



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

TIAGO RIBEIRO DE ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE IL-10, IFN- γ E GRANZIMA B NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

Recife
2019

TIAGO RIBEIRO DE ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE IL-10, IFN- γ E GRANZIMA B NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

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

Área de concentração: Protozoonoses.

Orientadora: Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena.

(Instituto Aggeu Magalhães - IAM/Fiocruz)

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

A779a Arruda, Tiago Ribeiro de
Avaliação de IL-10, IFN- γ e Granzima B na cardiopatia chagásica crônica/ Tiago Ribeiro de Arruda. – 2019.
58 f.; il.

Orientadora: Virginia Maria Barros de Lorena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Interleucina-10. 2. Interferon gama. 3. Granzima B. 4. Cardiomiopatia chagásica. 5. Doença de Chagas. I. Lorena, Virginia Maria Barros de (orientadora). II. Título.

616.9792 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 272)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

TIAGO RIBEIRO DE ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE IL-10, IFN- γ E GRANZIMA B NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

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

Aprovado em: 28/08/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Suenia da Cunha Gonçalves de Albuquerque (Examinadora Externa)
Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/SES/PE)

Prof^a. Dr^a. Rosana de Albuquerque Montenegro (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria da Paz, que com muito amor sempre esteve ao meu lado e me ensinou os valores para eu ser o homem que sou hoje, e acima de tudo uma companheira e amiga fiel na qual posso contar a qualquer momento, você sempre será a pessoa que eu quero ser quando crescer. Obrigado por me apoiar em todas minhas metas e sonhos e me estimular para sempre dar o melhor de mim não importa quão difícil o caminho possa ser.

A minha orientadora Virginia Lorena que me acolheu no seu grupo de pesquisa onde pude fazer parte de uma família maravilhosa. Essa mulher que além de ser uma ótima profissional e orientadora, é acima de tudo amiga, companheira e que sempre está presando pela união, companheirismo e amizade, muito obrigado por todos os momentos e ensinamentos que irei levar comigo pelo resto da vida.

A minha família, em especial minha vó Diva e meus irmãos Túlio e Társilo que sempre estão me acompanhando e torcendo para que eu possa sempre vencer nas minhas lutas e que posso contar com apoio de vocês em qualquer situação. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos que apesar da minha ausência ultimamente, nunca deixaram de estar presente em minha vida e que todos os momentos que passamos juntos sempre são os melhores e mais felizes que posso ter. Obrigado Igaro, Cibele, Jeff, Bruna, André, Lucas, Rodrigo, Murilo, Suammyr, Filipe, Cadu, Dani, Zezin, Thayna, Kelvim, Debs, Victor, Andrew e em especial para Henrique e Geórgia que sempre serão a luz no fim do túnel quando passo por qualquer momento que me deixa chateado, não poderia pedir amigos melhores que vocês.

Ao meu grupo de pesquisa que me acolheu desde o começo quando eu era totalmente perdido por ser novato na área e que sempre me ofereceram uma mão em qualquer dúvida, medo ou dificuldade que passei nesse período do mestrado, nossa união nos faz ser os melhores sem sombra de dúvidas. Em especial a Diego que é meu parceiro de pesquisa onde sempre nos ajudamos sem medir esforços e acima de tudo um ótimo amigo, obrigado por todas brincadeiras no meio dos momentos de dificuldade que passamos juntos. Obrigado Mi, Kamila, Leylla, Cintia e Mineo.

A UFPE por me propor essa oportunidade de crescer profissionalmente através do mestrado e ao IAM por abrir suas portas para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa e conhecer pessoas maravilhosas. Aos companheiros do mestrado em especial Pry, Danylo, Conceição, Rossana, Ayana, Andrea. A minha equipe de trabalho que sempre me apoiou e ofereceu ajuda nos momentos que precisei, obrigado Ivan, Silvia, Anesia, Arley, Lili, Duca, Simone, Paulo, Luciana, Cea, Erica e Valéria por facilitar muitas vezes minha vida para que eu pudesse conciliar os horários das aulas com o trabalho.

Obrigado a todos que puderam contribuir de forma direta ou indireta nessa etapa tão importante da minha vida.

RESUMO

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, atualmente milhares de pessoas encontram-se em áreas de risco de contaminação. A doença apresenta duas fases clínicas, a fase aguda caracterizada por alta parasitemia, intensa inflamação e ausência de sintomas específicos e a fase crônica que pode apresentar as formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, sendo a forma cardíaca a mais frequente entre os pacientes sintomáticos. Acredita-se que a evolução da doença depende do equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro, no qual é caracterizado pelo tipo de resposta imune apresentada contra o *T. cruzi*. A homeostase imunológica é caracterizada pelo equilíbrio da resposta inflamatória com predomínio de citocinas pró-inflamatórias e grânulos citotóxicos, através da participação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 que controla a intensidade da resposta inflamatória. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de IL-10, IFN- γ e Granzima B nos diferentes graus de acometimento cardíaco de pacientes portadores da infecção chagásica. Foram incluídos 43 pacientes no estudo, onde 19 apresentaram a forma indeterminada (IND), 14 a forma cardíaca leve (CARD 1) e 10 a forma cardíaca severa (CARD 2), em seguida foram feitas dosagens nos sobrenadantes de cultura de PBMC com diferentes estímulos através da técnica *Cytometric Bead Array* (CBA). Nossos resultados apontam que não houve diferença estatística na expressão de IL-10 em nenhum dos grupos, entretanto IFN- γ houve diferença nos grupos IND (p 0,0347 e p 0,0205) e CARD 1 (0,0169 e 0,0092) em relação ao grupo CARD 2 em ausência de estímulo e com presença do antígeno EPI respectivamente, e Granzima B houve diferença nos grupos IND (p 0,0368 e p 0,0193) em relação ao grupo CARD 2 em ausência de estímulo e com presença do antígeno EPI respectivamente, nossos achados apontam que houve uma inversão no perfil de resposta inflamatória dentro dos grupos estudados, em que uma possibilidade possa ser a presença de uma cepa de *T. cruzi* que não seja característica em nossa região.

Palavras-chave: Interleucina-10. Interferon gama. Granzima B. Cardiomiopatia Chagásica. Doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease is an infection caused by *Trypanosoma cruzi*, currently thousands of people are living in areas at risk of contamination. The disease presents two clinical phases: acute phase characterized by high parasitemia, intense infection and absence of symptoms and chronic phase that may exhibit indeterminate cardiac, digestive or cardiodigestive forms, being a more frequent cardiac form among symptomatic patients. Believe that the evolution of the disease depends on the balance between the parasite and the host, characterized by the type of immune response against *T. cruzi*. An immunological homeostasis is characterized by the balance of the inflammatory response with predominance of proinflammatory cytokines and cytotoxic granules, through the participation of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, which controls the intensity of the inflammatory response. Thus, the aim of the present study was to evaluate the levels of IL-10, IFN- γ and Granzyme B in different degrees of cardiac involvement of patients with chronic infection. Forty-three patients were included in the study, where 19 had indeterminate form (IND), 14 mild cardiac form (CARD 1) and 10 severe cardiac form (CARD 2), then supernatant dosages of PBMC culture with different stimuli were made through the Cytometric Bead Array (CBA) technique. Our results indicate that there was no statistical difference in IL-10 expression in any of the groups, although IFN- γ differed in the IND (SE, p 0.0347 and EPI, p 0.0205) and CARD 1 (SE, p 0.0169 and EPI, p 0.0092) groups in relation to the CARD 2 group in absence of stimulus and presence of EPI antigen and Granzyme B there was a difference in the IND groups (SE, p 0.0368 and EPI, p 0.0193) in relation to the CARD 2 group in absence of stimulus and presence From the former EPI group, our findings indicated that there was an inversion in the inflammatory response profile within the studied groups and that it might be possible to have a *T. cruzi* strain that is not the characteristic in our region.

Keywords: Interleukin-10. Interferon-gamma. Granzyme B. Chagas Cardiomyopathy. Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado	17
Figura 3 - Fases clínicas da doença de Chagas	18
Figura 4 - Estágios de envolvimento cardíaco na CCC	20
Figura 1 - Concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos	35
Figura 2 - Concentração de IFN- γ em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos	36
Figura 3 - Concentração de Granzima B em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos	38
Figura 4 - Concentração de IL-10, IFN- γ , Granzima B em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos por estímulo sem níveis basais	40

LISTA DE ABREVIATURAS

CARD 1	Forma cardíaca leve
CARD 2	Forma cardíaca severa
CBA	Cytometric Bead Array
CCC	Cardiopatia chagásica crônica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DC	Doença de Chagas
ECG	Eletrocardiograma
EPI	Antígeno da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FC	Forma Cardíaca
FD	Forma Digestiva
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
INDICE I	Valores de Epimastigota subtraindo valores sem estímulo
GZM	Granzima
IC	Insuficiência cardíaca
IND	Forma Indeterminada
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PHA	Fitohemaglutinina
SE	Sem estímulo
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VE	Ventrículo esquerdo
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PERGUNTA CONDUTORA	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	15
3.2	AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	16
3.3	ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
3.4	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	20
4	JUSTIFICATIVA	23
5	OBJETIVOS	24
5.1	OBJETIVO GERAL.....	24
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
6	MATERIAIS E MÉTODOS	25
6.1	DESENHO DE ESTUDO.....	25
6.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	25
6.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	26
6.3.1	Coleta de sangue	26
6.3.2	Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	26
6.3.3	Quantificação de IL-10, IFN-γ e GzmB em amostras de sobrenadante de cultura de PBMC por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	26
6.4	CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	28
6.4.1	Variáveis independentes	28
6.4.2	Variáveis dependentes	28
6.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
7	RESULTADOS	30
8	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

ANEXO A - MODELO DE TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E	
ESCLARECIDO	56
ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	58

1 INTRODUÇÃO

O papel da resposta imune durante o processo inflamatório cardíaco em camundongos portadores da doença de Chagas ainda não se encontra bem caracterizado, evidenciando a necessidade de estudos em humanos para a compreensão da evolução da infecção. Estudos como o de Silverio et al. (2012) demonstram diante da cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos, que a resposta imune tem implicações distintas para o controle parasitário e imunopatologia da cardiomiopatia crônica como a resposta regulatória e resposta inflamatória.

A execução da imunidade adquirida através dos linfócitos T CD4+ do perfil th1 e T CD8+ citotóxico exercendo uma resposta pró-inflamatória através da expressão IFN- γ que induz a ação o óxido nítrico pelos macrófagos e grânulos citotóxicos que podem causar danos teciduais posteriormente são os principais mecanismos para controlar a infecção, devido a isso, a compreensão desses mecanismos é de alta importância (ARAUJO et al., 2005; KUMAR & TARLETON, 2001).

Sousa et al. (2014) utilizaram citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na doença de chagas. Pacientes na forma indeterminada da doença apresentaram elevados níveis de expressão de IL-10 sugerindo associação do seu papel na proteção contra cardiomiopatia. Os que apresentam cardiomiopatia tiveram maiores níveis de expressão de *IFN- γ* em relação ao grupo na forma indeterminada, no entanto o estudo de Silverio et al. (2012) os níveis de IFN- γ encontram-se menores no tecido cardíaco durante a fase cardíaca.

A composição do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica crônica foi descrita por Reis et al. (1993), em que foi encontrada uma predominância de linfócitos T CD8+ expressando granzima A. Em 2012, Araujo e colaboradores destacaram que na fase crônica da doença de Chagas, os pacientes com a forma indeterminada da doença apresentam uma frequência de linfócitos T CD4+ expressando granzima B e que essa população teria papel não apenas citotóxico, como também regulatório. Lasso et al. (2015) demonstraram que os pacientes com cardiopatia apresentaram mais linfócitos TCD8+Granzima+, quando comparados ao grupo assintomático. No estudo de Silverio et al. (2012) os linfócitos T CD8+ citotóxicos também foram observados

diante da cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos, ocorrendo agravamento da destruição tecidual pela expressão de perforinas.

Desta forma, nos propomos a avaliar a expressão de IL-10, IFN- γ e Granzima B em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos portadores da forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica, com a finalidade de apresentar como funciona a resposta imune de acordo com o grau de envolvimento da doença e estabelecer biomarcadores de morbidade.

2 PERGUNTA CONDUTORA

Existe diferença na quantificação de IL-10, IFN- γ e granzima B em sobrenadante de cultura de PBMC de portadores da doença de Chagas crônica com distintos graus de acometimento cardíaco?

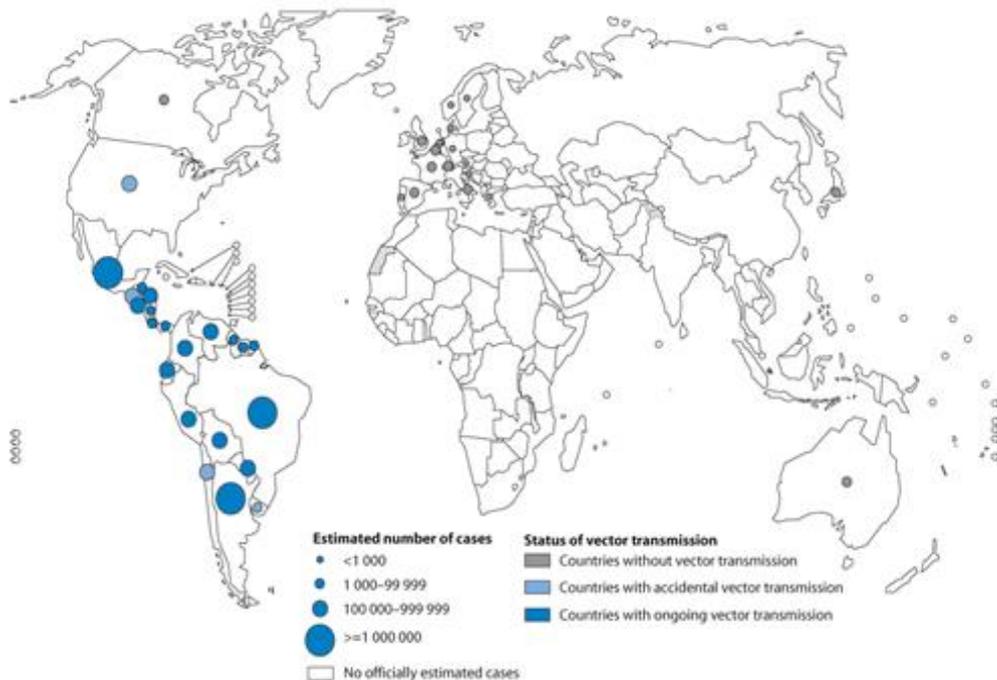
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; SALVATELLA, 2006). Milhares de pessoas encontram-se em áreas de risco de contaminação e ainda não existem vacinas eficazes e o tratamento preconizado é prolongado e, em alguns casos, tóxico para os pacientes (WHO, 2017). Os vetores do *T. cruzi* pertencem à família Reduviidae e à subfamília Triatominae, sendo as espécies *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* de maior importância epidemiológica (RABINOVICH & HIMSCHOOT, 1990; BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003). Além da transmissão vetorial, pode haver ainda transmissão pela ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita e em acidentes laboratoriais (GONÇALVES ET AL., 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo mundo, onde a maioria delas encontram-se na América Latina (Figura 1). Estimativas recentes para 21 países latino-americanos, com base em dados da OMS, indicam que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas, das quais de acordo com a última atualização epidemiológica da OMS feita em 2015 com base em estimativas, 3.581.423 (62,4%) eram residentes de países da América do Sul, onde o Brasil destaca-se com 1.156.821 (32,3%) desses casos (WHO, 2017; WHO, 2015). Entre 2006 e 2010 a OMS estimou que houve uma queda de 32% de novos casos e de 40% do número das pessoas que se encontram em risco de contaminação (WHO, 2012). Pessoas com idade acima de 50 anos se mostram com maior positividade para *T. cruzi*, entretanto muito desses indivíduos não tem conhecimento sobre estar infectados devido maior parcela dos portadores da doença de Chagas se apresentarem assintomáticos, sendo assim, necessária a aplicação de métodos de busca ativa como uma alternativa de diagnóstico precoce nesses pacientes, principalmente naqueles encontrados em área de risco (FREITAS et al., 2015).

Figura 1 – Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseada em estimativas oficiais e status de transmissão vetorial mundialmente entre 2006-2009.



Fonte: WHO, 2010.

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

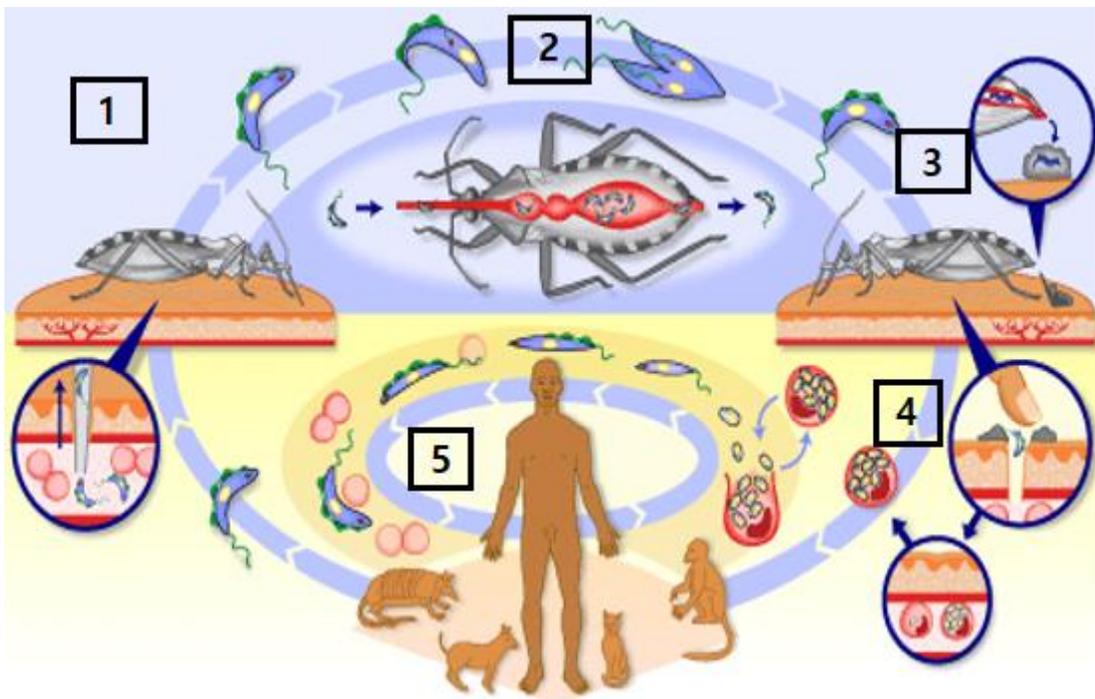
O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida complexo, apresentando características distintas em hospedeiros vertebrados e invertebrados (insetos da família Reduviidae) que servem como vetores para o parasita. Os insetos são encontrados em grande parte da América Latina, principalmente em áreas rurais (DIAZ, 2008).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado ocorre quando o inseto vetor ingere sangue contaminado, de um hospedeiro vertebrado. Após serem ingeridos durante o repasto sanguíneo, os tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro, irão se diferenciar em epimastigotas no intestino médio do vetor. Esses epimastigotas passarão pelo processo de metaciclogênese, onde irão se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos na porção posterior do intestino e serão eliminados pelas excretas do vetor, em um novo repasto sanguíneo (Figura 2) (TYLER & ENGMAN, 2001; TANOWITZ et al., 2009).

O ciclo no hospedeiro vertebrado pode se iniciar durante o repasto sanguíneo, em que as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas excretas do vetor são

depositadas na pele e/ou mucosas do hospedeiro vertebrado. Sua penetração ocorre por meio da mucosa nasal ou oral, conjuntiva, lesões cutâneas ou outras superfícies. No hospedeiro vertebrado, após invadir células, o parasita se diferencia na forma amastigota intracelular e após diversos ciclos de divisão binária no citoplasma celular, essas formas se diferenciam em tripomastigotas que lisam a célula do hospedeiro. Esses tripomastigotas irão infectar células adjacentes ou se disseminar através da via linfática ou circulação sanguínea para assim infectar novas células (Figura 2) (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006; MACEDO, 2002).

Figura 2 – Ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

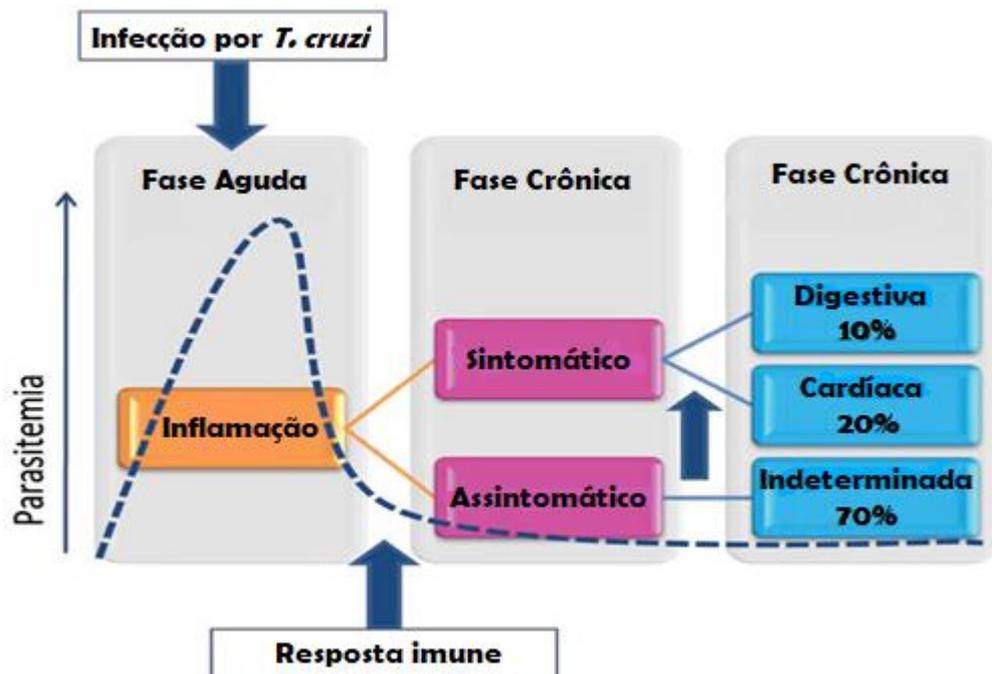


Legenda: 1. O triatomíneo, durante o repasto sanguíneo, ingere formas tripomastigotas sanguíneas presentes na circulação. 2. No intestino médio há o aparecimento da forma epimastigota, onde ocorre intensa multiplicação. Já no intestino posterior, ocorre a forma tripomastigota metacíclica. 3. Durante o repasto, o triatomíneo deixa suas excretas no local, contendo tripomastigotas metacíclicos. 4. Através da mucosa ou pele lesionada o *T. cruzi* tem contato com células, onde alcançará o interior. 5. No meio intracelular, o parasita irá se diferenciar na forma amastigota, onde após multiplicação binária ocorrerá a lise celular, na qual há a liberação de tripomastigotas sanguíneos. Estes são capazes de infectar outras células do mesmo hospedeiro ou outro triatomíneo. Fonte: WHO, 2008.

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica (figura 3). A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e inflamação. Esta fase é curta e pode durar cerca de 1 a 3 meses, evoluindo para a fase crônica que vai perdurar por todo o resto da vida do paciente (MONCAYO, 2003). Cerca de 60%-70% dos pacientes crônicos desenvolvem a forma clínica denominada indeterminada, estabelecendo um estado assintomático em que a infecção só é detectada por testes sorológicos. Essa fase da doença de Chagas pode ser considerada como um estado de equilíbrio entre hospedeiro e parasita (ANDRADE, 1999).

Figura 3 – Fases clínicas da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Dutra et al., 2009.

Os outros 30%-40% dos indivíduos infectados, anos após o contato inicial com o parasita apresentam alguma sintomatologia, podendo apresentar três formas clínicas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo do coração, hipertrofia do miocárdio, degeneração de miócitos e fibrose intersticial grave. Este quadro clínico caracteriza os diferentes aspectos da forma cardíaca da doença (JUNQUEIRA et al., 2010; HIGUCHI et al., 2003). Já a forma

digestiva se manifesta em 8-10% dos casos, é caracterizada por lesões no sistema nervoso autônomo do esôfago e cólon, podendo causar aumento desses órgãos como uma das principais manifestações viscerais da doença, denominada como megacólon (SANTOS JUNIOR, 2002). A forma cardiodigestiva é menos comum, estando associada a alterações tanto no sistema cardiovascular como no sistema digestivo. A exata prevalência dessa forma clínica é desconhecida devido à escassez de estudos apropriados (MONCAYO, 2003; ANDRADE, 1999; DUTRA et al., 2009).

Para a determinação das formas clínicas crônicas são realizados alguns exames como: eletrocardiograma, ecocardiograma e raio x do tórax e abdômen. A forma cardíaca pode ser classificada, segundo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011) em estágios de envolvimento cardíaco (A, B, C e D) como mostra na Figura 4. O estágio A apresenta ausência de sintomas presentes ou pregressos de insuficiência cardíaca e sem cardiopatia estrutural, podendo haver alterações no ECG e sem alterações no ecocardiograma. O estágio B apresenta cardiopatia estrutural com ausência de sinais e sintomas de Insuficiência Cardíaca. Esse estágio divide-se em: B1 - alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), podendo apresentar alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades da contratilidade regional) e com função ventricular global normal; B2 - o qual apresenta disfunção ventricular global (fração de ejeção do Ventrículo esquerdo reduzida). No estágio C, estão os pacientes com disfunção do ventrículo esquerdo e sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca. No estágio D, encontram-se os pacientes com sintomas de insuficiência cardíaca em repouso, resistentes ao tratamento clínico maximizado, sendo necessária a aplicação de intervenções especializadas e intensivas para seu tratamento (ANDRADE et al., 2011).

Figura 4 – Estágios de envolvimento cardíaco na CCC.

Estádios	EKG	Ecocardiograma	Insuficiência cardíaca
A	Alterado	Normal	Ausente
B1	Alterado	Alterado, FEVE ² ≥45%	Ausente
B2	Alterado	Alterado, FEVE ² <45%	Ausente
C	Alterado	Alterado	Compensável
D	Alterado	Alterado	Refratária

Fonte: II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015.

No caso diagnóstico laboratorial, durante a fase aguda da infecção, pode ser facilmente realizado através de métodos parasitológicos convencionais diretos como esfregaços, gota espessa, exame a fresco e o método de Strout ou métodos indiretos como hemocultura e xenodiagnóstico. Entretanto, na fase crônica da infecção, devida a baixa parasitemia, o diagnóstico é feito preferencialmente por métodos sorológicos como ELISA, hemaglutinação indireta e imunofluorescência indireta. De acordo com a OMS, para se obter um diagnóstico sorológico confiável, deve-se obter resultados concordantes em pelo menos duas metodologias diferentes (GOMES, 1997; BRASIL, 2005).

3.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Por apresentar um ciclo biológico complexo, em que grande parte de sua vida encontra-se dentro de células, a erradicação do *T. cruzi* no hospedeiro é dificultada, ocorrendo o desenvolvimento da forma crônica da doença de Chagas, caracterizada por estado de latência, ausência de sintomas e replicação mínima do parasita (COELHO-CASTATELO et al., 2009).

Diversos mecanismos efetores humorais e celulares estão envolvidos na resposta imune inata do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, dentre eles a ativação da via alternativa do sistema complemento que lisa as formas epimastigotas que eventualmente penetram associadas às formas tripomastigotas (BUDZKO et al., 1975; KIPNIS et al., 1985). Os macrófagos participam dessa resposta através da realização de fagocitose, mas o *T. cruzi* antes da sua diferenciação e replicação conseguem evitar a ação microbicida escapando do vacúolo parasitóforo para o citoplasma ao utilizar peroxidases que inativam as ações oxidativas dos lisossomos impostas por esses macrófagos ativados (ACEVEDO et al., 2018). Desta forma, as formas amastigotas conseguem sobreviver e se replicam no citoplasma dos

fagócitos, livremente, garantindo a progressão da infecção. Porém, a invasão dos macrófagos leva à produção e secreção de IL-12 que vai ativar as células *Natural Killer* (NK), que por sua vez produzem altos níveis de IFN- γ , importante para o controle da doença na fase aguda, por ativar os mecanismos microbicidas dessas células (SARDINHA et al., 2006; KAHN et al., 1995).

Além disso, as células NK desempenham uma resposta de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, resultando na atividade citotóxica pela liberação de grânulos tóxicos como granzima, podendo matar diretamente esses patógenos. Essa resposta também tem se mostrado importante para o desenvolvimento da resposta adquirida (SARDINHA et al., 2006).

A imunidade adquirida mediada por linfócitos TCD4+ do perfil Th1, linfócitos TCD8+ citotóxicos e a produção de IFN- γ que induz a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos são os principais mecanismos do hospedeiro para controlar a parasitemia na fase aguda doença. O controle da infecção depende bastante da participação dos linfócitos T CD8, na qual sua ação vai além de secretar substâncias citotóxicas, como também produzir citocinas (ARAUJO et al., 2005; KUMAR & TARLETON, 2001).

Estudos apontam que ao analisar infiltrados inflamatórios do tecido cardíaco na cardiopatia chagásica crônica, existe uma grande frequência de linfócitos T CD4 e T CD8, com predomínio dos linfócitos T CD8 numa relação aproximada de 2:1 (HIGUCHI et al., 1993; FUENMAYOUR et al., 2005). Os linfócitos T CD8 produtores de IFN- γ conferem, atividade inflamatória, e sua presença no tecido cardíaco pode ser benéfica por gerar uma resposta sem trazer danos teciduais, apresentando papel de controle parasitário neste tecido. Por outro lado, acredita-se que a alta frequência de linfócitos T CD8 produtores de granzima/perforina sugere a participação na atividade citotóxica, ocorrendo um agravamento da destruição tecidual (SILVERIO et al., 2012). Em 2006, Hardison e colaboradores estudaram a expressão de CCR5 em camundongos, onde os CCR5-/- apresentaram alta parasitemia e maior número de parasitas no tecido cardíaco em relação aos CCR5+/+. Sugerindo seu envolvimento com os controles de replicação do *T. cruzi* e inflamação do tecido nos estágios iniciais da doença, entretanto na fase crônica da infecção o CCR5 não está envolvido na manutenção da inflamação do coração. De acordo com Talvani e colaboradores, em 2004, o envolvimento de CCR5 na infecção aguda sugere que indivíduos com baixa expressão podem progredir para doença severa, onde o

desenvolvimento de disfunção cardíaca acarreta em diminuição na expressão desse receptor. Estudos sugerem que os linfócitos T CD8 citotóxicos apresentam maior frequência do receptor CCR5, e este fator pode favorecer o recrutamento dessas subpopulações ao tecido cardíaco (SILVERIO et al., 2012; SOUSA et al., 2014).

Os linfócitos T CD8 se dividem em subtipos distintos de acordo com sua atividade exercida, podendo ser classificados como linfócitos T CD8 inflamatórios caracterizados pela produção de IFN- γ e T CD8 citotóxicos caracterizados pela produção de perforina e granzima, grânulos que conferem atividade citotóxica (SANDBERG et al., 2001; MARTIN & TARLETON, 2004).

Na atividade citotóxica, os linfócitos T CD8 citotóxicos induzem a morte celular por meio da abertura de poros na membrana da célula alvo infectada, as moléculas de perforina são ditas como responsáveis pela abertura desses poros ao se polimerizarem com Ca⁺, e os poros formados irão permitir a entrada das moléculas de granzima, que são serina esterases que levam a degradação do DNA e em seguida apoptose, devido a sua interferência em vias intracelulares da célula alvo (LIEBERMAN, 2010). Entretanto, alguns autores ressaltam o fato de que os poros formados na membrana celular são de 15 nm e pode ser muito pequeno para a passagem das moléculas grandes como granzimas (TRAPANI & SMYTH, 2002), além disso, alguns estudos reforçam essa questão ao demonstrar que moléculas de granzima B foram endocitadas na ausência de perforinas (FROELICH et al., 1996; SHI et al., 1997). Os linfócitos T CD8 inflamatórios produtores de IFN- γ , por sua vez, remetem a um efeito protetor na infecção causada pelo *T. cruzi* por sua capacidade de induzir a produção de IL-12, TNF e NO pelos macrófagos (HOLSCHER, 1998; MICHAILOWSKY, 2001). Alguns autores associam a alta produção de IFN- γ com a cardiopatia chagásica crônica devido a grande intensidade de resposta pró-inflamatória (GOMES, 2003).

4 JUSTIFICATIVA

A importância dos estudos sobre a imunidade contra o *T. cruzi* em humanos são necessárias para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência a este protozoário, bem como a patogênese da doença de Chagas, além disso, a relação direta da atividade citotóxica e inflamatória e seu impacto na evolução da doença de Chagas ainda não se encontram em consenso na comunidade científica, havendo necessidade para esse estudo com a finalidade de que tenha uma melhor compreensão do papel dessas citocinas ou Granzimas para que possam ser utilizadas como biomarcadores de progressão ou acompanhamento de tratamento. Apesar de haver uma grande maioria de resultados expressando uma relação entre as formas clínicas e imunidade, ainda existem alguns estudos discordantes, e com isso a necessidade de compreender o motivo para acontecer esses eventos. Espera-se que os resultados obtidos nesse trabalho venham contribuir com maiores informações sobre os mecanismos envolvidos com o prognóstico da doença.

5 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de IL-10, IFN- γ , e Granzima B em sobrenadante de cultura de PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas com diferentes graus de acometimento cardíaco.

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os níveis de IL-10, IFN- γ e Granzima B em sobrenadante de cultura de PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas apresentando as formas clínicas crônicas indeterminada e cardíaca.
- b) Correlacionar esses níveis com % da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

6 MATERIAIS E METODOS

6.1 DESENHO DE ESTUDO

Estudo do tipo analítico-experimental, onde o sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos portadores das formas crônicas indeterminada e cardíaca foram avaliadas por citometria de fluxo para avaliação de IL-10, IFN- γ e Granzima B. Os indivíduos desse estudo foram selecionados e incluídos, no período de março de 2013 a março de 2015. Os cultivos de PBMC e estocagem de sobrenadante de células foram realizados em virtude da realização do projeto de tese de Adriene Siqueira de Melo, da Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE defendida em 2016. Assim, a descrição dos itens 6.2 a 6.3.2 foram realizados no referido projeto de tese e estão descritos aqui para contextualização dos objetivos propostos desta dissertação.

6.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Quarenta e três indivíduos portadores da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (Procape), da Universidade de Pernambuco (UPE). Atualmente, o ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos pacientes portadores da doença de Chagas. Para sua inclusão no estudo, os pacientes preencheram 3 critérios: realização dos exames clínicos (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago) para a classificação clínica, sorologia reagente para a infecção chagásica, segundo o II Consenso em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016) e não ter sido submetido ao tratamento etiológico. Foram incluídos no estudo 43 indivíduos agrupados da seguinte forma: um grupo IND ($n = 19$, média de idade de $53 \pm 11,84$), pacientes classificados no estágio A de envolvimento cardíaco, ou seja, aqueles sem sintomas presentes ou progressos de Insuficiência Cardíaca (IC) e com ECG e RX de tórax normais; um grupo CARD1 ($n = 14$, 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 ($n = 10$, 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, estabelecidos pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Os valores de fração de ejeção ventricular esquerda foram adquiridos através da realização do ecocardiograma.

6.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.3.1 Coleta de sangue

Nove mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica para obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e cultivo celular.

6.3.2 Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue heparinizado foi misturado a PBS pH 7,2 na proporção de 1:2 e adicionado a tubos falcon 50mL contendo Ficoll-hypaque. Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (900 x g/ 40 min a 20° C) e o anel de PBMC foi removido e depositado em tubos falcon de 15mL. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g/ 10 min a 20°C) em meio RPMI 1640. As células foram contadas em câmara de Neubauer através do corante de vitalidade Azul de Trypan e ajustadas para as concentrações desejadas para cultivo *in vitro*.

As PBMC (2×10^6 células/mL) foram cultivadas em tubos de polipropileno de 14mL (BD Systems) contendo meio RPMI 1640 suplementado, tendo volume final de 1mL. As células foram cultivadas com Fitoemaglutinina (PHA) (5µg/mL) como controle positivo, com antígeno de epimastigota de *T. cruzi* (25µg/mL), sem estímulo (controle negativo) em estufa de CO² com 5% de umidade a 37°C por um dia. Após o período de cultivo o sobrenadante da cultura foi retirado e armazenado à -80°C.

6.3.3 Quantificação de IL-10, IFN-γ e GzmB em amostras de sobrenadante de cultura de PBMC por *Cytometric Bead Array* (CBA)

As citocinas foram quantificadas utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Bead Array*-CBA, *Becton Dickinson*-BD), que

emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas. Essa metodologia (CHEN *et al.*, 1999) permite a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Não foi necessário diluir as amostras para a leitura no citômetro de fluxo.

Os níveis de IL-10, IFN- γ e GzmB foram quantificados através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) Flex, seguindo as instruções do fabricante (Beckton Dickson). Para gerar a curva padrão das *beads* analisadas, inicialmente os padrões de citocinas e granzima B foram submetidas a diluição seriada com diluente do Kit (Top Standard – 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL).

Após a validação da curva, 25 μ L da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais (anti-IL-10, anti-IFN- γ , e anti-GzmB) foram transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Em seguida, 25 μ L das amostras de sobrenadante foram adicionados por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25 μ L do reagente de detecção, que é uma mistura de anticorpos anti-citocinas IL-10 e IFN- γ e anti-GzmB conjugadas à *Phycoerythrin* por 2h à TA e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* foram lavadas e 300 μ L de solução tampão foram adicionados para ressuspender às esferas. As *beads* foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FCAP Array versão 3.01 (Beckton Dickson).

6.4 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

6.4.1 Variáveis independentes

Variável	Definição	Categorização
IND	Forma crônica assintomática	Categórica
CARD 1	Forma crônica cardíaca leve	Categórica
CARD 2	Forma crônica cardíaca severa	Categórica

6.4.2 Variáveis dependentes

Variável	Definição	Categorização
IL-10	Concentração de IL-10 expressas em sobrenadante de PBMC	Variável quantitativa contínua (Média da concentração)
IFN- γ	Concentração de IFN- γ expressas em sobrenadante de PBMC	Variável quantitativa contínua (Média da concentração)
Gzm B	Concentração de Gzm B expressas em sobrenadante de PBMC	Variável quantitativa contínua (Média da concentração)

6.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado teste de normalidade (D'Agostino) onde foi verificado que os dados são não paramétricos, seguido do teste Kruskal-Wallis para avaliar associação entre os grupos e posteriormente o teste Mann-Whitney para comparação quantitativa das citocinas IL-10 e IFN- γ , e Granzima B entre grupos. A avaliação das correlações entre IL-10/IFN- γ /Gzm B *versus* % FEVE foram realizadas através do teste de correlação de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

Artigo que será submetido à Revista *Cytokine*: Inversão no perfil de citocinas em pacientes cardiopatas com Doença de Chagas.

Resumo

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, onde sua evolução apresenta duas fases clínicas, a fase aguda caracterizada por alta parasitemia, intensa inflamação e ausência de sintomas específicos. A fase crônica pode apresentar as formas clínicas indeterminada (ou assintomática), cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva, sendo a forma cardíaca a mais frequente entre os pacientes sintomáticos. Acredita-se que a evolução da doença depende do equilíbrio entre o parasita e hospedeiro, no qual é caracterizado pelo tipo de resposta imune apresentada contra o *T. cruzi*, esse perfil de resposta depende de várias moléculas, dentre elas as citocinas que vão participar no controle parasitário e de acordo com os níveis de expressão geram um microambiente regulatório ou inflamatório. O ambiente regulatório é caracterizado pela participação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 que ajuda a controlar a intensidade da resposta inflamatória, entretanto quando se tem um predomínio de citocinas pró-inflamatórias. O ambiente inflamatório é caracterizado pela expressão exacerbada de IFN- γ , além da participação de células que expressam grânulos citotóxicos como Granzima B. Dessa forma, temos como objetivo avaliar a produção de IL-10, IFN- γ e Granzima B em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de portadores da forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica, com a finalidade de estabelecer biomarcadores de morbidade. Foram incluídos 43 pacientes no estudo, onde 19 apresentam a forma indeterminada (IND), 14 a forma cardíaca leve (CARD 1) e 10 a forma cardíaca severa (CARD 2), em seguida foram feitas dosagens nos sobrenadantes de cultura de PBMC estimuladas com antígeno de *T. cruzi* e mitógeno através da técnica *Cytometric Bead Array* (CBA). Nossos resultados apontam que não houve diferença estatística na expressão de IL-10 em nenhum dos grupos, entretanto houve uma maior produção de IFN- γ e Granzima B em relação ao grupo CARD 2 em ausência de estímulo e com presença do antígeno EPI, nossos achados apontam que houve uma inversão no perfil de resposta inflamatória dentro dos grupos estudados, em que uma possibilidade possa ser a presença de uma cepa de *T. cruzi* que não seja característica em nossa região.

1. Introdução

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, onde a OMS estima que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas por este protozoário em todo mundo, onde a maioria delas encontram-se na América Latina [1, 2]. A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e inflamação, evoluindo para a fase crônica que vai perdurar pelo resto da vida do hospedeiro [3]. A maioria dos pacientes crônicos desenvolvem a forma clínica indeterminada, estabelecendo um estado assintomático, essa fase da doença de Chagas pode ser considerada como um estado de equilíbrio entre hospedeiro e parasita [4]. Outra parcela dos indivíduos infectados, anos após o contato inicial com o parasita apresentam alguma sintomatologia, dentre elas destaca-se a forma cardíaca, onde acomete a maioria dos casos sintomáticos [5].

É de extrema importância a compreensão do papel da resposta imune durante o processo inflamatório cardíaco em portadores da doença de Chagas, evidenciando a necessidade de estudos em humanos para a compreensão da evolução da infecção. Um estudo demonstrou diante da cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos, que a resposta imune tem implicações distintas para o controle parasitário e imunopatologia da cardiomiopatia crônica apresentando um ambiente regulatório e um ambiente inflamatório [6].

Alguns estudos utilizaram citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na doença de chagas. Pacientes na forma indeterminada da doença apresentaram elevados níveis de expressão de IL-10 sugerindo associação do seu papel na proteção contra cardiomiopatia. Os que apresentam cardiomiopatia tiveram maiores níveis de expressão de *IFN- γ* em relação ao grupo na forma indeterminada [7], no entanto um desses estudos demonstrou que os níveis de *IFN- γ* encontram-se menores no tecido cardíaco durante a fase cardíaca [6].

Na composição do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica crônica foi encontrada uma predominância de linfócitos T CD8+ expressando granzima A [8]. Os pacientes com a forma indeterminada da doença apresentam uma frequência de linfócitos T CD4+ expressando granzima B e que essa população teria papel não apenas citotóxico, como também regulatório [9]. Outro estudo demonstrou que pacientes com cardiopatia apresentaram mais linfócitos TCD8+Granzima+, quando comparados ao grupo assintomático [10]. Os linfócitos T

CD8+ citotóxicos também foram observados diante da cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos, ocorrendo agravamento da destruição tecidual pela expressão de perforinas [6]. Assim propomos avaliar a expressão de IL-10, IFN- γ e Granzima B em sobrenadante de cultura de PBMC em portadores da forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica, com a finalidade de estabelecer biomarcadores de morbidade.

2. Materiais e Métodos

2.1 População e local do estudo

Foram selecionados, no período de março de 2013 a março de 2015, quarenta e três indivíduos portadores da doença de Chagas, atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (Procape) da Universidade de Pernambuco (UPE). crônicos da doença de Chagas que foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) / Universidade de Pernambuco (UPE).

A confirmação da infecção foi realizada pelo Serviço de Referência em Doença de Chagas do IAM/Fiocruz através da utilização de dois testes imunoenzimáticos sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial Test Elisa Chagas III (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile) e Elisa recombinante, kit comercial Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil) conforme orientações dos fabricantes e de acordo com II Consenso Brasileiro em doença de Chagas [11].

Indivíduos que receberam tratamento prévio com Benzonidazol e/ou que apresentaram queixas digestivas foram excluídos do estudo. A seleção dos indivíduos e a classificação da cardiopatia chagásica foram realizadas por médicos cardiologistas seguindo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Os indivíduos foram incluídos no estudo após confirmação dos testes sorológicos e positividade nos exames de imagem como Ecocardiograma (ECO), Eletrocardiograma (ECG), Raio X de Tórax e Esôfago. Assim, os pacientes foram classificados em A ou forma indeterminada (IND) (n=19), sem sintomas cardíacos e com ECG e ECO normais; B1 ou forma cardíaca leve (CARD 1) (n=14), com doença cardíaca estrutural, evidenciada por ECG ou ECO, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais e

anteriores de insuficiência cardíaca congestiva (ICC); C ou forma cardíaca grave (CARD 2) (n=10) com disfunção ventricular e sintomas atuais ou anteriores de ICC.

2.2 Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Trinta mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica. O sangue foi misturado a PBS pH 7,2 na proporção de 1:2 e adicionado a tubos falcon 50mL contendo Ficoll-hypaque. Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (900 x g/ 40 min a 20° C) e o anel de PBMC foi removido e depositado em tubos falcon de 15mL. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g/ 10 min a 20°C) em meio RPMI 1640. As células foram contadas em câmara de Neubauer através do corante de vitalidade Azul de Trypan.

As PBMC (2×10^6 células/mL) foram cultivadas em tubos de polipropileno de 14mL (BD Systems) contendo meio RPMI 1640 suplementado, tendo volume final de 1mL. As células foram cultivadas com Fitohemaglutinina (PHA) (5µg/mL) como controle positivo, com antígeno de epimastigota de *T. cruzi* (Ag-Epi) (25µg/mL), sem estímulo (controle negativo) em estufa de CO² com 5% de umidade a 37°C por 24h. Após o período de cultivo o sobrenadante da cultura foi retirado e armazenado à -80°C.

2.3 Quantificação de IL-10, IFN-γ e GzmB em amostras de sobrenadante de cultura de PBMC por *Cytometric Bead Array* (CBA)

As citocinas foram quantificadas utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Bead Array*-CBA, *Becton Dickinson*-BD), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas. Essa metodologia [12] permite a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Não foi necessário diluir as amostras para a leitura no citômetro de fluxo.

Os níveis de IL-10, IFN-γ e GzmB foram quantificados através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) Flex, seguindo as instruções do fabricante (Beckton Dickson). Para gerar a curva padrão das *beads* analisadas, inicialmente os padrões de citocinas e granzima B foram submetidas a diluição seriada com diluente do Kit (Top Standard – 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625pg/mL, 1:16 –

312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 –20 pg/mL).

Após a validação da curva, 25 µL da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais (anti-IL-10, anti-IFN-γ, e anti-GzmB) foram transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Em seguida, 25 µL das amostras de sobrenadante foram adicionados por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25 µL do reagente de detecção, que é uma mistura de anticorpos anti-citocinas IL-10 e IFN-γ e anti-GzmB conjugadas à *Phycoerythrin* por 2h à TA e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* foram lavadas e 300 µL de solução tampão foram adicionados para ressuspender às esferas. As *beads* foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FCAP Array versão 3.01 (Beckton Dickson).

2.4 Análise Estatística

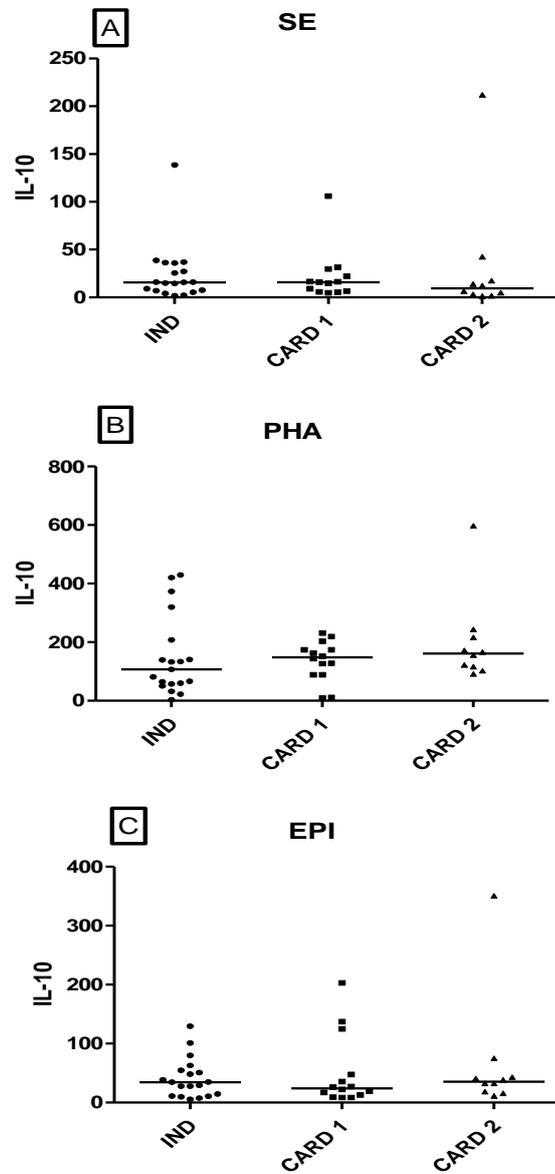
Foi realizado teste de normalidade (D'Agostino) onde foi verificado que os dados são não paramétricos, seguido do teste Kruskal-Wallis para avaliar associação entre os grupos e posteriormente o teste Mann-Whitney para comparação quantitativa das citocinas IL-10 e IFN-γ, e Granzima B entre grupos. A avaliação das correlações entre IL-10/IFN-γ/Gzm B *versus* % FEVE foram realizadas através do teste de correlação de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Produção de IL-10 na cardiopatia chagásica crônica

A figura 1 mostra a produção de IL-10 em sobrenadante de cultura *in vitro* de PBMC de portadores crônicos da doença de Chagas. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de pacientes nas condições de estímulo: sem estímulo, PHA e AgEpi de *T. cruzi*.

Figura 1. Concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos.



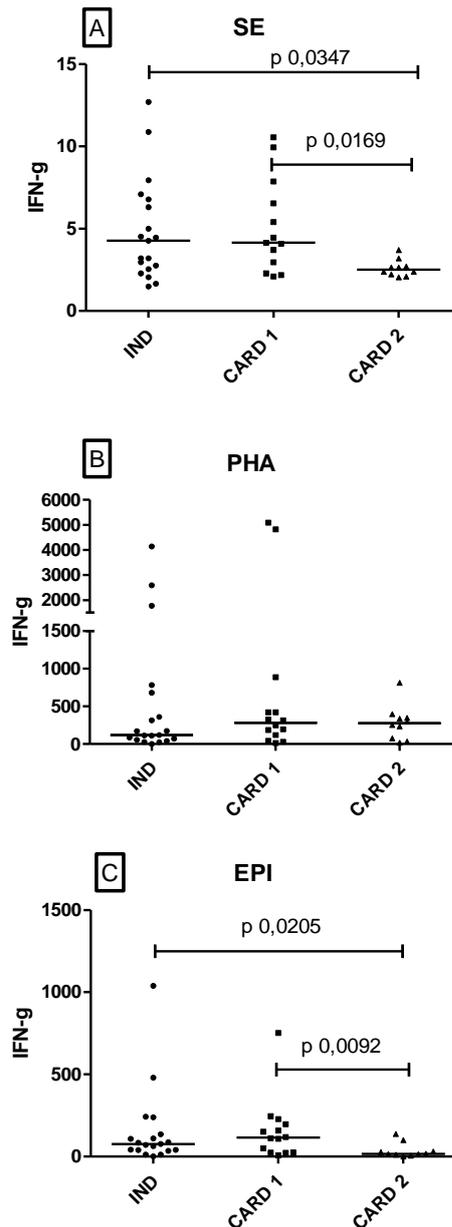
Legenda: Grupos IND (n=19), CARD 1 (n=14) e CARD 2 (n=10). As linhas representam a mediana de cada grupo. A: Sem estímulo, B: estimulado com fitohemaglutinina, C: estimulado com antígeno do *T. cruzi*.

3.2 Produção de IFN- γ na cardiopatia chagásica crônica

Verificamos que os grupos IND (SE, p 0.0347 e EPI, p 0.0169) e CARD1 (SE, p 0.0205 e EPI, p 0.0092) apresentaram uma maior produção de IFN- γ na

cultura de PBMC sem estímulo e após estímulo com Ag-Epi de *T. cruzi* quando comparados ao grupo CARD2, (Figura 2 A e C, respectivamente).

Figura 2. Concentração de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes chagásicos.

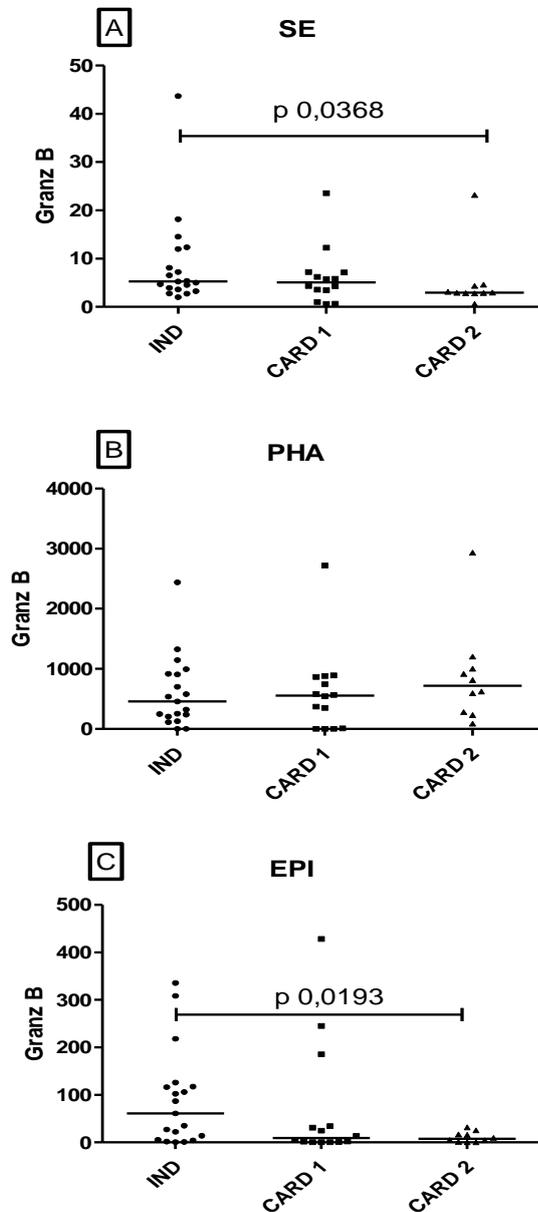


Legenda: Grupos IND (n=19), CARD 1 (n=14) e CARD 2 (n=10). As linhas representam a mediana de cada grupo. A: Sem estímulo, B: estimulado com fitohemaglutinina, C: estimulado com antígeno do *T. cruzi*.

3.3 Produção de Granzima B na cardiopatia chagásica crônica

Nossos indivíduos dos grupos IND e CARD1 apresentaram maior produção de Granzima B quando comparados ao grupo CARD2, nos sobrenadantes de cultura sem estímulo (Figura A) e estimuladas com Ag-Epi de *T. cruzi* (Figura 3C), entretanto apenas os grupos IND e CARD2 (SE, p 0.0368 e EPI, p 0.0193) apresentaram diferença estatística entre si (Figura 3 A).

Figura 3. Concentração de Gzm B em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos.



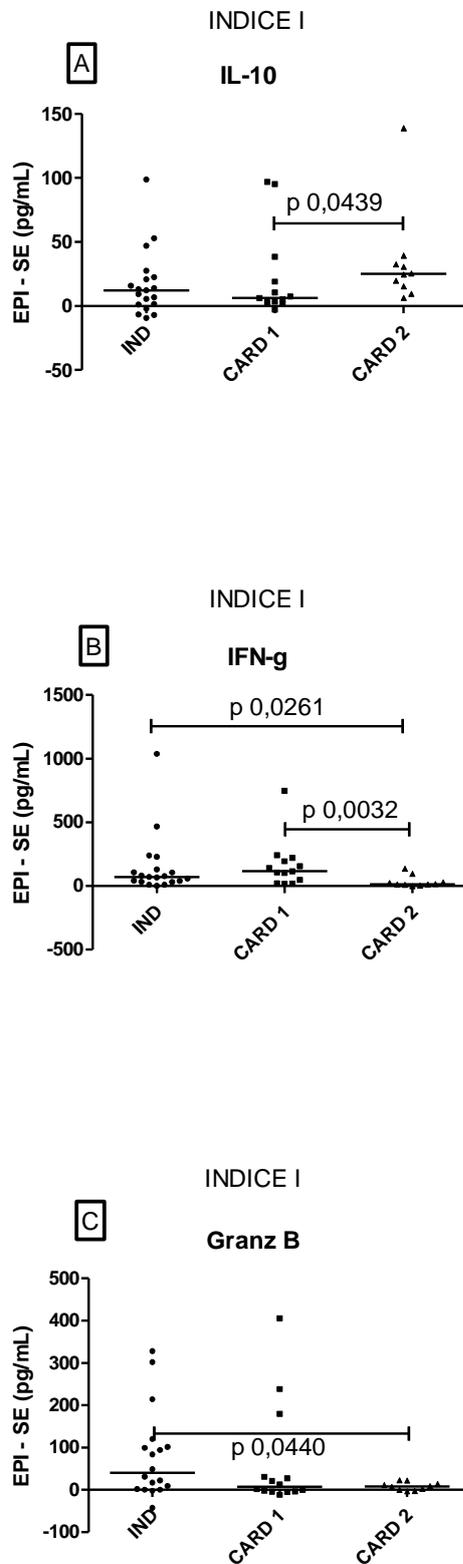
Legenda: Grupos IND (n=19), CARD 1 (n=14) e CARD 2 (n=10). As linhas representam a mediana de cada grupo. A: Sem estímulo, B: estimulado com fitohemaglutinina, C: estimulado com antígeno do *T. cruzi*.

3.4 Produção de IL-10, IFN- γ e Granzima B sem níveis basais

Analizamos os níveis de IL-10, IFN- γ e Granzima B através da subtração entre cultura estimulada com AgEpi e cultura sem estímulo. Assim, a produção de IL-

10 foi maior entre os indivíduos do grupo CARD 1 (p 0.0439) quando comparados aos indivíduos do grupo CARD 2 (Figura 4 A). A produção de IFN- γ foi mais elevada entre os grupos IND vs CARD 2 (p 0.0261) e CARD 1 vs CARD 2 (p 0.0032) (Figura 4 B). No caso da Granzima B, indivíduos do grupo IND (p 0.0440) apresentaram maiores níveis em comparação com o grupo CARD 2, entretanto o grupo CARD 1 teve produção similar ao CARD 2 (Figura 4 C).

Figura 4. Concentração de IL-10, IFN- γ , Gzm B em sobrenadante de cultura de pacientes chagásicos por estímulo sem níveis basais.



Legenda: Grupos IND (n=19), CARD 1 (n=14) e CARD 2 (n=10). As linhas representam a mediana de cada grupo. INDICE I: EPI – SE.

3.5 Correlação de IL-10, IFN- γ e Granzima B com FEVE %

Ao realizar o teste de correlação de Spearman verificamos que nenhum dos analitos apresentou correlação com os valores da fração de ejeção do ventrículo esquerdo em nenhum dos grupos estudados.

4. Discussão

A resposta imune do portador da doença de Chagas induz diversos mecanismos complexos no intuito de controlar a parasitemia enquanto preserva o potencial de manter uma resposta celular e humoral contra o patógeno durante todo esse período da infecção pelo *T. cruzi* [13]. Estudos tem demonstrado que na fase crônica da doença, os mecanismos de defesa do hospedeiro apresentam perfis diferentes de acordo com a forma clinica apresentada [14, 15].

Indivíduos com cardiopatia chagásica geralmente apresentam deficiência em alguns mecanismos de controle da resposta imune, como a produção de IL-10. A IL-10 é responsável de forma indireta pela diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias, controlando a resposta imune e os efeitos potencialmente lesivos dessa ativação sobre os tecidos do hospedeiro [15, 16].

Ao avaliar a IL-10, verificamos que não houve diferença estatística na produção dessa citocina em nenhum dos grupos do nosso estudo, entretanto o grupo IND na cultura sem estímulo apresentou maior produção dessa citocina. Corroborando com estudos que apresentam a IL-10 como uma citocina secretada predominantemente por pacientes portadores da forma indeterminada [7, 17]. Embora não apresentem o mesmo resultado que nosso estudo, um grupo de pesquisadores avaliaram cultura de PBMC após estimulação com antígenos na forma tripomastigota do *T. cruzi*, e após um ano de tratamento com o benzonidazol foi verificada uma inversão no perfil de citocinas, onde ocorreu uma redução na produção de IL-10 em indivíduos com a forma indeterminada e aumento de IL-10 no grupo cardíaco [18].

O perfil de resposta imune à infecção com *T. cruzi* caracterizada pela produção de IFN- γ e TNF- α está envolvida no processo de controle dos níveis de parasitemia [19]. Dentre as diversas citocinas, o IFN- γ tem sido associado, tanto em modelos experimentais, como também em humanos na infecção chagásica [20, 21].

Pacientes com cardiopatia chagásica apresentam alta frequência de células T, secretoras de IFN- γ [22, 23, 24].

Em nosso estudo os grupos que foram estimulados por PHA apresentaram o padrão de expressão de IFN- γ , onde os pacientes cardíacos com acometimento leve e severo se apresentaram em maior quantidade quando comparados ao grupo indeterminado corroborando com estudos apresentados acima. Entretanto, na ausência de estímulo, nossos resultados foram discordantes, os grupos IND e CARD1 apresentaram maior expressão quando comparados ao grupo CARD2, e não apresentaram diferença estatística entre si. Já na presença do antígeno, o grupo cardíaco leve apresentou uma expressão mais elevada em relação ao indeterminado, entretanto, o grupo cardíaco severo continua demonstrando menor expressão entre todos os grupos.

Alguns autores sugerem que o indivíduo com doença de Chagas na forma severa tem uma tendência a produzir mais IFN- γ [6, 17], comparado com os pacientes indeterminados, sob estimulação com antígenos do parasita, entretanto em nosso estudo o grupo indeterminado apresentou maior expressão de IFN- γ comparado ao grupo de indivíduos portadores da forma cardíaca severa, apresentando resultado discrepante com esses achados, já o grupo de indivíduos com a forma cardíaca leve apresentaram maior expressão quando comparados ao grupo indeterminado e cardíaco severo, em relação ao grupo IND o CARD1 está de acordo com a literatura, entretanto em relação ao CARD2 apresenta discrepância, pois a medida que há agravamento da cardiopatia a tendência seria aumentar a produção dessa citocina.

Nossos resultados demonstram que em estímulo com PHA os grupos cardíacos apresentam maior expressão de Granzima B em relação ao grupo indeterminado, em contrapartida na presença do antígeno (EPI) o grupo indeterminado apresentou maior expressão desses grânulos em relação aos demais grupos avaliados. Um grupo de pesquisadores demonstram que pacientes na fase crônica da doença de Chagas com a forma indeterminada apresentam uma frequência de células TCD4+ expressando granzima B e que essa população estaria exercendo papel não apenas citotóxico, mas regulatório também [9]. As células Natural Killer (NK) e linfócitos T CD8 citotóxicos conseguem eliminar células infectadas com patógenos através da secreção de grânulos citolíticos como as

granzimas e as perforinas. Porém, esses grânulos citotóxicos não são capazes de destruir o parasita intracelular [25]. Estudos apontam que no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de camundongos e humanos apresentam em sua composição grande parcela de células expressando granzimas [8,10], sugerindo a participação desses grânulos citolíticos na cardiopatia chagásica.

Estudos demonstraram que os pacientes da forma indeterminada apresentam características moduladoras e alta expressão de IL-10, enquanto os pacientes cardíacos tem uma resposta inflamatória excessiva [7]. Curiosamente, no presente estudo todos os grupos apresentaram um padrão de expressão em resposta a cada estímulo utilizado na cultura de PBMC, discrepante da literatura que demonstra a resposta de acordo com a forma clinica apresentada pelo portador da doença. Os grupos IND, CARD 1 e CARD 2 quando estavam sem estímulo apresentaram maior expressão de IL-10 em relação aos outros analitos. Já ao serem estimulados por PHA, todos os grupos apresentaram maior expressão de Granzima B em relação aos outros analitos. Os grupos IND e CARD1 ao serem estimulados pelo antígeno do *T. cruzi* apresentaram maior expressão de IFN- γ , apenas o grupo CARD 2 não acompanhou esse padrão, apresentando maior expressão de IL-10 se comparado ao IFN- γ e Granzima B.

Adicionalmente também verificamos a produção de IL-10, IFN- γ e Granzima B sem os níveis basais, onde fizemos a subtração dos resultados com estímulos pelo resultados sem estímulos, podemos notar que mesmo sem diferença estatística os grupos cardíacos apresentaram maior produção de todos os analitos em relação ao grupo IND quanto estimulados por PHA, no caso do IFN- γ e Granzima B, eles acompanharam os resultados da literatura onde os grupos cardíacos apresentam resposta inflamatória mais intensa devida a sua maior produção [6,17], entretanto a IL-10 apresentou concordância com estudo onde seus níveis permaneceram maior nos pacientes cardíacos [18]. Já no caso dos estimulados por EPI todos os grupos apresentaram discrepância da literatura na produção dos analitos do nosso estudo.

Ao avaliar cultura de sangue total após estímulo de antígeno tripomastigota em pacientes nas formas IND e CARD demonstraram que houve diminuição dos níveis de células IL-10+CD4+ no grupo IND, enquanto aumentou a frequência de monócitos IL-10 + no grupo CARD [18]. Almeida e colaboradores [26] encontraram em suas análises maiores frequências de T regs CD4+CD25+FoxP3+ em pacientes

do grupo CARD quando comparados ao grupo IND, esses linfócitos tem função como trazer homeostase na resposta inflamatória [27], além disso também foram encontradas maiores populações de CD4+CD25highFoxP3+ no grupo CARD quando comparados aos IND. Com isso podemos concluir que os pacientes cardíacos mesmo sendo caracterizados com um perfil de resposta inflamatória exacerbada, os mesmos de alguma maneira são capazes de ativar e manter mecanismos de regulação, podendo assim, ocorrer essa inversão no perfil de citocinas presente na população em estudo.

Curiosamente, os grupos analisados nos estudos de Almeida e colaboradores [26] e de Melo [28] são os mesmos utilizados em nosso estudo. Como foi mostrado anteriormente, em Almeida foram encontrados uma maior frequência de T regs em pacientes do grupo cardíaco em relação ao grupo assintomático. Corroborando com esses achados, de Melo encontrou maiores níveis de linfócitos T CD8+CCR3+, T CD4+CCR4 e receptores de CCR3 em pacientes do grupo CARD em relação aos pacientes do grupo IND.

O receptor para quimiocinas CCR3 é definido como perfil imunomodulatório Th2 [29,30] e o receptor de quimiocinas CCR4 é conhecido por ser expresso seletivamente por células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e células T regs, sendo assim, ligados a produção de citocinas regulatórias como IL-10 [31].

Por fim, esses achados ao corroborar com Almeida e de Melo, excluimos a possibilidade de erro no procedimento técnico, levantando a possibilidade de haver outras cepas do *T. cruzi* circulando no estado de Pernambuco, onde essas podem estar causando resposta imune de maneira inversa ao convencional nesses pacientes crônicos. Sugerimos mais estudos para avaliação da atividade imunológica na doença de Chagas, bem como estudos epidemiológicos para pesquisar novas cepas circulantes.

5. Declaração de ética

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O sobrenadante de cultura utilizado em nosso projeto já estava estocado nas dependências do departamento de Imunologia do IAM/Fiocruz. A conduta de inclusão dos pacientes e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/Fiocruz

(CAEE: 0032.0.095.000-10). Os indivíduos que se recusaram a participar do estudo não tiveram nenhum comprometimento quanto ao seu acompanhamento médico.

6. Contribuições dos autores

Todos os autores contribuíram diretamente para o trabalho. DE ARRUDA TR e LORENA VMB contribuíram em todos os quesitos desde os experimentos até a redação deste artigo. TORRES DJL realizou as dosagens pelo *CBA* e contribuiu nas análises e interpretações de dados. GOMES YM cedeu as amostras para realização dos experimentos.

7. Agradecimentos

Agradecemos a todos os pacientes que se voluntariaram no estudo e ao Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE). Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM) por todo suporte para realização de nosso estudo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5), e ao Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15) pelo suporte financeiro.

8. Declaração de conflito de interesse

Os autores não declaram nenhum conflito de interesse.

Referências

[1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 13 Jun. 2018.

[2] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec.** v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015.

- [3] Moncayo, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional in the Southern Cone Countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.
- [4] Andrade, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 94, p. 71-80, 1999.
- [5] Junqueira, C.; et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med.** v. 12, e29, 2010.
- [6] Silverio, J.C.; et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog.** v. 8, n. 4, e1002645, 2012.
- [7] Sousa, G.R.; et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One.** v. 9, n.3, e87082, 2014.
- [8] Reis, D.D.; et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.43, p.637-644, 1993.
- [9] Araujo, F.F.; et al. Foxp3+CD25high 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.** v.8, p.768-777, 2012.
- [10] Lasso, P.; et al. Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. **The Journal of Immunology.**, v. 195, p. 3748-3758, 2015.
- [11] Dias, J.C.P.; et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde.** v 7, p 7-86, 2016.
- [12] Chen, R.; et al. Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. **Clin Chem,** v. 45, n. 9, n.1, p.1693–1694, 1999.
- [13] Sathler-Avelar, R.; et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem Inst Oswaldo Cruz.**104(I): 246-51, 2009.

- [14] Reis, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Br J Med Biol Res.** v. 44, n. 2, 84-90, 2011.
- [15] Dutra, W.O.; et al. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol.** v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.
- [16] Fiorentino, D. F.; et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol.** v. 147 n. 11, p. 3815-3822, 1991.
- [17] Gomes, J.A.; et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1 specific immune response. **Infect Immun.** v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.
- [18] 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. **Scandinavian Journal of Immunology.** v. 68, p. 516-525, 2008.
- [19] Martins, G.A. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection and Immunity.** v. 67, n. 3, p.3864-3871, 1999.
- [20] Romanha, A.J.; et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases.** v.186, p.823-828, 2002.
- [21] Ferraz, M.L.; et al. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.51, p.1359-64, 2007.
- [22] Cunha-Neto, E.; et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 104, p. 252-8, 2009.
- [23] Gomes, J.A.; et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun.** v. 73, n. 12, p. 7960-6, 2005.
- [24] Araujo, F.F.; et al. Potential role of CD4+CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci,** v. 1, n. 12, p. 2797-806, 2007.

- [25] Chowdhury, D.; Lieberman, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **Immunol.** v. 26, p. 389–420, 2008.
- [26] Almeida, M.S.; et al. Alternative Th17 and CD4+CD25+FoxP3+ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. **Scand J Immunol.** v 87:e12650., 2018.
- [28] de Melo, A.S. **Avaliação do papel de quimiocinas e seus receptores na evolução das manifestações clínicas em portadores da doença de Chagas crônica.** Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/18027>>. Acesso em: 11 out. 2018.
- [27] Baecher-Allan C; et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol.** v 167, p 1245-1253, 2001.
- [29] GERBER, B.O. et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. **Current Biology.** v. 7, p. 836–843, 1997.
- [30] 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.** v. 21, p. 205-201, 2003.
- [31] YE H OO. et al. The Role of Chemokines in the Recruitment of Lymphocytes to the Liver. **Dig Dis.** v. 28, p. 31–44. 2010.

8 CONCLUSÃO

Após estímulo com antígeno do *T. cruzi* os indivíduos do grupo IND apresentaram aumento nos níveis de IFN- γ e Granzima B, e os indivíduos do grupo CARD 2 apresentaram aumento nos níveis de IL-10. Portadores da forma cardíaca da Doença de Chagas também podem ativar e manter uma resposta regulatória. Além disso, sugerimos a presença de uma nova cepa de *T. cruzi* circulante no estado de Pernambuco, onde a mesma pode estar causando essa inversão na produção de citocinas. Sugerimos mais estudos com outras citocinas e subpopulações de células para que possa ter mais clareza sobre a participação da resposta do hospedeiro e quais impactos pode estar causando no portador da doença de Chagas e estudos epidemiológicos para pesquisar novas cepas circulantes.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, G.R. *et al.* The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 1929, 2018.
- ANDRADE, J.P. *et al.* I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease. Executive Summary. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 434 - 442, 2011.
- ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 71-80, 1999.
- ARAUJO, A.F. *et al.* CD8⁺-Tcell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, p. 6017-6025, 2005.
- ARAUJO, F.F. *et al.* Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in bioscience**, Tampa, v. 1, n. 12, p. 2797-806, 2007.
- 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**, Cambridge, v.8, p.768-777, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.38, p.29, 2005.
- BUDZKO, D.B. *et al.* Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 11, p. 86-91, 1975.
- BUSCAGLIA, C.A.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 419-427, 2003.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHEN, R. *et al.* Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. **Clin Chem**, Washington, v. 45, n. 9, p.1693–1694, 1999.
- CHOWDHURY, D.; LIEBERMAN, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 26, p. 389–420, 2008.

COELHO-CASTELO, A.A.M. *et al.* Resposta imune a doenças infecciosas. **Revista Medicina**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 252-8, 2009.

DE MELO, A.S. **Avaliação do papel de quimiocinas e seus receptores na evolução das manifestações clínicas em portadores da doença de Chagas crônica.** Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/18027>>. Acesso em: 11 out. 2018.

DIAZ, J.H. Recognizing and reducing the risks of Chagas disease (American trypanosomiasis) intravelers. **J Travel Med.**, Oxford, v. 15, p. 184-195, 2008.

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

DUTRA, W.O. *et al.* The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol.**, Cambridge, v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.

FERRAZ, M.L. *et al.* The AntiTrypanosoma cruzi activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.51, p.1359-1364, 2007.

FIORENTINO, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 147 n. 11, p. 3815-3822, 1991.

FREITAS, E.C. *et al.* Prevalence of Chagas disease in a Rural area in the State of Ceara, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 431-433, 2015.

FROELICH, C.J. *et al.* New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 271, p. 29073-29079, 1996.

FUENMAYOR, C. *et al.* Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. **Acta Cardiol.**, Abingdon, v. 60, p. 33-37, 2005.

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

GOMES, J.A. *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 12, p. 7960-6, 2005.

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

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

GONÇALVES, R.G. *et al.* **Guia de Triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana, 112 pp., 2012.

HARDISON, J.L. *et al.* 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.

HIGUCHI, M.L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Research**, Oxford, v. 60, p. 96-107, 2003.

HIGUCHI, M.L. *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, Alemanha, v. 3, p. 157-160, 1993.

HOLSCHER, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n.3, p. 1208-1215, 1998.

HOTEZ, P.J.; FUJIWARA, R.T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, Paris, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

HUNTER, C.A. *et al.* IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 7, p. 3311-3316, 1997.

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

KAHN, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. **Journal of Experimental Medicine**, Nova Iorque, v. 182, p. 1243-1258, 1995.

KIPNIS, T.L. *et al.* Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 22, p. 217-226, 1985.

KUMAR, S.; TARLETON, R.L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 166, p. 4596-4603, 2001.

LASSO, P. *et al.* Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic Chagasic Patients. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 195, p. 3748-3758, 2015.

LIEBERMAN, J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. **Immunol. Rev.**, Nova Iorque, v. 235, n. 1, p. 5-9, 2010.

MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 4, p. 1-16, 2002.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev.**, Nova Iorque, v. 201, p. 304-317, 2004.

MARTINS, G.A. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 3, p.3864-3871, 1999.

MARTINS-MELO, F.R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.**, Basileia, v. 130p. 167-174, 2014.

MICHAILOWSKY, V. *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Pathology**, Nova Iorque, v. 159, p. 1723-1733, 2001.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional in the Southern Cone Countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol.**, Liverpool, v. 100, p. 663-677, 2006.

RABINOVICH, J.E.; HIMSCHOOT, P. A population-dynamics simulation model of the main vectors of Chagas' Disease transmission, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. **Ecol. Modelling**, Londres, v. 52, p. 249-266, 1990.

REIS, D.D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v.43, p.637-644, 1993.

REIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Br J Med Biol Res.**, São Paulo, v. 44, n. 2, 84-90, 2011.

ROMANHA, A.J. *et al.* Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-g in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.186, p.823-828, 2002.

SALVATELLA, R. Current Status of Chagas Disease. **Pan American Health Organization**, Washington, 2006.

SANDBERG J.K. *et al.* Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 167, p. 181-187, 2001.

SANTOS JÚNIOR, J.C.M. Megacólon - Parte II: Doença de Chagas. **Rev bras Coloproct.**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 266-277, 2002.

SARDINHA, L.R.; *et al.* Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 74, p. 2031-2042, 2006.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 246-51, 2009.

SHI, L. *et al.* Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. **Journal of Experimental Medicine**, Nova Iorque, v. 185, p. 855-866, 1997.

SILVERIO, J.C. *et al.* CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, São Francisco, v. 8, n. 4, e1002645, 2012.

SOUSA, G.R. *et al.* Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One**, São Francisco, v. 9, n.3, e87082, 2014.

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, n. 2, p. 214-220, 2004.

TAMBOURGI, D.V. *et al.* A partial cDNA clone of trypomastigote decay- accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 3656-3663, 1993.

TANOWITZ, H.B. *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in Cardiovascular Diseases**, Nova Orleans, v. 51, p. 524-539, 2009.

TRAPANI J.A.; SMYTH M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 2, p. 735-747, 2002.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, Austrália, v. 31, p. 472–481, 2001.

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. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 68, p. 516-525, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 18 Jun. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 18 Jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, v. 90, n. 6, p. 33–44, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sixty-fifth world health assembly: Progress reports. report A65/26**. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/wHA65/A65_26-en.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2018.

**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.

_____ <i>Paciente</i>	_____ <i>Assinatura</i>
_____ <i>Testemunha</i>	_____ <i>Assinatura</i>
_____ <i>Responsável pelo projeto</i>	_____ <i>Assinatura</i>

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



Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0493375
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

