cells and the DP T cells could be easily and differentially recruited to the cardiac tissue of these patients.

Accordingly, studies have already demonstrated a high expression for perforin in peripheral DP T cells by chagasic patients in general. However, only the symptomatic ones presented an increase rate of this enzyme degranulation. Furthermore, the migratory capacity of DP T cells to cardiac tissue was also observed [25].

Thus, considering that cells found in peripheral blood potentially reflects the inflammatory infiltrate being maintained in cardiac tissue, it would be possible to associate a cytotoxic action for these peripheral DP T cells found in this study to the heart damage observed in the individuals evaluated.

Also, in the same aforementioned study conducted by our group, was observed a greater proportion of CD4⁺ MP T cells expressing CXCR5 and CCR4 in cardiac patients compared to indeterminate ones, and was associated to the possible existence of autoimmune processes in patients with cardiac symptoms.

In this regard, the results of the present study, in part, corroborate this hypothesis, since the expression of both the CD4 and CD8 co-receptors on the DP T cells could decrease its functional threshold for antigen recognition via MHC and/or reduce the need for co-stimulatory signals provided by the antigen-presenting cells in the activation of the T cells,

increasing the affinity of the TCR by its ligand [52, 53]. As a result, the DP T cells could be activated by low antigen concentrations as found in individuals with chronic CD, and this differentiated activation could induce cytotoxic activity, not only against parasite antigens, but also towards cells expressing own antigens, thereby leading to formation of a cross-reaction or neopeptides and favoring autoimmune reactions in the tissue affected [24, 27].

Accordingly, studies have already stated that the IFN- γ production by DP T cells could also be involved with the induction of protective/autoreactive Th1 cells, and regardless their origin, DP T cells could be associated with the autoimmune component of the cardiac form of CD, since they present characteristics of activated and memory MP T cells, such as IFN- γ production, CD44 and CD69 expression and cytotoxic activity [26, 27].

Thus, in this study, the Th1 profile seems to be the most likely involved in the immunopathogenic mechanism of tissue damage observed in the serious cardiomyopathy of chronic CD, but without discarding possible autoimmune processes [23]. It is possible that the greater proportion of DP T cells expressing CCR1 and CCR3 found in the peripheral blood of patients with severe cardiomyopathy, may represent a subpopulation of T cells established in the inflammatory infiltrate of the cardiac tissue of these patients, and that is involved in both mechanisms of auto-immunity and of cytotoxicity for the disease clinical progression with symptoms in this group of individuals.

Finally, after investigations about susceptibility to *T. cruzi* infection in the absence of these specific cells, and after longitudinal studies to assess their levels in chronic CD patients, the importance of CCR1⁺ and CCR3⁺ DP T cells as therapeutic targets and clinical progression markers could be established.

Conclusion

Based on our findings, the DP T cells expressing the chemokines receptors CCR1 and CCR3 are intimately involved in the development of the severe cardiomyopathy of CD, given that they were differentially expressed in this group of patients. Thus, after a longitudinal study, we ratified the idea that these cell sub-types may come to be used as markers of a chronic clinical form and the disease prognosis.

Acknowledgements The authors are grateful to Doctors Cristina Tavares and Marisa Melo, from PROCAPE/UPE for selecting the patients included in this study and Mineo Nakazawa at CPqAM/Fiocruz for technical support. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities. This research study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Edital No. 474926/ 2012-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Y.M. Gomes is a fellow researcher of CNPq (No. 304543/2012-8). During the study, A.S. Melo received a CAPES (06407432421) Ph.D. scholarship.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26, 275-91, 2012. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- [2] RASSI JÚNIOR A, RASSI A, MARIN-NETO J. A. Chagas disease. *Lancet*. 375, 1388–402, 2010. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- [3] ALBAREDA M. C. et al. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 18, 465–471, 2006. doi:10.1093/intimm/dxh387
- [4] ALBAREDA M. C. et al. Chronic Human Infection with Trypanosoma cruzi Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence. *J Immunol*. 183, 4103-4108, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0900852

- [5] BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. et al. IFN-g in human Chagas' disease: protection or pathology?. *Braz J Med Biol Res.* 31, 127-131. 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100017>
- [6] BARROS-MAZON S. et al. Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol.* 111, 137-145, 2004. doi:10.1016/j.clim.2004.01.002
- [7] CARDOSO G. M. et al. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci.* 11, 1158-1163, 2006. DOI: 10.2741/1870
- [8] GOMES J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71,1185-1193, 2003. doi: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003
- [9] LORENA V. M. B. et al. Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 72, 529-539. 2010. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x
- [10] MENEZES C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 137,129-138. 2004. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x
- [11] SILVEIRA A. B. M. et al. Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol.* 70, 65-67. 2009. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.015
- [12] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 62, 297-308. 2005. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x
- [13] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 145, 81-92. 2006. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x
- [14] VITELLI-AVELAR D. M. et al. Strategy to asses the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 68, 516-525. 2008. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x
- [15] JUNQUEIRA C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 12, e29, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399410001560>
- [16] ANDRADE, D. V. et al. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 8, 7, e3010, 2014. Dóí: 10.1371/journal.pntd.0003010
- [16] LUSTER AD; ROTHENBERG, ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 62, 5, 620-633, 1997.
- [17] 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, Vol.104, n.1, p. 208-218, 2009.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900027>

- [18] REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48, 637–644, 1993. (PMID:8517482)
- [19] CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human chagasic disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94, 1, 253-255, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700042>
- [20] CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 39, 41-54, 2006. doi:10.1080/08916930500485002
- [21] SOUZA, P.E. et al. T. cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 75, 1886–1894, 2007. doi: 10.1128/IAI.01931-06
- [22] DE ARAUJO F. F. et al. Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 217, 768–777, 2012.
- [23] MORROT, A. et al. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Neglected Tropical Disease.* 5, 8, Article ID e1268, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001268
- [24] GIRALDO, N. A. et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic chagasic patients, *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 5, 8, Article ID e1294, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001294
- [25] PEREZ, A.R. et al. Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1262, 27–36, 2012. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06627.x
- [26] MORROT, A. et al. The Development of Unconventional Extrathymic Activated CD4+CD8+ T Cells in Chagas Disease. *ISRN Infectious Diseases*, v. 2013, 2013. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/801975>
- [27] SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 97, 2, 1, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/abc/v97n2s1/a01v97n2s1.pdf>
- [28] Pereira V.R.A. et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 4, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000400006>
- [29] SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury experimental T. cruzi- elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog* 8: e1002645. 2012. doi: 10.1371/journal.ppat.1002645
- [30] PETRAY P., CORRAL, R., MECKERT, P.C., Laguens, R. Role of macrophage inflammatory protein- 1a (MIP-1a) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 83, 205–211, 2002.
- [31] TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulindeficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* 356: 338–340, 1992. doi:10.1038/356338a0
- [32] NAGIB, P. R. A., Dutra, W. O., Chiari, E., Machado, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD42CD82 T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol*, 116, 366–374, 2007.

- [33] BLUE, M. L. et al. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J Immunol* , 134, 2281–2286, 1985. <http://www.jimmunol.org/content/134/4/2281.short>
- [34] IWATANI, Y. et al. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4+CD8+ cells and CD3loTCR alpha beta loy-CD42CD82 cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 93, 430–436, 1993. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb08196.x
- [35] BERRIH, S. et al. Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* , 45, 1–8, 1981. PMID: PMC1537262
- [36] PAREL, Y. et al. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* . 56, 3459–3467, 2007. doi: 10.1002/art.22927
- [37] BANG, K. et al. CD4+CD8+ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br J Dermatol*, 144, 1140–1147, 2002. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04223.x
- [38] NASCIMBENI, M. et al. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* , 104, 478–486, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-12-4395>
- [39] HOWE, R. et al. Phenotypic and functional characterization of HIV-1-specific CD4+CD8+ double-positive T cells in early and chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* , 50, 444–456, 2009. doi: 10.1097/QAI.0b013e31819aa8c4
- [40] Mizuki, M. et al. Phenotypical heterogeneity of CD4+CD8+ double-positive chronic T lymphoid leukemia. *Leukemia* , 12, 499–504, 1998. (PMID:9557607)
- [41] FLAMAND, L. et al. Activation of CD8+ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 3111–3116, 1998. <http://www.pnas.org/content/95/6/3111.short>
- [42] BLUE, M. L. et al. Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4+ cells in vitro. *J Immunol* , 137, 4, 202–7. 1986. <http://www.jimmunol.org/content/137/4/1202.short>
- [43] MENDES DA CRUZ, D.A. et al. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*, 5, 825–832. 1993. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457903001564>
- [44] LEITE DE MORAES, M. C. et al. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol*, 77, 95–98, 1992. PMID: PMC1421586
- [45] GOTTLIEB, A. B. et al. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *Journal of Experimental Medicine*. 168, 941-48, 1998. doi: 10.1084/jem.168.3.941
- [46] KODALI, R. et al. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 706-715, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.012> [50] POPE et al., 2005)
- [47] CHOLLET-MARTIN, S. et al. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome, *Infection and Immunity*, 61, 11, 4553-59, 1993. <http://iai.asm.org/content/61/11/4553.short>

- [48] GOMES, J. A. S. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. *Infection and Immunity*. 73, 12, 7960-7966, 2005. doi: 10.1128/IAI.73.12.7960-7966.2005
- [49] CALZADA, J. E. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*. 58, 154–158, 2001. DOI: 10.1034/j.1399-0039.2001.580302.x
- [50] RAMASAWMY, R. et al. The Monocyte Chemoattractant Protein–1 Gene Polymorphism Is Associated with Cardiomyopathy in Human Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 43, 305–11, 2006. doi: 10.1086/505395
- [51] SOUZA ET AL., 2014. Plasma chemokine as potencial biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease .Giovane Sousa¹, Juliana Gomes^{1,2}, Marcos Paulo Damásio², Rafaelle Fares³, Ana Chaves¹, Karine Ferreira², Nayara Medeiros², Maria do Carmo Nunes¹, Rodrigo Corrêa-Oliveira^{3,4} and Manoel Otávio Rocha. *The Journal of Immunology*. May 1, 2014 vol.192 (1 Supplement) 185.5.
- [52] BARBER, L. D., Parham, P. Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Cell Biology*. 9, 163–206, 1993. doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.001115
- [53] BRINK, R. et al. Visualizing the effects of antigen affinity on T-dependent B-cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*. 86, 1, 31–39, 2008. doi:10.1038/sj.icb.7100143

25/01/2016

Gmail - Your recent submission to IMBIO



Adriene Siqueira de Melo <adrienesmelo@gmail.com>

Your recent submission to IMBIO

Immunobiology

25 de janeiro de 2016

<esubmissionsupport@elsevier.com>

03:08

Para: adrienesmelo@gmail.com

Dear Dr. Adriene Siqueira de Melo,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Immunobiology

Corresponding Author: Vláudia Costa

Co-Authors: Adriene Siqueira de Melo, Master; Maria da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti, Master; Silvia Marinho Martins, Master; Wilson Oliveira Júnior, Master; Yara de Miranda Gomes, Doctorate; Virginia Maria Barros de Lorena, Doctorate

Title: Expression for chemokines receptors by CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in chronic Chagas disease patients

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at vlaudiacosta@uol.com.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/imbio/l.asp?i=16305&l=6CZCAK9L>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

ANEXO A

Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PORTADOR
DE *Trypanosoma cruzi***

Título de projeto: *Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de Trypanosoma cruzi*

Eu, _____,

RG _____, residente na rua _____

_____, n. _____

bairro _____, município _____, Estado

_____, usuário do (s) telefone (s) () _____, aceito

participar desse estudo, cujo objetivo é analisar células do sangue diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas (antígenos). Fui informado que como portador da doença de Chagas terei até seis colheres de chá de meu sangue (30 ml) coletadas 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). Fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20C. Também fui informado que o meu sangue será cultivado e avaliado quanto à produção de citocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças), quando em contato com os antígenos acima citados. Fui informado ainda que, se tais antígenos funcionarem como produtores de um padrão de citocinas nas formas clínicas crônicas da doença serão de grande auxílio para geração de conhecimento e futuramente para orientar a conduta médica relacionada ao tratamento do paciente. Também fui informado que os resultados dos meus exames clínicos como raio-X, eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através de meu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores e meu médico. Além disso, também responderei a um formulário de pesquisa. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa e que autorizo que sejam

armazenadas amostras biológicas para utilização posterior. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento de participar da pesquisa sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não receberei nenhuma compensação financeira para participar deste estudo. Além disso, fui informado que participando ou não dessa pesquisa meu atendimento no ambulatório, bem como meu tratamento continuará acontecendo normalmente.

Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador e outra comigo.

Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Data: ____ / ____ / ____

_____	_____
Paciente	Assinatura
_____	_____
Testemunha	Assinatura
_____	_____
Responsável pelo projeto	Assinatura

Responsáveis principais pelo projeto:

Yara M. Gomes (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2559/ 2101-2674

Virginia M. Barros de Lorena (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9965-1663

Adriene S. Melo (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9734-4694

Ana Karine Soares (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 8692-1419

Suellen C. M. Braz (CPqAM/FIOCRUZ) Telefone: 2101-2566/ 9127-1868

Maria da Glória de Melo (HUOC/UPE) Telefone: 2101-1441/ 9976-5398

ANEXO B

Carta de aprovação do Comitê de Ética



Título do Projeto: "Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de Chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*."

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/05/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 33/10

Registro no CAAE: 0032.0.095.000-10

PARECER Nº 34/2010

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 07 de julho de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de julho de 2010.



Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0453375
CPqAM / FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 07/07/2011.

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

